

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7001663号
(P7001663)

(45)発行日 令和4年2月4日(2022.2.4)

(24)登録日 令和3年12月28日(2021.12.28)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/113(2010.01)

C 1 2 N 15/113

Z Z N A

A 6 1 K 31/7088(2006.01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 47/61 (2017.01)

A 6 1 K 47/61

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 27/02

請求項の数 15 (全574頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-228789(P2019-228789)

(22)出願日 令和1年12月19日(2019.12.19)

(62)分割の表示 特願2016-565465(P2016-565465)
)の分割

原出願日 平成27年5月1日(2015.5.1)

(65)公開番号 特開2020-58368(P2020-58368A)

(43)公開日 令和2年4月16日(2020.4.16)

審査請求日 令和2年1月17日(2020.1.17)

(31)優先権主張番号 61/987,471

(32)優先日 平成26年5月1日(2014.5.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/076,273

(32)優先日 平成26年11月6日(2014.11.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関

最終頁に続く

(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 Pharmaceutic
als, Inc.アメリカ合衆国カリフォルニア州920
10, カールズバッド, ガゼル コート
2855

(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

(74)代理人 100120112

最終頁に続く

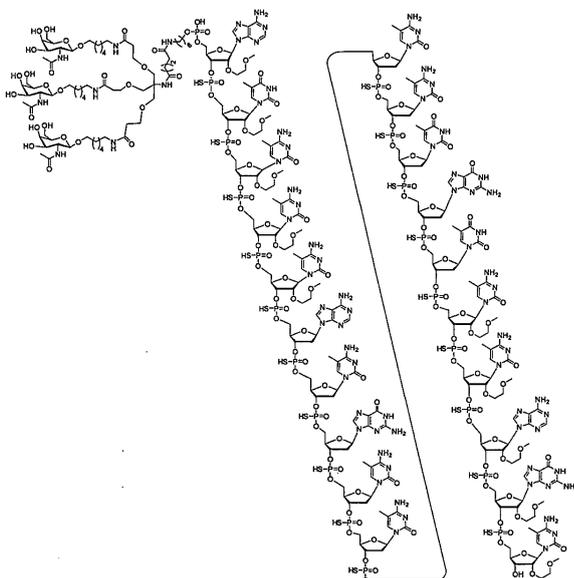
(54)【発明の名称】 補体B因子発現を調節するための組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の化学構造で表わされるオリゴマー化合物：

【化1】

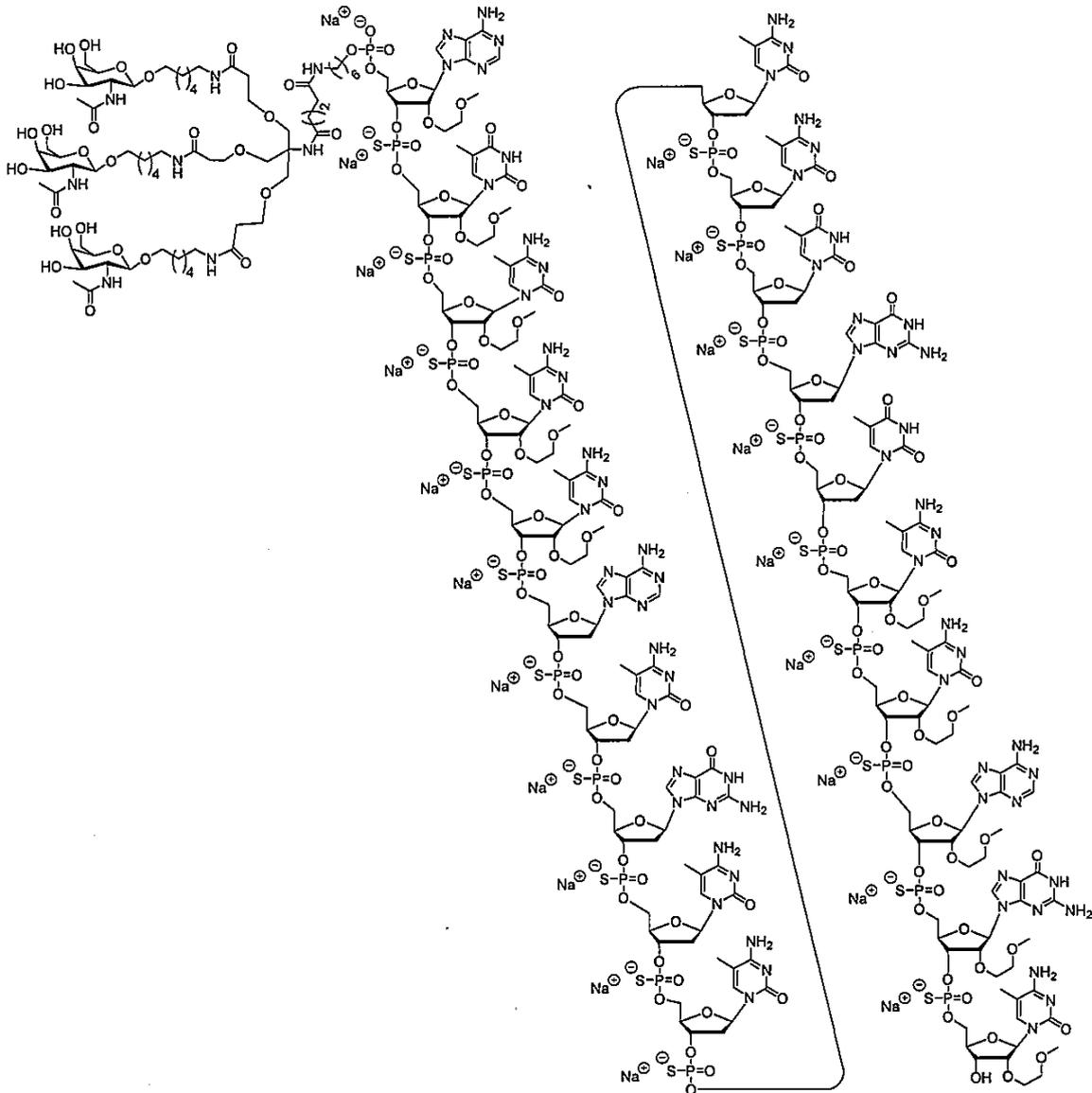


(配列番号 4 4 0)。

【 請求項 2 】

以下の化学構造で表わされるオリゴマー化合物：

【 化 2 】



10

20

30

(配列番号 4 4 0)。

【 請求項 3 】

以下の式：

【 化 3 】

GalNAc₃₋₇a-o'A_{es}T_{es}^mC_{es}^mC_{es}^mC_{es}^mA_{ds}^mC_{ds}^mG_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds}^mT_{ds}^mG_{ds}^mT_{ds}^mC_{es}^mC_{es}^mA_{es}^mG_{es}^mC_c (配列番号 440)

40

で表わされる修飾オリゴヌクレオチドとコンジュゲート基とを含むオリゴマー化合物であって、上記式中、

Aは、アデニンであり、

mCは、5 - メチルシトシンであり、

50

G は、グアニンであり、

T は、チミンであり、

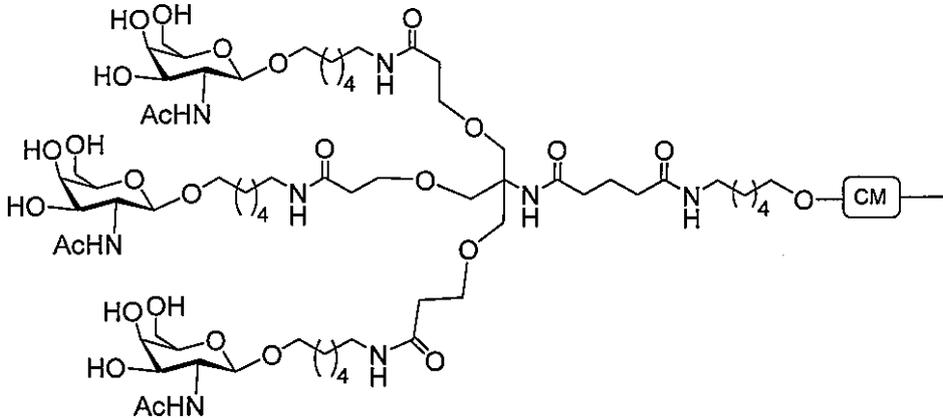
e は、2' - MOE 修飾ヌクレオシドを示し、

d は、- D - 2' - デオキシリボヌクレオシドを示し、

s は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結を示し、

G a 1 N A c 3 - 7 a - o は、

【化 4】



10

20

で示され、式中、切断可能部分 (CM) は、5' -P(OH)(=O)-O-3' である前記オリゴマー化合物。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のオリゴマー化合物またはその塩と、医薬上許容される担体または希釈剤の少なくとも 1 つを含む組成物。

【請求項 5】

組成物が、40 センチポアズ (cP) 未満、30 センチポアズ (cP) 未満、20 センチポアズ (cP) 未満、15 センチポアズ (cP) 未満、または 10 センチポアズ (cP) 未満の粘度を有する、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

対象における補体代替経路の調節異常に関連する疾患を治療するための医薬であって、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のオリゴマー化合物または請求項 4 または 5 に記載の組成物を含む、前記医薬。

【請求項 7】

前記補体代替経路が正常より強く活性化されている、請求項 6 に記載の医薬。

【請求項 8】

前記疾患が黄斑変性、加齢黄斑変性 (AMD)、滲出型 AMD、乾性 AMD または地図状萎縮である、請求項 6 に記載の医薬。

【請求項 9】

前記疾患が腎臓疾患である、請求項 6 に記載の医薬。

【請求項 10】

前記腎臓疾患が IgA ネフロパシー、ループス腎炎、全身性エリテマトーデス (SLE)、デンスデポジット病 (DDD)、C3 系球体腎炎 (C3GN)、CFHR5 ネフロパシー、または非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) である、請求項 9 に記載の医薬。

【請求項 11】

補体代替経路の調節異常に関連する疾患を治療するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のオリゴマー化合物または請求項 4 または 5 に記載の組成物の使用。

【請求項 12】

前記補体代替経路が正常より強く活性化されている、請求項 11 に記載の医薬の製造にお

30

40

50

けるオリゴマー化合物または組成物の使用。

【請求項 1 3】

前記疾患が黄斑変性、加齢黄斑変性（AMD）、滲出型AMD、乾性AMDまたは地図状萎縮である、請求項 1 1 に記載の医薬の製造におけるオリゴマー化合物または組成物の使用。

【請求項 1 4】

前記疾患が腎臓疾患である、請求項 1 1 に記載の医薬の製造におけるオリゴマー化合物または組成物の使用。

【請求項 1 5】

前記腎臓疾患がIgAネフロパシー、ループス腎炎、全身性エリテマトーデス（SLE）、デンスデポジット病（DDD）、C3系球体腎炎（C3GN）、CFHR5ネフロパシー、または非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）である、請求項 1 4 に記載の医薬の製造におけるオリゴマー化合物または組成物の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本願は、電子形式の配列表とともに出願されている。この配列表は、2015年4月28日に作成されたサイズ204kbのBIOL0251WOSEQ__ST25.txtという名称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。

20

【0002】

本実施形態は、補体B因子（CFB）特異的阻害剤を対象に投与することによって、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を処置し、防止し、または改善するための方法、化合物、及び組成物を提供する。

【背景技術】

【0003】

補体系は、外来細胞の溶解、抗原貪食の強化、抗原保持因子の凝集、ならびにマクロファージ及び好中球の誘引に關与する宿主自然免疫系の一部である。補体系は3つの初期経路 - 古典経路、レクチン経路、及び代替経路 - に分類され、それらは、成分C3に収束して、C3コンバーターゼとして知られる酵素複合体を生成させ、それがC3をC3aとC3bとに切断する。C3bはCFBに媒介されてC3コンバーターゼと会合し、C5コンバーターゼの生成をもたらす。C5コンバーターゼはC5をC5aとC5bとに切断し、そのC5bが膜侵襲経路を開始して、成分C5b、C6、C7、C8、及びC9を含む膜侵襲複合体（MAC）の形成をもたらす。膜侵襲複合体（MAC）は膜貫通チャネルを形成して標的細胞のリン脂質二重層を破壊し、それが細胞溶解につながる。

30

【0004】

ホメオスタシス状態では、C3の自発的加水分解とC3bの生成とによる代替経路の活性化の結果として、代替経路が低い「アイドリング（tickover）」レベルで絶えず活性化されて、C5コンバーターゼを生成している。

40

【発明の概要】

【0005】

概要

補体系は自然免疫を媒介し、傷害に対する正常な炎症応答に重要な役割を果たすが、その調節異常は重度の傷害を引き起こしうる。代替補体経路がその構成的「アイドリング」レベルを超えて活性化すると、無制限な機能亢進が起こり、補体調節異常の疾患として顕在化しうる。

【0006】

ここに提供する特定の実施形態は、補体B因子（CFB）特異的阻害剤の投与によって、対象における補体代替経路の調節異常に関連する疾患を処置し、防止し、または改善する

50

方法に関する。ここに提供するいくつかの実施形態は、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象におけるCFBの発現を、前記対象にCFB特異的阻害剤を投与することによって阻害する方法に向けられる。特定の実施形態では、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象の眼におけるC3沈着を低減しまたはC3沈着の蓄積を阻害する方法には、前記対象にCFB特異的阻害剤を投与することが含まれる。いくつかの実施形態では、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象の腎臓におけるC3沈着を低減しまたはC3沈着の蓄積を阻害する方法には、前記対象にCFB特異的阻害剤を投与することが含まれる。

【発明を実施するための形態】

10

【0007】

詳細な説明

前記一般的な説明及び以下の詳細な説明はどちらも例示的かつ説明的であるにすぎず、本願に係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、別段の明示がある場合を除き、複数形を含む。本明細書において「または(or)」の使用は、別段の言明がある場合を除き、「及び/または(and/or)」を意味する。さらに、「～を含む(including)」という用語、ならびに「～を含む(includes)」及び「含まれる(included)」などの他の形態の使用は、限定的ではない。また、「要素」または「成分」などの用語は、別段の明示がある場合を除き、1つのユニットを含む要素及び成分と2つ以上のサブユニットを含む要素及び成分をどちらも包含する。

20

【0008】

本明細書において使用する見出しには構成上の目的しかなく、記載される主題を限定するものと解釈してはならない。本願において引用する文書または文書の一部は、すべて、例えば限定するわけではないが特許、特許出願、記事、書籍、及び論文を含めて、その文書のうちの明細書において論じる部分も、その全体も、参照により明確に組み込まれる。

【0009】

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術語、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。そのような技法及び手順のうち特定のものは、例えば「Carbohydrate Modifications in Antisense Research」Sangvi及びCook編、American Chemical Society、ワシントンD.C.、1994、「Remington's Pharmaceutical Sciences」Mack Publishing Co.、ペンシルベニア州イーストン、第21版、2005、及び「Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications」Stanley T. Crooke編、CRC Press、フロリダ州ボカラトン、ならびにSambrook et al.、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual」第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989に見いだすことができ、これらは、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。許容される場合、本開示の全体を通して言及する特許、出願、公開された出願、及び他の出版物、ならびに他のデータはすべて、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

30

40

別段の表示がある場合を除き、以下の用語は、以下の意味を有する。

【0010】

「2'-Fヌクレオシド」とは、2'位にフッ素を含む糖を含むヌクレオシドを指す。別段の表示がある場合を除き、2'-Fヌクレオシドにおけるフッ素は(天然リボースのOHを置き換える)リボ位に存在する。

【0011】

50

「2'-O-メトキシエチル」(2'-MOE及び2'-O(即ち2'-OCH₃ともいう))は、フラノース環の2'位にある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。

【0012】

「2'-MOEヌクレオシド」(2'-O-メトキシエチルヌクレオシドともいう)は、2'-MOE修飾糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

【0013】

「2'-置換ヌクレオシド」とは、フラノシル環の2'位にHまたはOH以外の置換基を含むヌクレオシドを意味する。特定の実施形態において、2'置換ヌクレオシドは、二環式糖修飾を有するヌクレオシドを含む。

10

【0014】

「3'標的部位」とは、ある特定アンチセンス化合物の最も3'側のヌクレオチドに相補的な標的核酸のヌクレオチドを指す。

【0015】

「5'標的部位」とは、ある特定アンチセンス化合物の最も5'側のヌクレオチドに相補的な標的核酸のヌクレオチドを指す。

【0016】

「5-メチルシトシン」とは、5位に取り付けられ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。

【0017】

「約」とは、ある値の±10%以内を意味する。例えば、「CFBの少なくとも約70%阻害を達成する化合物」と言明した場合、それは、CFBレベルが60%~80%の範囲内で阻害されることを含意する。

20

【0018】

「投与」または「投与すること」とは、ここに提供するアンチセンス化合物を、意図したその機能を果たすように対象に導入する経路を指す。使用することができる投与経路の一例として、非経口投与、例えば皮下、静脈内、または筋肉内への注射または注入が挙げられるが、これらに限定されない。

【0019】

本明細書にいう「アルキル」とは、最大24個の炭素原子を含有する飽和直鎖または分岐鎖炭化水素ラジカルを意味する。アルキル基の例として、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソプロピル、n-ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシルなどが挙げられるが、これらに限定されない。アルキル基は、典型的には、1~約24個の炭素原子、より典型的には、1~約12個の炭素原子(C₁~C₁₂アルキル)を含み、1~約6個の炭素原子がより好ましい。

30

【0020】

本明細書にいう「アルケニル」とは、最大24個の炭素原子を含有し、かつ少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する直鎖または分岐鎖炭化水素鎖ラジカルを意味する。アルケニル基の例として、エテニル、プロペニル、ブテニル、1-メチル-2-ブテン-1-イル、1,3-ブタジエンなどのジエンなどが挙げられるが、これらに限定されない。アルケニル基は、典型的には、2~約24個の炭素原子、より典型的には、2~約12個の炭素原子を含み、2~約6個の炭素原子がより好ましい。本明細書にいうアルケニル基は、場合によっては、1つ以上のさらなる置換基を含みうる。

40

【0021】

本明細書にいう「アルキニル」とは、最大24個の炭素原子を含有し、かつ少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を有する直鎖または分岐鎖炭化水素ラジカルを意味する。アルキニル基の例として、エチニル、1-プロピニル、1-ブチニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。アルキニル基は、典型的には、2~約24個の炭素原子、より典型的には、2~約12個の炭素原子を含み、2~約6個の炭素原子がより好ましい。本明細書にいうアルキニル基は、場合によっては、1つ以上のさらなる置換基を含みうる。

50

【 0 0 2 2 】

本明細書にいう「アシル」とは、有機酸からヒドロキシル基を除去することによって形成されるラジカルを意味し、一般式 $-C(O)-X$ を有し、式中、 X は、典型的には、脂肪族、脂環式、または芳香族である。例として、脂肪族カルボニル、芳香族カルボニル、脂肪族スルホニル、芳香族スルフィニル、脂肪族スルフィニル、芳香族ホスフェート、脂肪族ホスフェートなどが挙げられる。本明細書にいうアシル基は、さらなる置換基を場合によっては含みうる。

【 0 0 2 3 】

本明細書にいう「脂環式」とは、環式環系を意味し、前記環は、脂肪族である。前記環系は、1つ以上の環を含むことができ、少なくとも1つの環は脂肪族である。好ましい脂環式基は、環内に約5～約9個の炭素原子を有する環を含む。本明細書にいう脂環式基は、場合によっては、さらなる置換基を含みうる。

10

【 0 0 2 4 】

本明細書にいう「脂肪族」とは、最大24個の炭素原子を含有する直鎖または分岐鎖炭化水素ラジカルを意味し、任意の2つの炭素原子の間の飽和度は、一重、二重、または三重結合である。脂肪族基は、好ましくは、1～約24個の炭素原子、より典型的には、1～約12個の炭素原子を含有し、1～約6個の炭素原子がより好ましい。脂肪族基の直鎖または分岐鎖は、窒素、酸素、硫黄、及びリンを含む1つ以上のヘテロ原子で中断されていてもよい。ヘテロ原子によって中断されているそのような脂肪族基には、ポリアルコキシ、例えば、ポリアルキレングリコール、ポリアミン、及びポリイミンが含まれるが、これらに限定されない。本明細書にいう脂肪族基は、場合によっては、さらなる置換基を含みうる。

20

【 0 0 2 5 】

本明細書にいう「アルコキシ」とは、アルキル基と酸素原子とで形成されるラジカルを意味し、アルコキシ基は前記酸素原子を使って親分子に取り付けられる。アルコキシ基の例として、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、*n*-ブトキシ、*sec*-ブトキシ、*tert*-ブトキシ、*n*-ペントキシ、ネオペントキシ、*n*-ヘキソキシなどが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書にいうアルコキシ基は、場合によっては、さらなる置換基を含みうる。

【 0 0 2 6 】

本明細書にいう「アミノアルキル」とは、アミノ置換されたC1～C12アルキルラジカルを意味する。前記ラジカルアルキル部分は、親分子と共有結合を形成する。アミノ基は、任意の位置に位置することができ、アミノアルキル基は、アルキル部分及び/またはアミノ部分を、さらなる置換基で置換することができる。

30

【 0 0 2 7 】

本明細書にいう「アラルキル」及び「アリールアルキル」とは、C1～C12アルキルラジカルに共有結合で連結されている芳香族基を意味する。結果として生じるアラルキル(またはアリールアルキル)基のアルキルラジカル部分は、親分子と共有結合を形成する。例として、ベンジル、フェネチルなどが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書にいうアラルキル基は、場合によっては、当該ラジカル基を形成するアルキル基、アリール基、またはそれら両方の基に取り付けられたさらなる置換基を含みうる。

40

【 0 0 2 8 】

本明細書にいう「アリール」及び「芳香族」とは、1つ以上の芳香族環を有する単環式または多環式炭素環式環系ラジカルを意味する。アリール基の例として、フェニル、ナフチル、テトラヒドロナフチル、インダニル、イデニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいアリール環系は、1つ以上の環内に約5～約20個の炭素原子を有する。本明細書にいうアリール基は、場合によっては、さらなる置換基を含みうる。

【 0 0 2 9 】

「改善」とは、関連する疾患、障害、または状態の少なくとも1つの指標、徴候、または症状の軽減を指す。特定の実施形態では、改善は、状態または疾患の1つ以上の指標の進

50

行の遅延または減速を包含する。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。

【0030】

「動物」とは、ヒトまたはヒト以外の動物を指し、これには、例えばマウス、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）が含まれるが、これらに限定されない。

【0031】

「アンチセンス活性」とは、アンチセンス化合物による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な活性または測定可能な活性を意味する。特定の実施形態では、アンチセンス活性が、標的核酸またはそのような標的核酸がコードするタンパク質の量または発現の減少である。

10

【0032】

「アンチセンス化合物」とは、水素結合によって標的核酸へのハイブリダイゼーションを起こすことができるオリゴマー化合物を意味する。アンチセンス化合物の例として、一本鎖化合物及び二本鎖化合物、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、ssRNA、及び占有に基づく(occupancy-based)化合物が挙げられる。

【0033】

「アンチセンス阻害」とは、アンチセンス化合物が存在しない場合の標的核酸レベルとの比較で、標的核酸に相補的なアンチセンス化合物の存在下での標的核酸レベルの低減を意味する。

20

【0034】

「アンチセンス機序」とは、化合物と標的核酸とのハイブリダイゼーションを伴うすべての機序をいう。前記ハイブリダイゼーションの結果または効果は、標的の分解または標的の占有であり、これに付随して、例えば転写またはスプライシングに関わる細胞機構の停止が起こる。

【0035】

「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対応する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。

30

【0036】

「塩基相補性」とは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸塩基が標的核酸中の対応する核酸塩基と正確な塩基対合（すなわちハイブリダイゼーション）を起こす能力を指し、これは、対応する核酸塩基間のワトソン-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によって媒介される。

【0037】

「二環式糖部分」とは、4～7員環の2つの原子をつないで第2の環を形成することで二環式構造をもたらす橋を含む4～7員環（フラノシルを含むが、これに限定されない）を含む修飾糖部分を意味する。特定の実施形態では、前記4～7員環が糖環である。特定の実施形態では、前記4～7員環がフラノシルである。特定のそのような実施形態では、前記橋が、フラノシルの2'-炭素と4'-炭素とをつなぐ。

40

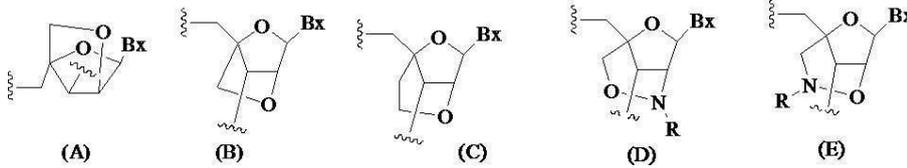
【0038】

「二環式核酸」または「BNA」または「BNAヌクレオシド」とは、ヌクレオシド糖単位の4'位と2'位の間で2つの炭素原子をつないで二環式糖を形成する橋を有する核酸モノマーを意味する。そのような二環式糖の例として、以下に図示するA) -L-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')LNA、(B) -D-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')LNA、(C)エチレンオキシ(4'-(-CH₂)₂-O-2')LNA、(D)アミノオキシ(4'-CH₂-O-N(R)-2')LNA及び(E)オキシアミノ(4'-CH₂-N(R)-O-2')LNAが挙げられるが、これらに限定されない。

【0039】

50

【化1】



【0040】

本明細書にいうLNA化合物には、糖の4'位と2'位との間に少なくとも1つの橋を有する化合物であって、橋のそれぞれが、 $-[C(R_1)(R_2)]_n-$ 、 $-C(R_1)=C(R_2)-$ 、 $-C(R_1)=N-$ 、 $-C(=NR_1)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-O-$ 、 $-Si(R_1)_2-$ 、 $-S(=O)_x-$ 及び $-N(R_1)-$ [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、各 R_1 及び R_2 は、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($S(=O)-J_1$)であり、各 J_1 及び J_2 は、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]から独立して選択される1つまたは2~4つの連結基を、独立して含むものが含まれるが、これらに限定されない。

【0041】

LNAの定義に包含される4'-2'架橋基の例として、次式の1つが挙げられるが、これらに限定されない： $-[C(R_1)(R_2)]_n-$ 、 $-[C(R_1)(R_2)]_n-O-$ 、 $-C(R_1R_2)-N(R_1)-O-$ または $-C(R_1R_2)-O-N(R_1)-$ 。さらに、LNAの定義に包含される他の架橋基には、4'- CH_2-2' 、4'- $(CH)_2-2'$ 、4'- $(CH)_3-2'$ 、4'- C_2H-O-2' 、4'- $(CH)_2-O-2'$ 、4'- $CH_2-O-N(R_1)-2'$ 及び4'- $CH-N(R_1)-O-2'$ 橋があり、ここで、各 R_1 及び R_2 は、独立して、H、保護基または C_1-C_{12} アルキルである。

【0042】

本発明のLNAの定義には、リボシル糖環の2'-ヒドロキシル基が糖環の4'炭素原子につながれてメチレンオキシ(4'- CH_2-O-2')橋を形成し、よって二環式糖部分を形成しているLNAも含まれる。橋は、2'酸素原子と4'炭素原子とをつなぐメチレン($-CH_2-$)基であってもよく、これにはメチレンオキシ(4'- CH_2-O-2')LNAという用語が使用される。さらに、この位置にエチレン架橋基を有する二環式糖部分の場合は、エチレンオキシ(4'- CH_2CH_2-O-2')LNAという用語が使用される。メチレンオキシ(4'- CH_2-O-2')LNAの異性体である $-L-$ メチレンオキシ(4'- CH_2-O-2')も、本明細書にいうLNAの定義に包含される。

【0043】

「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どちらかの末端に組み込まれた化学修飾を意味する。

【0044】

「炭水化物」とは、天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。

【0045】

「炭水化物クラスター」とは、足場基またはリンカー基に取り付けられた1つ以上の炭水

10

20

30

40

50

化物残基を有する化合物を意味する（例えば、炭水化物共役クラスターの例として、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Maier et al. 「Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting」Bioconjugate Chemistry, 2003, (14): 18-29、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

【0046】

「炭水化物誘導体」とは、出発物質または中間体として炭水化物を用いて合成されうる任意の化合物を意味する。

【0047】

「cEt」または「拘束エチル」とは、4'-炭素と2'-炭素とをつなぐ橋を含む二環式糖部分を意味し、この橋は4'-CH(CH₃)-O-2'という式を有する。

【0048】

「化学修飾」とは、天然に存在する対応物と比較した場合の化合物の化学的相違を意味する。オリゴヌクレオチドの化学修飾は、ヌクレオシド修飾（糖部分修飾及び核酸塩基修飾を含む）ならびにヌクレオシド間連結部修飾を含む。オリゴヌクレオチドの場合、核酸塩基配列だけの相違は、化学修飾には含まれない。

20

【0049】

「切断可能な結合」とは、開裂されうる任意の化学結合を意味する。特定の実施形態では、切断可能な結合は、アミド、ポリアミド、エステル、エーテル、ホスホジエステルの一方もしくは両方のエステル、リン酸エステル、カルバメート、ジスルフィド、またはペプチドのなかから選択される。

【0050】

「切断可能部分」とは、生理学的条件下で開裂されうる結合または基を意味する。特定の実施形態では、切断可能部分が、細胞の内部またはリソソームなどの細胞内コンパートメントの内部で切断される。特定の実施形態では、切断可能部分が、ヌクレアーゼなどの内在性酵素によって切断される。特定の実施形態では、切断可能部分が、1個、2個、3個、4個、または5個以上の切断可能な結合を有する原子団を含む。

30

【0051】

「共役体」または「共役基」とは、オリゴヌクレオチドまたはオリゴマー化合物に結合される原子または原子団を意味する。概して、共役基は、それらに取り付けられた化合物の1つ以上の特性、例えば限定するわけではないが、薬力学的特性、薬物動態学的特性、結合特性、吸収特性、細胞分布特性、細胞取り込み特性、電荷特性、及び/またはクリアランス特性などを修飾する。

【0052】

共役基に関連して「共役リンカー」または「リンカー」とは、任意の原子または原子団を含む共役基の一部であって、(1)オリゴヌクレオチドを共役基の別の部分と共有結合で連結するか、または(2)共役基の2つ以上の部分を共有結合で連結するものを意味する。

40

【0053】

共役基は、本明細書においてはラジカルとして示され、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどのオリゴマー化合物への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、オリゴマー化合物における結合点が、オリゴマー化合物の3'末端ヌクレオシドの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、オリゴマー化合物における結合点が、オリゴマー化合物の5'末端ヌクレオシドの5'-ヒドロキシル基の5'-酸

50

素原子である。特定の実施形態では、オリゴマー化合物への結合を形成するための結合は、切断可能な結合である。特定のそのような実施形態において、そのような切断可能な結合は、切断可能部分のすべてまたは一部を構成する。

【0054】

特定の実施形態では、共役基が、切断可能部分（例えば、切断可能な結合または切断可能なヌクレオシド）と、GalNAcクラスター部分などの炭水化物クラスター部分とを含む。そのような炭水化物クラスター部分は、標的部分と、場合によっては、共役リンカーとを含む。ある特定の実施形態では、炭水化物クラスター部分が、リガンドの数及びその実体によって特定される。例えば、ある特定の実施形態では、炭水化物クラスター部分が3個のGalNAc基を含み、「GalNAc3」と表記される。ある特定の実施形態では、炭水化物クラスター部分が4個のGalNAc基を含み、「GalNAc4」と表記される。具体的な炭水化物クラスター部分（具体的なテザー基、分岐基、及び共役リンカー基を有するもの）を、本明細書では、ローマ数字と、それに続く下付き文字「a」で説明し、表記する。したがって、「GalNAc3-1a」とは、3個のGalNAc基、ならびに具体的に特定されたテザー基、分岐基、及び連結基を有する共役基の具体的な炭水化物クラスター部分を指す。そのような炭水化物クラスター断片は、切断可能な結合または切断可能なヌクレオシドなどの切断可能部分を介してオリゴマー化合物に取り付けられる。

10

【0055】

「共役化合物」とは、共役基としての使用に好適な任意の原子、原子団、または連結された原子団を意味する。ある特定の実施形態では、共役化合物は、1つ以上の特性、例えば限定するわけではないが、薬力学的特性、薬物動態学的特性、結合特性、吸収特性、細胞分布特性、細胞取り込み特性、電荷特性、及び/またはクリアランス特性などを有しうるか、または付与しうる。

20

【0056】

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

【0057】

「補体B因子（CFB）」とは、CFBの任意の核酸またはタンパク質を意味する。「CFB核酸」とは、CFBをコードする任意の核酸を意味する。例えば特定の実施形態において、CFB核酸は、CFBをコードするDNA配列、CFBをコードするDNA（イントロンとエクソンとを含むゲノムDNAを含む）から転写されたRNA配列（これには非タンパク質コード（すなわちノンコーディング）RNA配列と、CFBをコードするmRNA配列とが含まれる）を包含する。「CFB mRNA」とはCFBタンパク質をコードするmRNAを意味する。

30

【0058】

「CFB特異的阻害剤」とは、CFB RNA及び/またはCFBタンパク質の発現または活性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CFB特異的阻害剤には、CFB RNA及び/またはCFBタンパク質の発現を阻害することができる核酸（アンチセンス化合物を含む）、ペプチド、抗体、小分子その他の薬剤が含まれる。

40

【0059】

「化学的に異なる領域」とは、同じアンチセンス化合物の別の領域と何らかの形で異なってい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持たないヌクレオチドを有する領域とは化学的に異なる。

【0060】

「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し、それぞれの位置は複数のサブユニットを有する。

【0061】

50

「相補性」とは、第1核酸と第2核酸の核酸塩基間で対合する能力を意味する。

【0062】

「を含む」(comprise、comprises、及びcomprising)は、明言したステップもしくは要素またはステップ群もしくは要素群の包含を含意するが、他の任意のステップもしくは要素またはステップ群もしくは要素群の排除を含意しないと理解されるであろう。

【0063】

「連続する核酸塩基」とは、互いに直接隣り合っている核酸塩基を意味する。

【0064】

「デオキシヌクレオシド」とは、天然に存在するデオキシリボヌクレオシド(DNA)に見られる2'-Hフラノシル糖部分を含むヌクレオシドを意味する。特定の実施形態において、2'-デオキシヌクレオシドは修飾核酸塩基を含むか、またはRNA核酸塩基(例えばウラシル)を含みうる。

10

【0065】

「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、さまざまな置換基のいずれでも修飾することができる。

【0066】

「設計」または「設計された」とは、選ばれた核酸分子と特異的にハイブリダイズするオリゴマー化合物を設計するプロセスを指す。

20

【0067】

「異なる修飾がなされた」とは、修飾の不在を含めて、互いに異なる化学修飾または化学置換基を意味する。したがって、例えば、MOEヌクレオシドと無修飾DNAヌクレオシドは、DNAヌクレオシドが修飾されていなくても、「異なる修飾がなされている」という。同様に、DNAとRNAは、たとえそのどちらもが天然に存在する無修飾ヌクレオシドであったとしても、「異なる修飾がなされている」という。異なる核酸塩基を含んでいる点以外は同じであるヌクレオシドは、異なる修飾がなされているとは言わない。例えば、2'-OMe修飾糖及び無修飾アデニン核酸塩基を含むヌクレオシドと、2'-OMe修飾糖及び無修飾チミン核酸塩基を含むヌクレオシドとは、異なる修飾がなされているとは言わない。

30

【0068】

「二本鎖」とは、互いにハイブリダイズしている2つの別個のオリゴマー化合物を指す。そのような二本鎖化合物は、生理的に妥当な条件下でハイブリダイゼーションを維持するのに十分な相補性が存在するのであれば、一方もしくは両方の鎖の一方もしくは両方の末端に1つ以上のハイブリダイズしていないヌクレオシド(オーバーハング)及び/または1つ以上のハイブリダイズしていない内部ヌクレオシド(ミスマッチ)を有しうる。

【0069】

「有効量」とは、ある活性医薬剤を必要とする個体において所望する生理学的結果を実現するのに十分な前記活性医薬剤の量を意味する。有効量は、処置される個体の健康状態及び身体状態、処置される個体の分類群、組成物の製剤、個体の医学的状態の評価、及び他の関連因子に依存して個体間で変動しうる。

40

【0070】

「効力」とは、所望の効果を生じさせる能力を意味する。

【0071】

「発現」には、遺伝子にコードされている情報を、細胞中に存在し細胞中で作動する構造物へと変換する機能のすべてが含まれる。そのような構造物として、転写産物及び翻訳産物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0072】

「完全に相補的」または「100%相補的」とは、第1核酸の各核酸塩基が第2核酸中に相補的核酸塩基を有することを意味する。特定の実施形態では、第1核酸がアンチセンス

50

化合物であり、標的核酸が第2核酸である。

【0073】

「フラノシル」とは、4つの炭素原子と1つの酸素原子とを含む5員環を含む構造を意味する。

【0074】

「ギャップマー」とは、キメラアンチセンス化合物であって、RNAase H切断を支持する複数のヌクレオシドを有する内側領域が、1つ以上のヌクレオシドを有する外側領域の間に配置されており、内側領域を構成するヌクレオシドが、外側領域を構成する1または複数のヌクレオシドと化学的に異なっているものを意味する。前記内側領域を「ギャップ」と呼び、前記外側領域を「ウイング」と呼ぶことができる。

10

【0075】

「ハロ」及び「ハロゲン」とは、フッ素、塩素、臭素、及びヨウ素から選択される原子を意味する。

【0076】

「ヘテロアリール」及び「ヘテロ芳香族」とは、単環式もしくは多環式芳香族環、環系、または縮合環系を含むラジカルであって、前記環のうちの少なくとも1つが芳香族であり、かつ1つ以上のヘテロ原子を含むものを意味する。ヘテロアリールは、縮合環のうちの1つ以上がヘテロ原子を含有していない系を含む縮合環系も包含するものとする。ヘテロアリール基は、典型的には、硫黄、窒素、または酸素から選択される1つの環原子を含む。ヘテロアリール基の例として、ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、チオフェニル、フラニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、キノキサリニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロアリールラジカルは、親分子に直接取り付けられるか、または脂肪族基もしくはヘテロ原子などの連結部分を介して取り付けることができる。本明細書にいうヘテロアリール基は、場合によっては、さらなる置換基を含みうる。

20

【0077】

「ハイブリダイゼーション」とは、相補的核酸分子のアニーリングを意味する。特定の実施形態では、相補的核酸分子に、アンチセンス化合物と核酸標的が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、相補的核酸分子に、アンチセンスオリゴヌクレオチドと核酸標的が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0078】

「ある疾患、障害及び/または状態を有するか、またはそれらを有するリスクがある動物を同定する」とは、前記疾患、障害及び/または状態と診断された動物を同定すること、あるいは前記疾患、障害及び/または状態を発症する素因を有する動物を同定することを意味する。そのような同定は、個体の病歴を評価することや標準的な臨床検査または臨床評価を含む任意の方法によって達成することができる。

【0079】

「直接隣り合っている」とは、直接隣り合っている要素の間に介在する要素が存在しないことを意味する。

40

【0080】

「個体」とは、処置または治療のために選ばれたヒトまたはヒト以外の動物を意味する。

【0081】

「発現または活性を阻害する」とは、発現または活性の低減、遮断を指し、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。

【0082】

「ヌクレオシド間連結部」とは、ヌクレオシド間の化学結合を指す。

【0083】

「ヌクレオシド間中性連結基」とは、2つのヌクレオシドを直接連結する中性連結基を意味する。

50

【 0 0 8 4 】

「ヌクレオシド間リン連結基」とは、2つのヌクレオシドを直接連結するリン連結基を意味する。

【 0 0 8 5 】

「延長された」アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本明細書に開示するアンチセンスオリゴヌクレオチドとの比較で、1つ以上の追加ヌクレオシドを有するものである。

【 0 0 8 6 】

「連結部モチーフ」とは、オリゴヌクレオチドまたはその一領域における連結部修飾のパターンを意味する。そのようなオリゴヌクレオチドのヌクレオシドは修飾されていても無修飾でもよい。別段の表示がある場合を除き、連結部の説明しかない本明細書におけるモチーフは、連結部モチーフであるものとする。したがって、そのような事例では、ヌクレオシドは限定されない。

10

【 0 0 8 7 】

「連結されたデオキシヌクレオシド」とは、デオキシリボースで置換された核酸塩基（A、G、C、T、U）が、リン酸エステルで連結されているものを意味する。

【 0 0 8 8 】

「連結されたヌクレオシド」とは、ヌクレオシド間連結部によって一つに連結された隣り合うヌクレオシドを意味する。

【 0 0 8 9 】

「ロック核酸ヌクレオシド」または「LNA」とは、4'-CH₂-O-2'橋を含む二環式糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

20

【 0 0 9 0 】

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

【 0 0 9 1 】

「修飾ヌクレオシド間連結部」とは、天然に存在するヌクレオシド間結合（すなわちホスホジエステルヌクレオシド間結合）からの置換または何らかの改変を指す。

【 0 0 9 2 】

「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意味する。「無修飾核酸塩基」とは、プリン塩基で（A）及びグアニン（G）、ならびにピリミジン塩基であるチミン（T）、シトシン（C）及びウラシル（U）を意味する。

30

【 0 0 9 3 】

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

【 0 0 9 4 】

「修飾ヌクレオチド」とは、修飾糖部分、修飾ヌクレオチド間連結部、または修飾核酸塩基を独立して有するヌクレオチドを意味する。

【 0 0 9 5 】

「修飾オリゴヌクレオチド」とは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間連結部、修飾糖、及び/または修飾核酸塩基を含むオリゴヌクレオチドを意味する。

40

【 0 0 9 6 】

「修飾糖」とは、天然糖部分からの置換及び/または何らかの改変を意味する。

【 0 0 9 7 】

「調節する」とは、細胞、組織、器官または生物における特徴を変化させまたは調整することを指す。例えば、CFB mRNAを調節するとは、細胞、組織、器官、または生物におけるCFB mRNA及び/またはCFB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。「調節因子」は、細胞、組織、器官または生物における変化をもたらす。例えばCFBアンチセンス化合物は、細胞、組織、器官または生物におけるCFB mRNA及び/またはCFBタンパク質の量を減少させる調節因子であることができる。

50

【0098】

「モノマー」とはオリゴマーの一単位を指す。モノマーとしては、天然に存在するものが修飾体かを問わず、ヌクレオシド及びヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0099】

「単環式または多環式の環系」という用語は、単環式または縮合されもしくは連結された多環式のラジカル環系から選択されるすべての環系を包含するものとし、脂肪族、脂環式、アリアル、ヘテロアリアル、アラルキル、アリアルアルキル、複素環式、ヘテロアリアル、ヘテロ芳香族、及びヘテロアリアルアルキルから個別に選択される単一の環系及び混成環系を包含するものとする。そのような単環式及び多環式の構造は、それぞれが同一のレベルの飽和を有する環を含有するか、またはそれぞれが独立して、完全飽和、部分飽和、もしくは完全不飽和を含むさまざまな飽和度を有する環を含有することができる。各環は、複素環式環が生じるように、そしてまた、例えば一方の環が炭素環原子のみを有しかつ縮合している環が2つの窒素原子を有するベンズイミダゾールなどの混合モチーフに存在しうるC環原子のみを含む環が生じるように、C、N、O、及びSから選択される環原子を含むことができる。単環式または多環式の環系は、例えば一方の環に2つの=O基が取り付けられているフタルイミドのように、さらに置換基で置換することができる。単環式または多環式の環系は、環原子を介した直接結合、複数の環原子を介した縮合、置換基を介した結合、または二機能性連結部分を介した結合などといったさまざまな戦略を用いて、親分子に取り付けることができる。

【0100】

「モチーフ」とは、アンチセンス化合物における無修飾ヌクレオシドと修飾ヌクレオシドのパターンを意味する。

【0101】

「天然糖部分」とは、DNA(2'-H)またはRNA(2'-OH)に見いだされる糖部分を意味する。

【0102】

「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。

【0103】

「中性連結基」とは、荷電していない連結基を意味する。中性連結基には、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、MMI(-CH₂-N(CH₃)-O-)、アミド-3(-CH₂-C(=O)-N(H)-)、アミド-4(-CH₂-N(H)-C(=O)-)、ホルムアセタール(-O-CH₂-O-)、及びチオホルムアセタール(-S-CH₂-O-)などがあるが、これらに限定されない。さらに、中性連結基には、シロキサソ(ジアルキルシロキサソ)、カルボン酸エステル、カルボキサミド、硫化物、スルホン酸エステル、及びアミドを含む非イオン性連結部も含まれる(例えば「Carbohydrate Modifications in Antisense Research」Y. S. Sanghvi及びP. D. Cook編, ACS Symposium Series 580; Chapter 3及び4(pp. 40-65)を参照されたい)。さらに、中性連結基には、混合N、O、S、及びCH₂成分パーツを含む非イオン性連結部も含まれる。

【0104】

「非相補的核酸塩基」とは、互いに水素結合を形成せず、他のいかなる形でもハイブリダイゼーションを支持することのない、一对の核酸塩基を指す。

【0105】

「非ヌクレオシド間中性連結基とは、2つのヌクレオシドを直接連結しない中性連結基を意味する。特定の実施形態では、非ヌクレオシド間中性連結基が、ヌクレオシドをヌクレオシド以外の基に連結する。特定の実施形態では、非ヌクレオシド間中性連結基は、どちらもヌクレオシドではない2つの基を連結する。

10

20

30

40

50

【0106】

「非ヌクレオシド間リン連結基」とは、2つのヌクレオシドを直接連結しないリン連結基を意味する。特定の実施形態では、非ヌクレオシド間リン連結基がヌクレオシドをヌクレオシド以外の基に連結する。特定の実施形態では、非ヌクレオシド間リン連結基が、どちらもヌクレオシドではない2つの基を連結する。

【0107】

「核酸」とは、モノマー型ヌクレオチドで構成された分子を指す。核酸には、リボ核酸 (RNA)、デオキシリボ核酸 (DNA)、一本鎖核酸、及び二本鎖核酸などがあるが、これらに限定されない。

【0108】

「核酸塩基」とは、もう一つの核酸の塩基と対合することができる複素環式部分を意味する。

【0109】

「核酸塩基相補性」とは、もう一つの核酸塩基と塩基対合することができる核酸塩基を指す。例えばDNAでは、アデニン (A) がチミン (T) と相補的である。例えばRNAでは、アデニン (A) がウラシル (U) と相補的である。特定の実施形態では、相補的核酸塩基とは、アンチセンス化合物の核酸塩基であって、その標的核酸の核酸塩基と塩基対合することができるものを指す。例えば、あるアンチセンス化合物の特定の位置にある核酸塩基が標的核酸の特定の位置にある核酸塩基と水素結合することができるなら、前記オリゴヌクレオチドと前記標的核酸の水素結合の位置は、それら核酸塩基対において相補的であるとみなされる。

【0110】

「核酸塩基修飾モチーフ」とは、オリゴヌクレオチドに沿った核酸塩基への修飾のパターンを意味する。別段の表示がある場合を除き、核酸塩基修飾モチーフは、核酸塩基配列に依存しない。

【0111】

「核酸塩基配列」とは、連続する核酸塩基の順序を意味し、糖、連結部、及び/または核酸塩基修飾には依存しない。

【0112】

「ヌクレオシド」とは、糖に連結された核酸塩基を意味する。

【0113】

「ヌクレオシド模倣物」には、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などといった、オリゴマー化合物の1つ以上の位置において糖または糖及び塩基を置き換えるため (連結部は必ずしも置き換えられない) に使用される構造が含まれる。ヌクレオチド模倣物には、例えばペプチド核酸またはモルホリノ (- N (H) - C (= O) - O - または他の非ホスホジエステル連結部によって連結されたモルホリノ) などといった、オリゴマー化合物の1つ以上の位置においてヌクレオシド及び連結部を置き換えるために使用される構造が含まれる。糖代用物は、わずかに広い意味を持つ用語であるヌクレオシド模倣物と一部重複するが、糖単位 (フラノース環) のみの置き換えを示すものとする。ここに提供するテトラヒドロピラニル環は、フラノース糖基がテトラヒドロピラニル環系で置き換えられた糖代用物の一例を例示するものである。「模倣物」とは、糖、核酸塩基、及び/またはヌクレオシド間連結部の代わりに使用される基を指す。一般的には、模倣物は、糖または糖 - ニュクレオシド間連結部の組み合わせの代わりに使用され、核酸塩基は、選ばれたターゲットへのハイブリダイゼーションのために維持される。

【0114】

「ヌクレオシドモチーフ」とは、オリゴヌクレオチドまたはその一領域におけるヌクレオシド修飾のパターンを意味する。そのようなオリゴヌクレオチドの連結部は修飾されていても無修飾であってもよい。別段の表示がある場合を除き、ヌクレオシドの説明しかない

10

20

30

40

50

本明細書におけるモチーフは、ヌクレオシドモチーフであるものとする。したがって、そのような事例では、連結部は限定されない。

【0115】

「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの糖部分にリン酸基が共有結合で連結されているヌクレオシドを意味する。

【0116】

「オリゴマー化合物」とは、連結されたモノマー型サブユニットのポリマーであって、核酸分子の少なくとも一領域にハイブリダイズすることができるものを意味する。

【0117】

「オリゴヌクレオチド」とは、ヌクレオシド間連結部がリン原子を含有しないオリゴヌクレオチドを意味する。

10

【0118】

「オリゴヌクレオチド」とは、連結されたヌクレオシドのポリマーを意味し、ヌクレオシドのそれぞれは互いに依存することなく修飾されていても無修飾でもよい。

【0119】

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

【0120】

「医薬組成物」とは、個体への投与に適した物質の混合物を意味する。例えば医薬組成物は1つ以上の活性医薬剤と滅菌水溶液とを含みうる。

20

【0121】

「医薬上許容される塩」とは、アンチセンス化合物の生理学的かつ医薬的に許容される塩、すなわち、親オリゴヌクレオチドの望ましい生物学的活性を保持しており、しかも望ましくない毒性効果をそこに付与しない塩を意味する。

【0122】

「ホスホロチオエート連結部」とは、ホスホジエステル結合が非架橋酸素原子の1つを硫黄原子で置き換えることによって修飾されているヌクレオシド間の連結部を意味する。ホスホロチオエート連結部は修飾ヌクレオシド間連結部である。

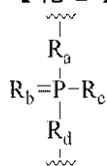
【0123】

「リン連結基」とは、リン原子を含む連結基を意味する。リン連結基には、以下の式を有する基が含まれるが、これに限定されない：

30

【0124】

【化2】



式中、

40

R_a 及び R_d はそれぞれ、独立して、O、S、 CH_2 、NH、または NJ_1 であり、 J_1 は、 $C_1 \sim C_6$ アルキルまたは置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

R_b は、OまたはSであり、

R_c は、OH、SH、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、置換 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、アミノ、または置換アミノであり、

J_1 は、 R_b は、OまたはSである。

リン連結基には、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホラミデート、ホスホロチオアミデート、チオノアルキルホスホネート、ホスホトリエステル、チオノアルキルホスホトリエステル、及びボラノホスフェートが含まれるが、これらに限定されない。

50

【0125】

「一部分 (portion)」とは、核酸の、所定の数の連続する (すなわち連結された) 核酸塩基を意味する。特定の実施形態では、一部分が、標的核酸の、所定の数の連続する核酸塩基である。特定の実施形態では、一部分が、アンチセンス化合物の、所定の数の連続する核酸塩基である。

【0126】

「防止」とは、数分から無限までのある期間にわたって、疾患、障害、または状態の発症、発生または進行を遅延させまたは未然に防ぐことを指す。防止は、疾患、障害、または状態が発生するリスクを低減することも意味する。

【0127】

「プロドラッグ」とは、不活性な形態または活性が低い形態の化合物であって、対象に投与した場合に、代謝されることで活性化またはより活性化化合物 (例えば薬物) を形成するものを意味する。

【0128】

「予防有効量」とは、動物に予防的利益または防止的利益を与える医薬剤の量を指す。

【0129】

「保護基」とは、当業者に知られている任意の化合物または保護基を意味する。保護基の非限定的な例は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる「Protective Groups in Organic Chemistry」T. W. Greene, P. G. M. Wuts, ISBN 0-471-62301-6, John Wiley & Sons, Inc, ニューヨークに見いだすことができる。

【0130】

「領域」は、少なくとも1つの同定可能な構造、機能、または特徴を有する標的核酸の一部と定義される。

【0131】

「リボヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの糖部分の2'位にヒドロキシを有するヌクレオチドを意味する。リボヌクレオチドはさまざまな置換基のいずれでも修飾することができる。

【0132】

「RISCベースのアンチセンス化合物」とは、当該アンチセンス化合物のアンチセンス活性の少なくとも一部がRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) に起因するアンチセンス化合物を意味する。

【0133】

「RNase Hベースのアンチセンス化合物」とは、当該アンチセンス化合物のアンチセンス活性の少なくとも一部が、標的核酸へのアンチセンス化合物のハイブリダイゼーションと、それに続くRNase Hによる標的核酸の切断に起因する、アンチセンス化合物を意味する。

【0134】

「セグメント」は、標的核酸内の領域の、さらに小さな一部分または下位部分と定義される。

【0135】

「別個の領域」とは、オリゴヌクレオチドの複数の部分であって、任意の隣接する部分の化学修飾または化学修飾のモチーフが、当該別個の領域を互いに区別することを可能にする少なくとも1つの相違点を含むものを意味する。

【0136】

「配列モチーフ」とは、オリゴヌクレオチドまたはその一部分に沿って配置された核酸塩基のパターンを意味する。別段の表示がある場合を除き、配列モチーフは化学修飾には依存しないので、化学修飾なしを含めて、化学修飾の任意の組み合わせを有しうる。

【0137】

「副作用」とは、処置に起因する所望の効果以外の生理学的疾患及び/または状態を意味

10

20

30

40

50

する。特定の実施形態では、副作用に、注射部位反応、肝機能検査異常、腎機能検査異常、肝毒性、腎毒性、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、肝毒性または肝機能異常を示しうる。例えば、ビリルビンの増加は、肝毒性及び肝機能異常を示しうる。

【0138】

本明細書にいう「部位」は、標的核酸内のユニークな核酸塩基位置と定義される。

【0139】

「進行を減速する」とは、該疾患の発達の減少を意味する。

【0140】

「特異的にハイブリダイズ可能」とは、アンチセンスオリゴヌクレオチドと標的核酸との間に、特異的結合が望まれる条件下で、すなわちインビボアッセイや治療的処置の場合は生理的条件下で、所望の効果を誘導すると共に非標的核酸には最小限の効果しか呈さないかまたは効果を全く呈さないような、十分な相補度を有するアンチセンス化合物を指す。「ストリンジентなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジентな条件」とは、オリゴマー化合物がそのターゲット配列にはハイブリダイズするが、他の配列にはごくわずかな数の配列にしかハイブリダイズしないような条件を指す。

【0141】

「対象」とは、処置または治療のために選択されたヒトまたはヒト以外の動物を意味する。

【0142】

「置換基 (substituent)」及び「置換基 (substituent group)」とは、指名された親化合物の原子または基を置換する原子または基を意味する。例えば、修飾ヌクレオシドの置換基は、天然に存在するヌクレオシドに見られる原子または基とは異なる任意の原子または基である (例えば修飾 2' - 置換基はヌクレオシドの 2' 位にある H または OH 以外の任意の原子または基である)。置換基は、保護されていても保護されていなくてもよい。特定の実施形態では、本開示の化合物は、親化合物の 1 つの位置または 2 つ以上の位置に置換基を有する。置換基は、他の置換基でさらに置換されていてもよく、親化合物に直接取り付けるか、またはアルキル基もしくはヒドロカルビル基などの連結基を介して取り付けることができる。

【0143】

同様に、本明細書において使用する場合、化学官能基に関して「置換基」とは、指名された官能基に通常存在する原子または原子団とは異なる原子または原子団を意味する。特定の実施形態では、置換基が官能基の水素原子を置き換える (例えば特定の実施形態では、置換メチル基の置換基は、無置換メチル基の水素原子のうちの 1 つを置き換える水素以外の原子または基である)。別段の表示がある場合を除き、置換基としての使用に適する基には、ハロゲン、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル (-C(O)Raa)、カルボキシル (-C(O)O-Raa)、脂肪族基、脂環式基、アルコキシ、置換オキシ (-O-Raa)、アリール、アラルキル、複素環式ラジカル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、アミノ (N(Rbb)(Rcc))、イミノ (=NRbb)、アミド (C(O)N(Rbb)(Rcc) または N(Rbb)C(O)Raa)、アジド (-N3)、ニトロ (NO2)、シアノ (-CN)、カルバミド (OC(O)N(Rbb)(Rcc) または N(Rbb)C(O)ORaa)、ウレイド (N(Rbb)C(O)N(Rbb)(Rcc))、チオウレイド (N(Rbb)C(S)N(Rbb)(Rcc))、グアニジニル (N(Rbb)C(=NRbb)N(Rbb)(Rcc))、アミジニル (C(=NRbb)N(Rbb)(Rcc) または N(Rbb)C(=NRbb)(Raa))、チオール (-SRbb)、スルフィニル (S(O)Rbb)、スルホニル (-S(O)2Rbb)、及びスルホンアミジル (-S(O)2N(Rbb)(Rcc) または N(Rbb)S(O)2Rbb) が含まれるが、これらに限定されない。式中、各 Raa、Rbb、及び Rcc は、独立して、H、場合によっては連結された化学官能基、またはさらなる置換基であり、好ましいものとしては、アルキル、アルケニル、アルキニル、脂肪族、アルコキシ、アシル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、脂環式

10

20

30

40

50

、複素環式、及びヘテロアリールアルキルが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載する化合物内の選ばれた置換基は、再帰的に (t o a r e c u r s i v e d e g r e e) 存在する。

【0144】

「置換糖部分」とは、天然に存在する糖部分ではないフラノシルを意味する。置換糖部分には、2'位、3'位、5'位及び/または4'位に置換基を含むフラノシルなどがあるが、これらに限定されない。特定の置換糖部分は二環式糖部分である。

【0145】

「糖部分」とは、ヌクレオシドの天然に存在する糖部分または修飾糖部分を意味する。

【0146】

「糖モチーフ」とは、オリゴヌクレオチドまたはその一領域における糖修飾のパターンを意味する。

【0147】

「糖代用物」とは、フラノシルを含まない構造であって、しかも、結果として生じるヌクレオチドサブユニットを一つに連結しかつ/または他のヌクレオチドに連結することで相補的なオリゴマー化合物にハイブリダイズすることができるオリゴマー化合物を形成することができるように、ヌクレオチドの天然に存在する糖部分を置き換えることができる構造を意味する。そのような構造には、フラノシルとは異なる数の原子を含むか(例えば4、6、または7員環)、または非酸素原子(例えば炭素、硫黄、もしくは窒素)によるフラノシルの酸素の置き換え、または原子数の変化と酸素の置き換えとの両方が含まれる。そのような構造は、置換糖部分(例えば場合によってはさらなる置換基を含む6員炭素環式二環式糖代用物)について記載したものに対応する置換も含みうる。糖代用物は、さらに複雑な糖の代替物(例えばペプチド核酸の非環系)も包含する。糖代用物には、モルホリノ、シクロヘキセニル及びシクロヘキシトールなどがあるが、これらに限定されない。

【0148】

「標的」とは、調節することが望まれるタンパク質を指す。

【0149】

「標的遺伝子」とは、標的をコードする遺伝子を指す。

【0150】

「ターゲティング」とは、標的核酸に特異的にハイブリダイズして所望の効果を誘導することになるアンチセンス化合物を設計及び選択するプロセスを意味する。

【0151】

「標的核酸」、「標的RNA」、「標的RNA転写産物」及び「核酸標的」は、いずれも、アンチセンス化合物の標的となりうる核酸を意味する。

【0152】

「標的領域」とは、標的核酸のうち、1つ以上のアンチセンス化合物の標的となる部分を意味する。

【0153】

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

【0154】

「末端基」とは、オリゴヌクレオチドの3'末端もしくは5'末端のいずれか、またはそれらの両方に取り付けられた1つ以上の原子を意味する。特定の実施形態では、末端基が共役基である。特定の実施形態では、末端基が1つ以上の末端基ヌクレオチドを含む。

【0155】

「末端ヌクレオチド間連結部」とは、オリゴヌクレオチドまたはその所定の領域の少なくとも2つのヌクレオチド間の連結部を意味する。

【0156】

「治療有効量」とは、個体に治療的利益を与える医薬剤の量を意味する。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 7 】

「処置する」とは、動物における疾患、障害、または状態の改変または改善を達成するために、前記動物に医薬組成物を投与することを指す。特定の実施形態では、1つ以上の医薬組成物を前記動物に投与することができる。

【 0 1 5 8 】

「無修飾」核酸塩基とは、プリン塩基であるアデニン（A）及びグアニン（G）、ならびにピリミジン塩基であるチミン（T）、シトシン（C）及びウラシル（U）を意味する。

【 0 1 5 9 】

「無修飾ヌクレオチド」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連結部で構成されるヌクレオシドを意味する。特定の実施形態では、無修飾ヌクレオチドがRNAヌクレオチド（すなわち - D - リボヌクレオチド）またはDNAヌクレオチド（すなわち - D - デオキシリボヌクレオチド）である。

10

【 0 1 6 0 】

特定の実施形態

特定の実施形態は、補体B因子（CFB）発現を阻害するための方法、化合物及び組成物を提供する。

【 0 1 6 1 】

特定の実施形態は、CFB核酸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、前記CFB核酸が、GENBANKアクセッション番号NM_001710.5（配列番号1として本明細書に組み込まれる）、ヌクレオチド31852000から31861000までを切り出したGENBANKアクセッション番号NT_007592.15（配列番号2として本明細書に組み込まれる）、ヌクレオチド536000から545000までを切り出したGENBANKアクセッション番号NW_001116486.1（配列番号3として本明細書に組み込まれる）、GENBANKアクセッション番号XM_001113553.2（配列番号4として本明細書に組み込まれる）、またはGENBANKアクセッション番号NM_008198.2（配列番号5として本明細書に組み込まれる）に示される配列を有する。

20

【 0 1 6 2 】

特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが10～30個の連結されたヌクレオチドからなり、配列番号6～808の核酸塩基配列のいずれかのうちの少なくとも8個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するものを提供する。

30

【 0 1 6 3 】

特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが10～30個の連結されたヌクレオチドからなり、配列番号6～808の核酸塩基配列のいずれかのうちの少なくとも9個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するものを提供する。

【 0 1 6 4 】

特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが10～30個の連結されたヌクレオチドからなり、配列番号6～808の核酸塩基配列のいずれかのうちの少なくとも10個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するものを提供する。

40

【 0 1 6 5 】

特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが10～30個の連結されたヌクレオチドからなり、配列番号6～808の核酸塩基配列のいずれかのうちの少なくとも11個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するものを提供する。

【 0 1 6 6 】

特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが10～30個の連結されたヌクレオチドからなり、配列番号6～8

50

08の核酸塩基配列のいずれかのうちの少なくとも12個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するものを提供する。

【0167】

特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが10～30個の連結されたヌクレオチドからなり、配列番号6～808のいずれか一つの核酸塩基配列を含む核酸塩基配列を有するものを提供する。

【0168】

特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが配列番号6～808のいずれか一つの核酸塩基配列からなるものを提供する。

【0169】

特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号1の核酸塩基30～49、48～63、150～169、151～170、152～171、154～169、154～173、156～171、156～175、157～176、158～173、158～177、480～499、600～619、638～657、644～663、738～757、1089～1108、1135～1154、1141～1160、1147～1166、1150～1169、1153～1172、1159～1178、1162～1181、1165～1184、1171～1186、1171～1190、1173～1188、1173～1192、1175～1190、1175～1194、1177～1196、1183～1202、1208～1227、1235～1254、1298～1317、1304～1323、1310～1329、1316～1335、1319～1338、1322～1341、1328～1347、1349～1368、1355～1374、1393～1412、1396～1415、1399～1418、1405～1424、1421～1440、1621～1640、1646～1665、1646～1665、1647～1666、1689～1708、1749～1768、1763～1782、1912～1931、2073～2092、2085～2104、2166～2185、2172～2191、2189～2208、2191～2210、2193～2212、2195～2210、2195～2214、2196～2215、2197～2212、2197～2216、2202～2221、2223～2238、2223～2242、2225～2240、2226～2245、2227～2242、2227～2246、2238～2257、2241～2260、2267～2286、2361～2380、2388～2407、2397～2416、2448～2467、2453～2472、2455～2474、2457～2472、2457～2476、2459～2474、2459～2478、2461～2476、2461～2480、2532～2551、2550～2569、2551～2566、2551～2570、2552～2568、2552～2570、2552～2571、2553～2568、2553～2570、2553～2571、2553～2572、2554～2571、2554～2572、2554～2573、2555～2570、2555～2572、2555～2574、2556～2573、2556～2574、2556～2575、2557～2573、2557～2574、2557～2575、2557～2576、2558～2575、2558～2576、2558～2577、2559～2576、2559～2577、2559～2578、2560～2577、2560～2578、2560～2579、2561～2576、2561～2578、2561～2579、2561～2580、2562～2577、2562～2579、2562～2581、2563～2578、2563～2580、2563～2582、2564～2581、2564～2583、2565～2584、2566～2583、2566～2585、2567～2582、2567～2584、2567～2586、2568～2583、2568～2585、2568～2587、2569～2586、2569～2588、2570～2585、2570～2587、2570～2589、2571～2586、2571～2588、2571～2589

10

20

30

40

50

9 0、2 5 7 2 ~ 2 5 8 9、2 5 7 2 ~ 2 5 9 0、2 5 7 2 ~ 2 5 9 1、2 5 7 3 ~ 2 5
 9 0、2 5 7 3 ~ 2 5 9 2、2 5 7 4 ~ 2 5 9 0、2 5 7 4 ~ 2 5 9 1、2 5 7 4 ~ 2
 5 9 3、2 5 7 5 ~ 2 5 9 0、2 5 7 5 ~ 2 5 9 1、2 5 7 5 ~ 2 5 9 2、2 5 7 5 ~ 2
 5 9 4、2 5 7 6 ~ 2 5 9 3、2 5 7 6 ~ 2 5 9 5、2 5 7 7 ~ 2 5 9 4、2 5 7 7 ~ 2
 5 9 5、2 5 7 7 ~ 2 5 9 6、2 5 7 8 ~ 2 5 9 4、2 5 7 8 ~ 2 5 9 6、2 5 7 8 ~ 2
 5 9 7、2 5 7 9 ~ 2 5 9 8、2 5 8 0 ~ 2 5 9 6、2 5 8 0 ~ 2 5 9 7、2 5 8 0 ~ 2
 5 9 8、2 5 8 0 ~ 2 5 9 9、2 5 8 1 ~ 2 5 9 7、2 5 8 1 ~ 2 5 9 8、2 5 8 1 ~ 2
 5 9 9、2 5 8 1 ~ 2 6 0 0、2 5 8 2 ~ 2 5 9 8、2 5 8 2 ~ 2 5 9 9、2 5 8 2 ~ 2
 6 0 0、2 5 8 2 ~ 2 6 0 1、2 5 8 3 ~ 2 5 9 9、2 5 8 3 ~ 2 6 0 0、2 5 8 3 ~ 2
 6 0 1、2 5 8 3 ~ 2 6 0 2、2 5 8 4 ~ 2 6 0 0、2 5 8 4 ~ 2 6 0 1、2 5 8 4 ~ 2
 6 0 2、2 5 8 4 ~ 2 6 0 3、2 5 8 5 ~ 2 6 0 1、2 5 8 5 ~ 2 6 0 3、2 5 8 5 ~ 2
 6 0 4、2 5 8 6 ~ 2 6 0 1、2 5 8 6 ~ 2 6 0 2、2 5 8 6 ~ 2 6 0 4、2 5 8 6 ~ 2
 6 0 5、2 5 8 7 ~ 2 6 0 2、2 5 8 7 ~ 2 6 0 3、2 5 8 7 ~ 2 6 0 5、2 5 8 7 ~ 2
 6 0 6、2 5 8 8 ~ 2 6 0 3、2 5 8 8 ~ 2 6 0 4、2 5 8 8 ~ 2 6 0 5、2 5 8 8 ~ 2
 6 0 6、2 5 8 8 ~ 2 6 0 7、2 5 8 9 ~ 2 6 0 4、2 5 8 9 ~ 2 6 0 5、2 5 8 9 ~ 2
 6 0 6、2 5 8 9 ~ 2 6 0 7、2 5 8 9 ~ 2 6 0 8、2 5 9 0 ~ 2 6 0 5、2 5 9 0 ~ 2
 6 0 6、2 5 9 0 ~ 2 6 0 7、2 5 9 0 ~ 2 6 0 8、2 5 9 0 ~ 2 6 0 9、2 5 9 0 ~ 2
 6 0 9、2 5 9 1 ~ 2 6 0 7、2 5 9 1 ~ 2 6 0 8、2 5 9 1 ~ 2 6 0 9、2 5 9 1 ~ 2
 6 1 0、2 5 9 2 ~ 2 6 0 7、2 5 9 2 ~ 2 6 0 8、2 5 9 2 ~ 2 6 0 9、2 5 9 2 ~ 2
 6 1 0、2 5 9 2 ~ 2 6 1 1、2 5 9 3 ~ 2 6 0 8、2 5 9 3 ~ 2 6 0 9、2 5 9 3 ~ 2
 6 1 0、2 5 9 3 ~ 2 6 1 2、2 5 9 4 ~ 2 6 0 9、2 5 9 4 ~ 2 6 1 0、2 5 9 4 ~ 2
 6 1 1、2 5 9 4 ~ 2 6 1 2、2 5 9 4 ~ 2 6 1 3、2 5 9 5 ~ 2 6 1 0、2 5 9 5 ~ 2
 6 1 1、2 5 9 5 ~ 2 6 1 2、2 5 9 5 ~ 2 6 1 3、2 5 9 5 ~ 2 6 1 4、2 5 9 6 ~ 2
 6 1 1、2 5 9 6 ~ 2 6 1 2、2 5 9 6 ~ 2 6 1 3、2 5 9 6 ~ 2 6 1 4、2 5 9 6 ~ 2
 6 1 5、2 5 9 7 ~ 2 6 1 2、2 5 9 7 ~ 2 6 1 2、2 5 9 7 ~ 2 6 1 3、2 5 9 7 ~ 2
 6 1 4、2 5 9 7 ~ 2 6 1 5、2 5 9 7 ~ 2 6 1 6、2 5 9 8 ~ 2 6 1 3、2 5 9 8 ~ 2
 6 1 4、2 5 9 8 ~ 2 6 1 5、2 5 9 8 ~ 2 6 1 6、2 5 9 8 ~ 2 6 1 7、2 5 9 9 ~ 2
 6 1 4、2 5 9 9 ~ 2 6 1 5、2 5 9 9 ~ 2 6 1 6、2 5 9 9 ~ 2 6 1 7、2 5 9 9 ~ 2
 6 1 8、2 6 0 0 ~ 2 6 1 5、2 6 0 0 ~ 2 6 1 6、2 6 0 0 ~ 2 6 1 7、2 6 0 0 ~ 2
 6 1 8、2 6 0 0 ~ 2 6 1 9、2 6 0 1 ~ 2 6 1 6、2 6 0 1 ~ 2 6 1 7、2 6 0 1 ~ 2
 6 1 8、2 6 0 1 ~ 2 6 1 9、2 6 0 1 ~ 2 6 2 0、2 6 0 2 ~ 2 6 1 7、2 6 0 2 ~ 2
 6 1 8、2 6 0 2 ~ 2 6 1 9、2 6 0 2 ~ 2 6 2 0、2 6 0 2 ~ 2 6 2 1、2 6 0 3 ~ 2
 6 1 8、2 6 0 3 ~ 2 6 1 9、2 6 0 3 ~ 2 6 2 0、2 6 0 3 ~ 2 6 2 1、2 6 0 3 ~ 2
 6 2 2、2 6 0 4 ~ 2 6 1 9、2 6 0 4 ~ 2 6 2 0、2 6 0 4 ~ 2 6 2 1、2 6 0 4 ~ 2
 6 2 2、2 6 0 4 ~ 2 6 2 3、2 6 0 5 ~ 2 6 2 0、2 6 0 5 ~ 2 6 2 1、2 6 0 5 ~ 2
 6 2 2、2 6 0 5 ~ 2 6 2 3、2 6 0 5 ~ 2 6 2 4、2 6 0 6 ~ 2 6 2 1、2 6 0 6 ~ 2
 6 2 2、2 6 0 6 ~ 2 6 2 3、2 6 0 6 ~ 2 6 2 4、2 6 0 6 ~ 2 6 2 5、2 6 0 7 ~ 2
 6 2 2、2 6 0 7 ~ 2 6 2 3、2 6 0 7 ~ 2 6 2 4、2 6 0 7 ~ 2 6 2 5、2 6 0 7 ~ 2
 6 2 6、2 6 0 8 ~ 2 6 2 3、2 6 0 8 ~ 2 6 2 4、2 6 0 8 ~ 2 6 2 5、2 6 0 8 ~ 2
 6 2 6、2 6 0 8 ~ 2 6 2 7、2 6 0 9 ~ 2 6 2 4、2 6 0 9 ~ 2 6 2 5、2 6 0 9 ~ 2
 6 2 6、2 6 0 9 ~ 2 6 2 7、2 6 0 9 ~ 2 6 2 8、2 6 1 0 ~ 2 6 2 5、2 6 1 0 ~ 2
 6 2 6、2 6 1 0 ~ 2 6 2 7、2 6 1 0 ~ 2 6 2 8、2 6 1 0 ~ 2 6 2 9、2 6 1 1 ~ 2
 6 2 6、2 6 1 1 ~ 2 6 2 7、2 6 1 1 ~ 2 6 2 8、2 6 1 1 ~ 2 6 2 9、2 6 1 1 ~ 2
 6 3 0、2 6 1 2 ~ 2 6 2 7、2 6 1 2 ~ 2 6 2 8、2 6 1 2 ~ 2 6 2 9、2 6 1 2 ~ 2
 6 3 0、2 6 1 2 ~ 2 6 3 1、2 6 1 3 ~ 2 6 2 8、2 6 1 3 ~ 2 6 2 9、2 6 1 3 ~ 2
 6 3 0、2 6 1 3 ~ 2 6 3 1、2 6 1 4 ~ 2 6 2 9、2 6 1 4 ~ 2 6 3 0、2 6 1 4 ~ 2
 6 3 1、2 6 1 5 ~ 2 6 3 0、2 6 1 5 ~ 2 6 3 1、または2 6 1 6 ~ 2 6 3 1内で相補
 的な1 0 ~ 3 0個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ該修飾オリゴヌクレオチドが
 、配列番号1に対して少なくとも8 5 %、少なくとも9 0 %、少なくとも9 5 %、または
 1 0 0 %相補的であるものを提供する。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 0 】

特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチドと共役基を含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号1の核酸塩基30～49、48～63、150～169、151～170、152～171、154～169、154～173、156～171、156～175、157～176、158～173、158～177、480～499、600～619、638～657、644～663、738～757、1089～1108、1135～1154、1141～1160、1147～1166、1150～1169、1153～1172、1159～1178、1162～1181、1165～1184、1171～1186、1171～1190、1173～1188、1173～1192、1175～1190、1175～1194、1177～1196、1183～1202、1208～1227、1235～1254、1298～1317、1304～1323、1310～1329、1316～1335、1319～1338、1322～1341、1328～1347、1349～1368、1355～1374、1393～1412、1396～1415、1399～1418、1405～1424、1421～1440、1621～1640、1646～1665、1646～1665、1647～1666、1689～1708、1749～1768、1763～1782、1912～1931、2073～2092、2085～2104、2166～2185、2172～2191、2189～2208、2191～2210、2193～2212、2195～2210、2195～2214、2196～2215、2197～2212、2197～2216、2202～2221、2223～2238、2223～2242、2225～2240、2226～2245、2227～2242、2227～2246、2238～2257、2241～2260、2267～2286、2361～2380、2388～2407、2397～2416、2448～2467、2453～2472、2455～2474、474、2457～2472、2457～2476、2459～2474、2459～2478、2461～2476、2461～2480、2532～2551、2550～2569、2551～2566、2551～2570、2552～2568、2552～2570、2552～2571、2553～2568、2553～2570、2553～2571、2553～2572、2554～2571、2554～2572、2554～2573、2555～2570、2555～2572、2555～2574、2556～2573、2573、2556～2574、2556～2575、2557～2573、2557～2574、2557～2575、2557～2576、2558～2575、2558～2576、2558～2577、2559～2576、2559～2577、2559～2578、2560～2577、2560～2578、2560～2579、2561～2576、2561～2578、2561～2579、2561～2580、2562～2577、2577、2562～2579、2562～2581、2563～2578、2563～2580、2563～2582、2564～2581、2564～2583、2565～2584、2566～2583、2566～2585、2567～2582、2567～2584、2567～2586、2568～2583、2568～2585、2568～2587、2569～2586、2569～2588、2570～2585、2570～2587、2570～2589、2571～2586、2571～2588、2571～2590、2572～2589、2572～2590、2572～2591、2573～2590、2573～2592、2574～2590、2574～2591、2574～2593、2575～2590、2575～2591、2575～2592、2575～2594、2576～2593、2576～2595、2577～2594、2577～2595、2577～2596、2578～2594、2578～2596、2578～2597、2579～2598、2580～2596、2580～2597、2580～2598、2581～2599、2581～2597、2581～2598、2581～2600、2582～2598、2582～2599、2582～2600、2583～2599、2583～2600、2583～2601、2583～2602、2584～2600、2584～2601、2584～2602

10

20

30

40

50

6 0 2、2 5 8 4 ~ 2 6 0 3、2 5 8 5 ~ 2 6 0 1、2 5 8 5 ~ 2 6 0 3、2 5 8 5 ~ 2
6 0 4、2 5 8 6 ~ 2 6 0 1、2 5 8 6 ~ 2 6 0 2、2 5 8 6 ~ 2 6 0 4、2 5 8 6 ~ 2
6 0 5、2 5 8 7 ~ 2 6 0 2、2 5 8 7 ~ 2 6 0 3、2 5 8 7 ~ 2 6 0 5、2 5 8 7 ~ 2
6 0 6、2 5 8 8 ~ 2 6 0 3、2 5 8 8 ~ 2 6 0 4、2 5 8 8 ~ 2 6 0 5、2 5 8 8 ~ 2
6 0 6、2 5 8 8 ~ 2 6 0 7、2 5 8 9 ~ 2 6 0 4、2 5 8 9 ~ 2 6 0 5、2 5 8 9 ~ 2
6 0 6、2 5 8 9 ~ 2 6 0 7、2 5 8 9 ~ 2 6 0 8、2 5 9 0 ~ 2 6 0 5、2 5 9 0 ~ 2
6 0 6、2 5 9 0 ~ 2 6 0 7、2 5 9 0 ~ 2 6 0 8、2 5 9 0 ~ 2 6 0 9、2 5 9 0 ~ 2
6 0 9、2 5 9 1 ~ 2 6 0 7、2 5 9 1 ~ 2 6 0 8、2 5 9 1 ~ 2 6 0 9、2 5 9 1 ~ 2
6 1 0、2 5 9 2 ~ 2 6 0 7、2 5 9 2 ~ 2 6 0 8、2 5 9 2 ~ 2 6 0 9、2 5 9 2 ~ 2
6 1 0、2 5 9 2 ~ 2 6 1 1、2 5 9 3 ~ 2 6 0 8、2 5 9 3 ~ 2 6 0 9、2 5 9 3 ~ 2
6 1 0、2 5 9 3 ~ 2 6 1 2、2 5 9 4 ~ 2 6 0 9、2 5 9 4 ~ 2 6 1 0、2 5 9 4 ~ 2
6 1 1、2 5 9 4 ~ 2 6 1 2、2 5 9 4 ~ 2 6 1 3、2 5 9 5 ~ 2 6 1 0、2 5 9 5 ~ 2
6 1 1、2 5 9 5 ~ 2 6 1 2、2 5 9 5 ~ 2 6 1 3、2 5 9 5 ~ 2 6 1 4、2 5 9 6 ~ 2
6 1 1、2 5 9 6 ~ 2 6 1 2、2 5 9 6 ~ 2 6 1 3、2 5 9 6 ~ 2 6 1 4、2 5 9 6 ~ 2
6 1 5、2 5 9 7 ~ 2 6 1 2、2 5 9 7 ~ 2 6 1 2、2 5 9 7 ~ 2 6 1 3、2 5 9 7 ~ 2
6 1 4、2 5 9 7 ~ 2 6 1 5、2 5 9 7 ~ 2 6 1 6、2 5 9 8 ~ 2 6 1 3、2 5 9 8 ~ 2
6 1 4、2 5 9 8 ~ 2 6 1 5、2 5 9 8 ~ 2 6 1 6、2 5 9 8 ~ 2 6 1 7、2 5 9 9 ~ 2
6 1 4、2 5 9 9 ~ 2 6 1 5、2 5 9 9 ~ 2 6 1 6、2 5 9 9 ~ 2 6 1 7、2 5 9 9 ~ 2
6 1 8、2 6 0 0 ~ 2 6 1 5、2 6 0 0 ~ 2 6 1 6、2 6 0 0 ~ 2 6 1 7、2 6 0 0 ~ 2
6 1 8、2 6 0 0 ~ 2 6 1 9、2 6 0 1 ~ 2 6 1 6、2 6 0 1 ~ 2 6 1 7、2 6 0 1 ~ 2
6 1 8、2 6 0 1 ~ 2 6 1 9、2 6 0 1 ~ 2 6 2 0、2 6 0 2 ~ 2 6 1 7、2 6 0 2 ~ 2
6 1 8、2 6 0 2 ~ 2 6 1 9、2 6 0 2 ~ 2 6 2 0、2 6 0 2 ~ 2 6 2 1、2 6 0 3 ~ 2
6 1 8、2 6 0 3 ~ 2 6 1 9、2 6 0 3 ~ 2 6 2 0、2 6 0 3 ~ 2 6 2 1、2 6 0 3 ~ 2
6 2 2、2 6 0 4 ~ 2 6 1 9、2 6 0 4 ~ 2 6 2 0、2 6 0 4 ~ 2 6 2 1、2 6 0 4 ~ 2
6 2 2、2 6 0 4 ~ 2 6 2 3、2 6 0 5 ~ 2 6 2 0、2 6 0 5 ~ 2 6 2 1、2 6 0 5 ~ 2
6 2 2、2 6 0 5 ~ 2 6 2 3、2 6 0 5 ~ 2 6 2 4、2 6 0 6 ~ 2 6 2 1、2 6 0 6 ~ 2
6 2 2、2 6 0 6 ~ 2 6 2 3、2 6 0 6 ~ 2 6 2 4、2 6 0 6 ~ 2 6 2 5、2 6 0 7 ~ 2
6 2 2、2 6 0 7 ~ 2 6 2 3、2 6 0 7 ~ 2 6 2 4、2 6 0 7 ~ 2 6 2 5、2 6 0 7 ~ 2
6 2 6、2 6 0 8 ~ 2 6 2 3、2 6 0 8 ~ 2 6 2 4、2 6 0 8 ~ 2 6 2 5、2 6 0 8 ~ 2
6 2 6、2 6 0 8 ~ 2 6 2 7、2 6 0 9 ~ 2 6 2 4、2 6 0 9 ~ 2 6 2 5、2 6 0 9 ~ 2
6 2 6、2 6 0 9 ~ 2 6 2 7、2 6 0 9 ~ 2 6 2 8、2 6 1 0 ~ 2 6 2 5、2 6 1 0 ~ 2
6 2 6、2 6 1 0 ~ 2 6 2 7、2 6 1 0 ~ 2 6 2 8、2 6 1 0 ~ 2 6 2 9、2 6 1 1 ~ 2
6 2 6、2 6 1 1 ~ 2 6 2 7、2 6 1 1 ~ 2 6 2 8、2 6 1 1 ~ 2 6 2 9、2 6 1 1 ~ 2
6 3 0、2 6 1 2 ~ 2 6 2 7、2 6 1 2 ~ 2 6 2 8、2 6 1 2 ~ 2 6 2 9、2 6 1 2 ~ 2
6 3 0、2 6 1 2 ~ 2 6 3 1、2 6 1 3 ~ 2 6 2 8、2 6 1 3 ~ 2 6 2 9、2 6 1 3 ~ 2
6 3 0、2 6 1 3 ~ 2 6 3 1、2 6 1 4 ~ 2 6 2 9、2 6 1 4 ~ 2 6 3 0、2 6 1 4 ~ 2
6 3 1、2 6 1 5 ~ 2 6 3 0、2 6 1 5 ~ 2 6 3 1、または2 6 1 6 ~ 2 6 3 1のうちの
長さが等しい部分に相補的な少なくとも8個の連続する核酸塩基部分を含む核酸塩基配列
を有する10~30個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ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に対して少なくとも85%、少なくとも90%、少な
くとも95%、または100%相補的であるものを提供する。

【0171】

特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾
オリゴヌクレオチドが、配列番号2の核酸塩基1608~1627、1685~1704
、1686~1705、1751~1770、1769~1784、1871~1890
、1872~1891、1873~1892、1875~1890、1875~1894
、1877~1892、1877~1896、1878~1897、1879~1894
、1879~1898、2288~2307、2808~2827、2846~2865
、2852~2871、2946~2965、3773~3792、3819~3838
、3825~3844、3831~3850、3834~3853、3837~3856

10

20

30

40

50

、 3 8 4 3 ~ 3 8 6 2、 4 1 5 1 ~ 4 1 6 6、 4 1 5 1 ~ 4 1 7 0、 4 1 5 3 ~ 4 1 7 2
、 4 1 5 9 ~ 4 1 7 8、 4 1 8 4 ~ 4 2 0 3、 4 2 1 1 ~ 4 2 3 0、 4 6 0 9 ~ 4 6 2
8、 4 6 1 2 ~ 4 6 3 1、 4 6 1 5 ~ 4 6 3 4、 4 6 2 1 ~ 4 6 4 0、 4 6 4 2 ~ 4 6 6
1、 4 6 4 8 ~ 4 6 6 7、 4 6 8 6 ~ 4 7 0 5、 4 6 8 9 ~ 4 7 0 8、 4 6 9 2 ~ 4 7 1
1、 4 6 9 8 ~ 4 7 1 7、 4 7 1 4 ~ 4 7 3 3、 5 2 7 0 ~ 5 2 8 9、 5 2 9 5 ~ 5 3 1
4、 5 2 9 6 ~ 5 3 1 5、 5 8 3 0 ~ 5 8 4 9、 5 8 9 0 ~ 5 9 0 9、 5 9 0 4 ~ 5 9 2
3、 6 4 0 6 ~ 6 4 2 5、 6 6 6 2 ~ 6 6 8 1、 6 6 7 4 ~ 6 6 9 3、 6 9 5 4 ~ 6 9 7
3、 6 9 6 0 ~ 6 9 7 9、 6 9 7 7 ~ 6 9 9 6、 6 9 7 9 ~ 6 9 9 8、 6 9 8 1 ~ 7 0 0
0、 6 9 8 3 ~ 6 9 9 8、 6 9 8 3 ~ 7 0 0 2、 6 9 8 4 ~ 7 0 0 3、 6 9 8 5 ~ 7 0 0
0、 6 9 8 5 ~ 7 0 0 4、 6 9 9 0 ~ 7 0 0 9、 7 1 2 2 ~ 7 1 4 1、 7 1 2 5 ~ 7 1 4
4、 7 1 5 1 ~ 7 1 7 0、 7 3 5 3 ~ 7 3 7 2、 7 3 6 2 ~ 7 3 8 1、 7 6 8 3 ~ 7 7 0
2、 7 6 8 8 ~ 7 7 0 7、 7 6 9 0 ~ 7 7 0 9、 7 6 9 2 ~ 7 7 0 7、 7 6 9 2 ~ 7 7 1
1、 7 6 9 4 ~ 7 7 0 9、 7 6 9 4 ~ 7 7 1 3、 7 6 9 6 ~ 7 7 1 1、 7 6 9 6 ~ 7 7 1
5、 7 7 6 7 ~ 7 7 8 6、 7 7 8 5 ~ 7 8 0 4、 7 7 8 6 ~ 7 8 0 1、 7 7 8 7 ~ 7 8 0
3、 7 7 8 7 ~ 7 8 0 5、 7 7 8 7 ~ 7 8 0 6、 7 7 8 8 ~ 7 8 0 3、 7 7 8 8 ~ 7 8 0
5、 7 7 8 8 ~ 7 8 0 6、 7 7 8 8 ~ 7 8 0 7、 7 7 8 9 ~ 7 8 0 6、 7 7 8 9 ~ 7 8 0
7、 7 7 8 9 ~ 7 8 0 8、 7 7 9 0 ~ 7 8 0 5、 7 7 9 0 ~ 7 8 0 7、 7 7 9 0 ~ 7 8 0
9、 7 7 9 1 ~ 7 8 0 8、 7 7 9 1 ~ 7 8 0 9、 7 7 9 1 ~ 7 8 1 0、 7 7 9 2 ~ 7 8 0
8、 7 7 9 2 ~ 7 8 0 9、 7 7 9 2 ~ 7 8 1 0、 7 7 9 2 ~ 7 8 1 1、 7 7 9 3 ~ 7 8 1
0、 7 7 9 3 ~ 7 8 1 1、 7 7 9 3 ~ 7 8 1 2、 7 7 9 4 ~ 7 8 1 1、 7 7 9 4 ~ 7 8 1
2、 7 7 9 4 ~ 7 8 1 3、 7 7 9 5 ~ 7 8 1 2、 7 7 9 5 ~ 7 8 1 3、 7 7 9 5 ~ 7 8 1
4、 7 7 9 6 ~ 7 8 1 1、 7 7 9 6 ~ 7 8 1 3、 7 7 9 6 ~ 7 8 1 4、 7 7 9 6 ~ 7 8 1
5、 7 7 9 7 ~ 7 8 1 2、 7 7 9 7 ~ 7 8 1 4、 7 7 9 7 ~ 7 8 1 6、 7 7 9 8 ~ 7 8 1
3、 7 7 9 8 ~ 7 8 1 5、 7 7 9 8 ~ 7 8 1 7、 7 7 9 9 ~ 7 8 1 6、 7 7 9 9 ~ 7 8 1
8、 7 8 0 0 ~ 7 8 1 9、 7 8 0 1 ~ 7 8 1 8、 7 8 0 1 ~ 7 8 2 0、 7 8 0 2 ~ 7 8 1
7、 7 8 0 2 ~ 7 8 1 9、 7 8 0 2 ~ 7 8 2 1、 7 8 0 3 ~ 7 8 1 8、 7 8 0 3 ~ 7 8 2
0、 7 8 0 3 ~ 7 8 2 2、 7 8 0 4 ~ 7 8 2 1、 7 8 0 4 ~ 7 8 2 3、 7 8 0 5 ~ 7 8 2
0、 7 8 0 5 ~ 7 8 2 2、 7 8 0 5 ~ 7 8 2 4、 7 8 0 6 ~ 7 8 2 1、 7 8 0 6 ~ 7 8 2
3、 7 8 0 6 ~ 7 8 2 5、 7 8 0 7 ~ 7 8 2 4、 7 8 0 7 ~ 7 8 2 5、 7 8 0 7 ~ 7 8 2
6、 7 8 0 8 ~ 7 8 2 5、 7 8 0 8 ~ 7 8 2 7、 7 8 0 9 ~ 7 8 2 5、 7 8 0 9 ~ 7 8 2
6、 7 8 0 9 ~ 7 8 2 8、 7 8 1 0 ~ 7 8 2 5、 7 8 1 0 ~ 7 8 2 6、 7 8 1 0 ~ 7 8 2
7、 7 8 1 0 ~ 7 8 2 9、 7 8 1 1 ~ 7 8 2 8、 7 8 1 1 ~ 7 8 3 0、 7 8 1 2 ~ 7 8 2
9、 7 8 1 2 ~ 7 8 3 0、 7 8 1 2 ~ 7 8 3 1、 7 8 1 3 ~ 7 8 2 9、 7 8 1 3 ~ 7 8 3
1、 7 8 1 3 ~ 7 8 3 2、 7 8 1 4 ~ 7 8 3 3、 7 8 1 5 ~ 7 8 3 1、 7 8 1 5 ~ 7 8 3
2、 7 8 1 5 ~ 7 8 3 3、 7 8 1 5 ~ 7 8 3 4、 7 8 1 6 ~ 7 8 3 2、 7 8 1 6 ~ 7 8 3
3、 7 8 1 6 ~ 7 8 3 4、 7 8 1 6 ~ 7 8 3 5、 7 8 1 7 ~ 7 8 3 3、 7 8 1 7 ~ 7 8 3
4、 7 8 1 7 ~ 7 8 3 5、 7 8 1 7 ~ 7 8 3 6、 7 8 1 8 ~ 7 8 3 4、 7 8 1 8 ~ 7 8 3
5、 7 8 1 8 ~ 7 8 3 6、 7 8 1 8 ~ 7 8 3 7、 7 8 1 9 ~ 7 8 3 5、 7 8 1 9 ~ 7 8 3
6、 7 8 1 9 ~ 7 8 3 7、 7 8 1 9 ~ 7 8 3 8、 7 8 2 0 ~ 7 8 3 6、 7 8 2 0 ~ 7 8 3
8、 7 8 2 0 ~ 7 8 3 9、 7 8 2 1 ~ 7 8 3 6、 7 8 2 1 ~ 7 8 3 7、 7 8 2 1 ~ 7 8 3
9、 7 8 2 1 ~ 7 8 4 0、 7 8 2 2 ~ 7 8 3 7、 7 8 2 2 ~ 7 8 3 8、 7 8 2 2 ~ 7 8 4
0、 7 8 2 2 ~ 7 8 4 1、 7 8 2 3 ~ 7 8 3 8、 7 8 2 3 ~ 7 8 3 9、 7 8 2 3 ~ 7 8 3
9、 7 8 2 3 ~ 7 8 4 0、 7 8 2 3 ~ 7 8 4 1、 7 8 2 3 ~ 7 8 4 2、 7 8 2 4 ~ 7 8 3
9、 7 8 2 4 ~ 7 8 4 0、 7 8 2 4 ~ 7 8 4 0、 7 8 2 4 ~ 7 8 4 1、 7 8 2 4 ~ 7 8 4
2、 7 8 2 4 ~ 7 8 4 3、 7 8 2 5 ~ 7 8 4 0、 7 8 2 5 ~ 7 8 4 1、 7 8 2 5 ~ 7 8 4
2、 7 8 2 5 ~ 7 8 4 3、 7 8 2 5 ~ 7 8 4 4、 7 8 2 6 ~ 7 8 4 2、 7 8 2 6 ~ 7 8 4
3、 7 8 2 6 ~ 7 8 4 4、 7 8 2 6 ~ 7 8 4 5、 7 8 2 7 ~ 7 8 4 2、 7 8 2 7 ~ 7 8 4
3、 7 8 2 7 ~ 7 8 4 4、 7 8 2 7 ~ 7 8 4 5、 7 8 2 7 ~ 7 8 4 6、 7 8 2 8 ~ 7 8 4
3、 7 8 2 8 ~ 7 8 4 4、 7 8 2 8 ~ 7 8 4 5、 7 8 2 8 ~ 7 8 4 7、 7 8 2 9 ~ 7 8 4
4、 7 8 2 9 ~ 7 8 4 5、 7 8 2 9 ~ 7 8 4 6、 7 8 2 9 ~ 7 8 4 7、 7 8 2 9 ~ 7 8 4

10

20

30

40

50

8、7830～7845、7830～7846、7830～7847、7830～7848、7830～7849、7831～7846、7831～7847、7831～7848、7831～7849、7831～7850、7832～7847、7832～7848、7832～7849、7832～7850、7832～7851、7833～7848、7833～7849、7833～7850、7833～7851、7833～7852、7834～7849、7834～7850、7834～7851、7834～7852、7834～7853、7835～7850、7835～7851、7835～7852、7835～7853、7835～7854、7836～7851、7836～7852、7836～7853、7836～7854、7836～7855、7837～7852、7837～7853、7837～7854、7837～7855、7837～7856、7838～7853、7838～7854、7838～7855、7838～7856、7838～7857、7839～7854、7839～7855、7839～7856、7839～7857、7839～7858、7840～7855、7840～7856、7840～7857、7840～7858、7840～7859、7841～7856、7841～7857、7841～7858、7841～7859、7841～7860、7842～7857、7842～7858、7842～7859、7842～7860、7842～7861、7843～7858、7843～7859、7843～7860、7843～7861、7843～7862、7844～7859、7844～7860、7844～7861、7844～7862、7845～7860、7845～7861、7845～7862、7846～7861、または7846～7862内で相補的な10～30個の連結されたヌクレオシドからなり、該修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号2に対して少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%相補的であるものを提供する。

【0172】

特定の実施形態は、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号2の核酸塩基1608～1627、1685～1704、1686～1705、1751～1770、1769～1784、1871～1890、1872～1891、1873～1892、1875～1890、1875～1894、1877～1892、1877～1896、1878～1897、1879～1894、1879～1898、2288～2307、2808～2827、2846～2865、2852～2871、2946～2965、3773～3792、3819～3838、3825～3844、3831～3850、3834～3853、3837～3856、3843～3862、4151～4166、4151～4170、4153～4172、4159～4178、4184～4203、4211～4230、4609～4628、4612～4631、4615～4634、4621～4640、4642～4661、4648～4667、4686～4705、4689～4708、4692～4711、4698～4717、4714～4733、5270～5289、5295～5314、5296～5315、5830～5849、5890～5909、5904～5923、6406～6425、6662～6681、6674～6693、6954～6973、6960～6979、6977～6996、6979～6998、6981～7000、6983～6998、6983～7002、6984～7003、6985～7000、6985～7004、6990～7009、7122～7141、7125～7144、7151～7170、7353～7372、7362～7381、7683～7702、7688～7707、7690～7709、7692～7707、7692～7711、7694～7709、7694～7713、7696～7711、7696～7715、7767～7786、7785～7804、7786～7801、7787～7803、7787～7805、7787～7806、7788～7803、7788～7805、7788～7806、7788～7807、7789～7806、7789～7807、7789～7808、7790～7805、7790～7807、7790～7809、7791～7808、7791～7809、7791～7810、7792～7808

、 7 7 9 2 ~ 7 8 0 9、 7 7 9 2 ~ 7 8 1 0、 7 7 9 2 ~ 7 8 1 1、 7 7 9 3 ~ 7 8 1 0
、 7 7 9 3 ~ 7 8 1 1、 7 7 9 3 ~ 7 8 1 2、 7 7 9 4 ~ 7 8 1 1、 7 7 9 4 ~ 7 8 1
2、 7 7 9 4 ~ 7 8 1 3、 7 7 9 5 ~ 7 8 1 2、 7 7 9 5 ~ 7 8 1 3、 7 7 9 5 ~ 7 8 1
4、 7 7 9 6 ~ 7 8 1 1、 7 7 9 6 ~ 7 8 1 3、 7 7 9 6 ~ 7 8 1 4、 7 7 9 6 ~ 7 8 1
5、 7 7 9 7 ~ 7 8 1 2、 7 7 9 7 ~ 7 8 1 4、 7 7 9 7 ~ 7 8 1 6、 7 7 9 8 ~ 7 8 1
3、 7 7 9 8 ~ 7 8 1 5、 7 7 9 8 ~ 7 8 1 7、 7 7 9 9 ~ 7 8 1 6、 7 7 9 9 ~ 7 8 1
8、 7 8 0 0 ~ 7 8 1 9、 7 8 0 1 ~ 7 8 1 8、 7 8 0 1 ~ 7 8 2 0、 7 8 0 2 ~ 7 8 1
7、 7 8 0 2 ~ 7 8 1 9、 7 8 0 2 ~ 7 8 2 1、 7 8 0 3 ~ 7 8 1 8、 7 8 0 3 ~ 7 8 2
0、 7 8 0 3 ~ 7 8 2 2、 7 8 0 4 ~ 7 8 2 1、 7 8 0 4 ~ 7 8 2 3、 7 8 0 5 ~ 7 8 2
0、 7 8 0 5 ~ 7 8 2 2、 7 8 0 5 ~ 7 8 2 4、 7 8 0 6 ~ 7 8 2 1、 7 8 0 6 ~ 7 8 2
3、 7 8 0 6 ~ 7 8 2 5、 7 8 0 7 ~ 7 8 2 4、 7 8 0 7 ~ 7 8 2 5、 7 8 0 7 ~ 7 8 2
6、 7 8 0 8 ~ 7 8 2 5、 7 8 0 8 ~ 7 8 2 7、 7 8 0 9 ~ 7 8 2 5、 7 8 0 9 ~ 7 8 2
6、 7 8 0 9 ~ 7 8 2 8、 7 8 1 0 ~ 7 8 2 5、 7 8 1 0 ~ 7 8 2 6、 7 8 1 0 ~ 7 8 2
7、 7 8 1 0 ~ 7 8 2 9、 7 8 1 1 ~ 7 8 2 8、 7 8 1 1 ~ 7 8 3 0、 7 8 1 2 ~ 7 8 2
9、 7 8 1 2 ~ 7 8 3 0、 7 8 1 2 ~ 7 8 3 1、 7 8 1 3 ~ 7 8 2 9、 7 8 1 3 ~ 7 8 3
1、 7 8 1 3 ~ 7 8 3 2、 7 8 1 4 ~ 7 8 3 3、 7 8 1 5 ~ 7 8 3 1、 7 8 1 5 ~ 7 8 3
2、 7 8 1 5 ~ 7 8 3 3、 7 8 1 5 ~ 7 8 3 4、 7 8 1 6 ~ 7 8 3 2、 7 8 1 6 ~ 7 8 3
3、 7 8 1 6 ~ 7 8 3 4、 7 8 1 6 ~ 7 8 3 5、 7 8 1 7 ~ 7 8 3 3、 7 8 1 7 ~ 7 8 3
4、 7 8 1 7 ~ 7 8 3 5、 7 8 1 7 ~ 7 8 3 6、 7 8 1 8 ~ 7 8 3 4、 7 8 1 8 ~ 7 8 3
5、 7 8 1 8 ~ 7 8 3 6、 7 8 1 8 ~ 7 8 3 7、 7 8 1 9 ~ 7 8 3 5、 7 8 1 9 ~ 7 8 3
6、 7 8 1 9 ~ 7 8 3 7、 7 8 1 9 ~ 7 8 3 8、 7 8 2 0 ~ 7 8 3 6、 7 8 2 0 ~ 7 8 3
8、 7 8 2 0 ~ 7 8 3 9、 7 8 2 1 ~ 7 8 3 6、 7 8 2 1 ~ 7 8 3 7、 7 8 2 1 ~ 7 8 3
9、 7 8 2 1 ~ 7 8 4 0、 7 8 2 2 ~ 7 8 3 7、 7 8 2 2 ~ 7 8 3 8、 7 8 2 2 ~ 7 8 4
0、 7 8 2 2 ~ 7 8 4 1、 7 8 2 3 ~ 7 8 3 8、 7 8 2 3 ~ 7 8 3 9、 7 8 2 3 ~ 7 8 3
9、 7 8 2 3 ~ 7 8 4 0、 7 8 2 3 ~ 7 8 4 1、 7 8 2 3 ~ 7 8 4 2、 7 8 2 4 ~ 7 8 3
9、 7 8 2 4 ~ 7 8 4 0、 7 8 2 4 ~ 7 8 4 0、 7 8 2 4 ~ 7 8 4 1、 7 8 2 4 ~ 7 8 4
2、 7 8 2 4 ~ 7 8 4 3、 7 8 2 5 ~ 7 8 4 0、 7 8 2 5 ~ 7 8 4 1、 7 8 2 5 ~ 7 8 4
2、 7 8 2 5 ~ 7 8 4 3、 7 8 2 5 ~ 7 8 4 4、 7 8 2 6 ~ 7 8 4 2、 7 8 2 6 ~ 7 8 4
3、 7 8 2 6 ~ 7 8 4 4、 7 8 2 6 ~ 7 8 4 5、 7 8 2 7 ~ 7 8 4 2、 7 8 2 7 ~ 7 8 4
3、 7 8 2 7 ~ 7 8 4 4、 7 8 2 7 ~ 7 8 4 5、 7 8 2 7 ~ 7 8 4 6、 7 8 2 8 ~ 7 8 4
3、 7 8 2 8 ~ 7 8 4 4、 7 8 2 8 ~ 7 8 4 5、 7 8 2 8 ~ 7 8 4 7、 7 8 2 9 ~ 7 8 4
4、 7 8 2 9 ~ 7 8 4 5、 7 8 2 9 ~ 7 8 4 6、 7 8 2 9 ~ 7 8 4 7、 7 8 2 9 ~ 7 8 4
8、 7 8 3 0 ~ 7 8 4 5、 7 8 3 0 ~ 7 8 4 6、 7 8 3 0 ~ 7 8 4 7、 7 8 3 0 ~ 7 8 4
8、 7 8 3 0 ~ 7 8 4 9、 7 8 3 1 ~ 7 8 4 6、 7 8 3 1 ~ 7 8 4 7、 7 8 3 1 ~ 7 8 4
8、 7 8 3 1 ~ 7 8 4 9、 7 8 3 1 ~ 7 8 5 0、 7 8 3 2 ~ 7 8 4 7、 7 8 3 2 ~ 7 8 4
8、 7 8 3 2 ~ 7 8 4 9、 7 8 3 2 ~ 7 8 5 0、 7 8 3 2 ~ 7 8 5 1、 7 8 3 3 ~ 7 8 4
8、 7 8 3 3 ~ 7 8 4 9、 7 8 3 3 ~ 7 8 5 0、 7 8 3 3 ~ 7 8 5 1、 7 8 3 3 ~ 7 8 5
2、 7 8 3 4 ~ 7 8 4 9、 7 8 3 4 ~ 7 8 5 0、 7 8 3 4 ~ 7 8 5 1、 7 8 3 4 ~ 7 8 5
2、 7 8 3 4 ~ 7 8 5 3、 7 8 3 5 ~ 7 8 5 0、 7 8 3 5 ~ 7 8 5 1、 7 8 3 5 ~ 7 8 5
2、 7 8 3 5 ~ 7 8 5 3、 7 8 3 5 ~ 7 8 5 4、 7 8 3 6 ~ 7 8 5 1、 7 8 3 6 ~ 7 8 5
2、 7 8 3 6 ~ 7 8 5 3、 7 8 3 6 ~ 7 8 5 4、 7 8 3 6 ~ 7 8 5 5、 7 8 3 7 ~ 7 8 5
2、 7 8 3 7 ~ 7 8 5 3、 7 8 3 7 ~ 7 8 5 4、 7 8 3 7 ~ 7 8 5 5、 7 8 3 7 ~ 7 8 5
6、 7 8 3 8 ~ 7 8 5 3、 7 8 3 8 ~ 7 8 5 4、 7 8 3 8 ~ 7 8 5 5、 7 8 3 8 ~ 7 8 5
6、 7 8 3 8 ~ 7 8 5 7、 7 8 3 9 ~ 7 8 5 4、 7 8 3 9 ~ 7 8 5 5、 7 8 3 9 ~ 7 8 5
6、 7 8 3 9 ~ 7 8 5 7、 7 8 3 9 ~ 7 8 5 8、 7 8 4 0 ~ 7 8 5 5、 7 8 4 0 ~ 7 8 5
6、 7 8 4 0 ~ 7 8 5 7、 7 8 4 0 ~ 7 8 5 8、 7 8 4 0 ~ 7 8 5 9、 7 8 4 1 ~ 7 8 5
6、 7 8 4 1 ~ 7 8 5 7、 7 8 4 1 ~ 7 8 5 8、 7 8 4 1 ~ 7 8 5 9、 7 8 4 1 ~ 7 8 6
0、 7 8 4 2 ~ 7 8 5 7、 7 8 4 2 ~ 7 8 5 8、 7 8 4 2 ~ 7 8 5 9、 7 8 4 2 ~ 7 8 6
0、 7 8 4 2 ~ 7 8 6 1、 7 8 4 3 ~ 7 8 5 8、 7 8 4 3 ~ 7 8 5 9、 7 8 4 3 ~ 7 8 6
0、 7 8 4 3 ~ 7 8 6 1、 7 8 4 3 ~ 7 8 6 2、 7 8 4 4 ~ 7 8 5 9、 7 8 4 4 ~ 7 8 6

10

20

30

40

50

0、7844～7861、7844～7862、7845～7860、7845～7861、7845～7862、7846～7861、及び7846～7862のうちの長さが等しい部分に相補的な少なくとも8個の連続する核酸塩基部分を含む核酸塩基配列を有する10～30個の連続されたヌクレオチドからなり、かつ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2に対して少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%相補的であるものを提供する。

【0173】

特定の実施形態では、アンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドがCFB核酸の一領域を標的とする。特定の実施形態では、CFB核酸の一領域を標的とするそのような化合物またはオリゴヌクレオチドが、前記領域のうちの長さが等しい核酸塩基部分に相補的な連続する核酸塩基部分を有する。例えば前記部分は、本明細書に示す領域のうちの長さが等しい部分に相補的な、少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、または16個の連続する核酸塩基部分であることができる。特定の実施形態では、化合物が、共役体と配列番号1の以下のヌクレオチド領域を標的とする修飾オリゴヌクレオチドとを含むか、またはそれらからなる：30～49、48～63、150～169、151～170、152～171、154～169、154～173、156～171、156～175、157～176、158～173、158～177、480～499、600～619、638～657、644～663、738～757、1089～1108、1135～1154、1141～1160、1147～1166、1150～1169、1153～1172、1159～1178、1162～1181、1165～1184、1171～1186、1171～1190、1173～1188、1173～1192、1175～1190、1175～1194、1177～1196、1183～1202、1208～1227、1235～1254、1298～1317、1304～1323、1310～1329、1316～1335、1319～1338、1322～1341、1328～1347、1349～1368、1355～1374、1393～1412、1396～1415、1399～1418、1405～1424、1421～1440、1621～1640、1646～1665、1646～1665、1647～1666、1689～1708、1749～1768、1763～1782、1912～1931、2073～2092、2085～2104、2166～2185、2172～2191、2189～2208、2191～2210、2193～2212、2195～2210、2195～2214、2196～2215、2197～2212、2197～2216、2202～2221、2223～2238、2223～2242、2225～2240、2226～2245、2227～2242、2227～2246、2238～2257、2241～2260、2267～2286、2361～2380、2388～2407、2397～2416、2448～2467、2453～2472、2455～2474、2457～2472、2457～2476、2459～2474、2459～2478、2461～2476、2461～2480、2532～2551、2550～2569、2551～2566、2551～2570、2552～2568、2552～2570、2552～2571、2553～2568、2553～2570、2553～2571、2553～2572、2554～2571、2554～2572、2554～2573、2555～2570、2555～2572、2555～2574、2556～2573、2556～2574、2556～2575、2557～2573、2557～2574、2557～2575、2557～2576、2558～2575、2558～2576、2558～2577、2559～2576、2559～2577、2559～2578、2560～2577、2560～2578、2560～2579、2561～2576、2561～2578、2561～2579、2561～2580、2562～2577、2562～2579、2562～2581、2563～2578、2563～2580、2563～2582、2564～2581、2564～2583、2565～2584、2566～2583、2566～2585、2567～2582、2567～2584、2567～2586、2568～2583、2568～2585、2568～2586

10

20

30

40

50

8 7、 2 5 6 9 ~ 2 5 8 6、 2 5 6 9 ~ 2 5 8 8、 2 5 7 0 ~ 2 5 8 5、 2 5 7 0 ~ 2 5
 8 7、 2 5 7 0 ~ 2 5 8 9、 2 5 7 1 ~ 2 5 8 6、 2 5 7 1 ~ 2 5 8 8、 2 5 7 1 ~ 2
 5 9 0、 2 5 7 2 ~ 2 5 8 9、 2 5 7 2 ~ 2 5 9 0、 2 5 7 2 ~ 2 5 9 1、 2 5 7 3 ~ 2
 5 9 0、 2 5 7 3 ~ 2 5 9 2、 2 5 7 4 ~ 2 5 9 0、 2 5 7 4 ~ 2 5 9 1、 2 5 7 4 ~ 2
 5 9 3、 2 5 7 5 ~ 2 5 9 0、 2 5 7 5 ~ 2 5 9 1、 2 5 7 5 ~ 2 5 9 2、 2 5 7 5 ~ 2
 5 9 4、 2 5 7 6 ~ 2 5 9 3、 2 5 7 6 ~ 2 5 9 5、 2 5 7 7 ~ 2 5 9 4、 2 5 7 7 ~ 2
 5 9 5、 2 5 7 7 ~ 2 5 9 6、 2 5 7 8 ~ 2 5 9 4、 2 5 7 8 ~ 2 5 9 6、 2 5 7 8 ~ 2
 5 9 7、 2 5 7 9 ~ 2 5 9 8、 2 5 8 0 ~ 2 5 9 6、 2 5 8 0 ~ 2 5 9 7、 2 5 8 0 ~ 2
 5 9 8、 2 5 8 0 ~ 2 5 9 9、 2 5 8 1 ~ 2 5 9 7、 2 5 8 1 ~ 2 5 9 8、 2 5 8 1 ~ 2
 5 9 9、 2 5 8 1 ~ 2 6 0 0、 2 5 8 2 ~ 2 5 9 8、 2 5 8 2 ~ 2 5 9 9、 2 5 8 2 ~ 2
 6 0 0、 2 5 8 2 ~ 2 6 0 1、 2 5 8 3 ~ 2 5 9 9、 2 5 8 3 ~ 2 6 0 0、 2 5 8 3 ~ 2
 6 0 1、 2 5 8 3 ~ 2 6 0 2、 2 5 8 4 ~ 2 6 0 0、 2 5 8 4 ~ 2 6 0 1、 2 5 8 4 ~ 2
 6 0 2、 2 5 8 4 ~ 2 6 0 3、 2 5 8 5 ~ 2 6 0 1、 2 5 8 5 ~ 2 6 0 3、 2 5 8 5 ~ 2
 6 0 4、 2 5 8 6 ~ 2 6 0 1、 2 5 8 6 ~ 2 6 0 2、 2 5 8 6 ~ 2 6 0 4、 2 5 8 6 ~ 2
 6 0 5、 2 5 8 7 ~ 2 6 0 2、 2 5 8 7 ~ 2 6 0 3、 2 5 8 7 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 7 ~ 2
 6 0 6、 2 5 8 8 ~ 2 6 0 3、 2 5 8 8 ~ 2 6 0 4、 2 5 8 8 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 8 ~ 2
 6 0 6、 2 5 8 8 ~ 2 6 0 7、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 4、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 9 ~ 2
 6 0 6、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 7、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 5、 2 5 9 0 ~ 2
 6 0 6、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 7、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 0 ~ 2
 6 0 9、 2 5 9 1 ~ 2 6 0 7、 2 5 9 1 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 1 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 1 ~ 2
 6 1 0、 2 5 9 2 ~ 2 6 0 7、 2 5 9 2 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 2 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 2 ~ 2
 6 1 0、 2 5 9 2 ~ 2 6 1 1、 2 5 9 3 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 3 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 3 ~ 2
 6 1 0、 2 5 9 3 ~ 2 6 1 2、 2 5 9 4 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 4 ~ 2 6 1 0、 2 5 9 4 ~ 2
 6 1 1、 2 5 9 4 ~ 2 6 1 2、 2 5 9 4 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 0、 2 5 9 5 ~ 2
 6 1 1、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 2、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 4、 2 5 9 6 ~ 2
 6 1 1、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 2、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 4、 2 5 9 6 ~ 2
 6 1 5、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 2、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 2、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 7 ~ 2
 6 1 4、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 5、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 6、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 8 ~ 2
 6 1 4、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 5、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 6、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 7、 2 5 9 9 ~ 2
 6 1 4、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 5、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 6、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 7、 2 5 9 9 ~ 2
 6 1 8、 2 6 0 0 ~ 2 6 1 5、 2 6 0 0 ~ 2 6 1 6、 2 6 0 0 ~ 2 6 1 7、 2 6 0 0 ~ 2
 6 1 8、 2 6 0 0 ~ 2 6 1 9、 2 6 0 1 ~ 2 6 1 6、 2 6 0 1 ~ 2 6 1 7、 2 6 0 1 ~ 2
 6 1 8、 2 6 0 1 ~ 2 6 1 9、 2 6 0 1 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 2 ~ 2 6 1 7、 2 6 0 2 ~ 2
 6 1 8、 2 6 0 2 ~ 2 6 1 9、 2 6 0 2 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 2 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 3 ~ 2
 6 1 8、 2 6 0 3 ~ 2 6 1 9、 2 6 0 3 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 3 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 3 ~ 2
 6 2 2、 2 6 0 4 ~ 2 6 1 9、 2 6 0 4 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 4 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 4 ~ 2
 6 2 2、 2 6 0 4 ~ 2 6 2 3、 2 6 0 5 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 5 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 5 ~ 2
 6 2 2、 2 6 0 5 ~ 2 6 2 3、 2 6 0 5 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 6 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 6 ~ 2
 6 2 2、 2 6 0 6 ~ 2 6 2 3、 2 6 0 6 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 6 ~ 2 6 2 5、 2 6 0 7 ~ 2
 6 2 2、 2 6 0 7 ~ 2 6 2 3、 2 6 0 7 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 7 ~ 2 6 2 5、 2 6 0 7 ~ 2
 6 2 6、 2 6 0 8 ~ 2 6 2 3、 2 6 0 8 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 8 ~ 2 6 2 5、 2 6 0 8 ~ 2
 6 2 6、 2 6 0 8 ~ 2 6 2 7、 2 6 0 9 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 9 ~ 2 6 2 5、 2 6 0 9 ~ 2
 6 2 6、 2 6 0 9 ~ 2 6 2 7、 2 6 0 9 ~ 2 6 2 8、 2 6 1 0 ~ 2 6 2 5、 2 6 1 0 ~ 2
 6 2 6、 2 6 1 0 ~ 2 6 2 7、 2 6 1 0 ~ 2 6 2 8、 2 6 1 0 ~ 2 6 2 9、 2 6 1 1 ~ 2
 6 2 6、 2 6 1 1 ~ 2 6 2 7、 2 6 1 1 ~ 2 6 2 8、 2 6 1 1 ~ 2 6 2 9、 2 6 1 1 ~ 2
 6 3 0、 2 6 1 2 ~ 2 6 2 7、 2 6 1 2 ~ 2 6 2 8、 2 6 1 2 ~ 2 6 2 9、 2 6 1 2 ~ 2
 6 3 0、 2 6 1 2 ~ 2 6 3 1、 2 6 1 3 ~ 2 6 2 8、 2 6 1 3 ~ 2 6 2 9、 2 6 1 3 ~ 2
 6 3 0、 2 6 1 3 ~ 2 6 3 1、 2 6 1 4 ~ 2 6 2 9、 2 6 1 4 ~ 2 6 3 0、 2 6 1 4 ~ 2
 6 3 1、 2 6 1 5 ~ 2 6 3 0、 2 6 1 5 ~ 2 6 3 1、 及び 2 6 1 6 ~ 2 6 3 1。

【 0 1 7 4 】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、アンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが C F B 核酸の一領域を標的とする。特定の実施形態では、C F B 核酸の一領域を標的とする。そのような化合物またはオリゴヌクレオチドが、前記領域のうちの長さが等しい核酸塩基部分に相補的な連続する核酸塩基部分を有する。例えば前記部分は、本明細書に示す領域のうちの長さが等しい部分に相補的な、少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、または 16 個の連続する核酸塩基部分であることができる。特定の実施形態では、化合物が、共役体と配列番号 2 の以下のヌクレオチド領域を標的とする修飾オリゴヌクレオチドとを含むか、またはそれらからなる：1608～1627、1685～1704、1686～1705、1751～1770、1769～1784、1871～1890、1872～1891、1873～1892、1875～1890、1875～1894、1877～1892、1877～1896、1878～1897、1879～1894、1879～1898、2288～2307、2808～2827、2846～2865、2852～2871、2946～2965、3773～3792、3819～3838、3825～3844、3831～3850、3834～3853、3837～3856、3843～3862、4151～4166、4151～4170、4153～4172、4159～4178、4184～4203、4211～4230、4609～4628、4612～4631、4615～4634、4621～4640、4642～4661、4648～4667、4686～4705、4689～4708、4692～4711、4698～4717、4714～4733、5270～5289、5295～5314、5296～5315、5830～5849、5890～5909、5904～5923、6406～6425、6662～6681、6674～6693、6954～6973、6960～6979、6977～6996、6979～6998、6981～7000、6983～6998、6983～7002、6984～7003、6985～7000、6985～7004、6990～7009、7122～7141、7125～7144、7151～7170、7353～7372、7362～7381、7683～7702、7688～7707、7690～7709、7692～7707、7692～7711、7694～7709、7694～7713、7696～7711、7696～7715、7767～7786、7785～7804、7786～7801、7787～7803、7787～7805、7787～7806、7788～7803、7788～7805、7788～7806、7788～7807、7789～7806、7789～7807、7789～7808、7790～7805、7790～7807、7790～7809、7791～7808、7791～7809、7791～7810、7792～7808、7792～7809、7792～7810、7792～7811、7793～7810、7793～7811、7793～7812、7794～7811、7794～7812、7794～7813、7795～7812、7795～7813、7795～7814、7796～7811、7796～7813、7796～7814、7796～7815、7797～7812、7797～7814、7797～7816、7798～7813、7798～7815、7798～7817、7799～7816、7799～7818、7800～7819、7801～7818、7801～7820、7802～7817、7802～7819、7802～7821、7803～7818、7803～7820、7803～7822、7804～7821、7804～7823、7805～7822、7805～7822、7805～7824、7806～7821、7806～7823、7806～7825、7807～7824、7807～7825、7807～7826、7808～7825、7808～7827、7809～7825、7809～7827、7809～7828、7810～7825、7810～7826、7810～7827、7810～7829、7811～7828、7811～7830、7812～7829、7812～7831、7813～7830、7813～7832、7814～7833、7815～7831、7815～7833、7815～7833、7815～7834、7816～7832、7816～7834、7816～7834、7816～7835、7817～7833、7817～7835

10

20

30

40

50

4、7817～7835、7817～7836、7818～7834、7818～783
 5、7818～7836、7818～7837、7819～7835、7819～783
 6、7819～7837、7819～7838、7820～7836、7820～783
 8、7820～7839、7821～7836、7821～7837、7821～783
 9、7821～7840、7822～7837、7822～7838、7822～784
 0、7822～7841、7823～7838、7823～7839、7823～783
 9、7823～7840、7823～7841、7823～7842、7824～783
 9、7824～7840、7824～7840、7824～7841、7824～784
 2、7824～7843、7825～7840、7825～7841、7825～784
 2、7825～7843、7825～7844、7826～7842、7826～784
 3、7826～7844、7826～7845、7827～7842、7827～784
 3、7827～7844、7827～7845、7827～7846、7828～784
 3、7828～7844、7828～7845、7828～7847、7829～784
 4、7829～7845、7829～7846、7829～7847、7829～784
 8、7830～7845、7830～7846、7830～7847、7830～784
 8、7830～7849、7831～7846、7831～7847、7831～784
 8、7831～7849、7831～7850、7832～7847、7832～784
 8、7832～7849、7832～7850、7832～7851、7833～784
 8、7833～7849、7833～7850、7833～7851、7833～785
 2、7834～7849、7834～7850、7834～7851、7834～785
 2、7834～7853、7835～7850、7835～7851、7835～785
 2、7835～7853、7835～7854、7836～7851、7836～785
 2、7836～7853、7836～7854、7836～7855、7837～785
 2、7837～7853、7837～7854、7837～7855、7837～785
 6、7838～7853、7838～7854、7838～7855、7838～785
 6、7838～7857、7839～7854、7839～7855、7839～785
 6、7839～7857、7839～7858、7840～7855、7840～785
 6、7840～7857、7840～7858、7840～7859、7841～785
 6、7841～7857、7841～7858、7841～7859、7841～786
 0、7842～7857、7842～7858、7842～7859、7842～786
 0、7842～7861、7843～7858、7843～7859、7843～786
 0、7843～7861、7843～7862、7844～7859、7844～786
 0、7844～7861、7844～7862、7845～7860、7845～786
 1、7845～7862、7846～7861、及び7846～7862。

【0175】

特定の実施形態では、化合物が、共役体とCFB核酸の3'UTRを標的とする修飾オリゴヌクレオチドとを含むか、またはそれらからなる。特定の態様では、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号1の核酸塩基配列を有するCFB核酸のヌクレオチド2574～2626内を標的とする。特定の態様では、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号1の核酸塩基配列を有するCFB核酸のヌクレオチド2574～2626内の長さが等しい部分に相補的な少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、または16個の連続する核酸塩基部分を有する。

【0176】

特定の実施形態では、化合物が、共役体と、配列番号1の核酸塩基配列を有するCFB核酸のうち核酸塩基2457～2631、2457～2472、2457～2474、2457～2476、2457～2566、2457～2570、2457～2571、2457～2572、2457～2573、2457～2574、2457～2575、2457～2576、2457～2577、2457～2578、2457～2579、2457～2580、2457～2581、2457～2582、2457～2583、2457～2584、2457～2585、2457～2586、2457～2587、24

10

20

30

40

50

~ 2 6 2 6、2 5 9 7 ~ 2 6 2 7、2 5 9 7 ~ 2 6 2 8、2 5 9 7 ~ 2 6 2 9、2 5 9 7
 ~ 2 6 3 0、2 5 9 7 ~ 2 6 3 1、2 5 9 8 ~ 2 6 1 3、2 5 9 8 ~ 2 6 1 4、2 5 9 8
 ~ 2 6 1 5、2 5 9 8 ~ 2 6 1 6、2 5 9 8 ~ 2 6 1 7、2 5 9 8 ~ 2 6 1 8、2 5 9 8
 ~ 2 6 1 9、2 5 9 8 ~ 2 6 2 0、2 5 9 8 ~ 2 6 2 1、2 5 9 8 ~ 2 6 2 2、2 5 9 8
 ~ 2 6 2 3、2 5 9 8 ~ 2 6 2 4、2 5 9 8 ~ 2 6 2 5、2 5 9 8 ~ 2 6 2 6、2 5 9 8
 ~ 2 6 2 7、2 5 9 8 ~ 2 6 2 8、2 5 9 8 ~ 2 6 2 9、2 5 9 8 ~ 2 6 3 0、2 5 9 8
 ~ 2 6 3 1、2 5 9 9 ~ 2 6 1 4、2 5 9 9 ~ 2 6 1 5、2 5 9 9 ~ 2 6 1 6、2 5 9 9
 ~ 2 6 1 7、2 5 9 9 ~ 2 6 1 8、2 5 9 9 ~ 2 6 1 9、2 5 9 9 ~ 2 6 2 0、2 5 9 9
 ~ 2 6 2 1、2 5 9 9 ~ 2 6 2 2、2 5 9 9 ~ 2 6 2 3、2 5 9 9 ~ 2 6 2 4、2 5 9 9 ~

10

2 6 2 5、2 5 9 9 ~ 2 6 2 6、2 5 9 9 ~ 2 6 2 7、2 5 9 9 ~ 2 6 2 8、2 5 9 9 ~
 2 6 2 9、2 5 9 9 ~ 2 6 3 0、2 5 9 9 ~ 2 6 3 1、2 6 0 0 ~ 2 6 1 5、2 6 0 0 ~
 2 6 1 6、2 6 0 0 ~ 2 6 1 7、2 6 0 0 ~ 2 6 1 8、2 6 0 0 ~ 2 6 1 9、2 6 0 0 ~
 2 6 2 0、2 6 0 0 ~ 2 6 2 1、2 6 0 0 ~ 2 6 2 2、2 6 0 0 ~ 2 6 2 3、2 6 0 0 ~
 2 6 2 4、2 6 0 0 ~ 2 6 2 5、2 6 0 0 ~ 2 6 2 6、2 6 0 0 ~ 2 6 2 7、2 6 0 0 ~
 2 6 2 8、2 6 0 0 ~ 2 6 2 9、2 6 0 0 ~ 2 6 3 0、2 6 0 0 ~ 2 6 3 1、2 6 0 1 ~
 2 6 1 6、2 6 0 1 ~ 2 6 1 7、2 6 0 1 ~ 2 6 1 8、2 6 0 1 ~ 2 6 1 9、2 6 0 1 ~
 2 6 2 0、2 6 0 1 ~ 2 6 2 1、2 6 0 1 ~ 2 6 2 2、2 6 0 1 ~ 2 6 2 3、2 6 0 1 ~
 2 6 2 4、2 6 0 1 ~ 2 6 2 5、2 6 0 1 ~ 2 6 2 6、2 6 0 1 ~ 2 6 2 7、2 6 0 1 ~
 2 6 2 8、2 6 0 1 ~ 2 6 2 9、2 6 0 1 ~ 2 6 3 0、2 6 0 1 ~ 2 6 3 1、2 6 0 2 ~
 2 6 1 8、2 6 0 2 ~ 2 6 1 9、2 6 0 2 ~ 2 6 2 0、2 6 0 2 ~ 2 6 2 1、2 6 0 2 ~
 2 6 2 2、2 6 0 2 ~ 2 6 2 3、2 6 0 2 ~ 2 6 2 4、2 6 0 2 ~ 2 6 2 5、2 6 0 2 ~
 2 6 2 6、2 6 0 2 ~ 2 6 2 7、2 6 0 2 ~ 2 6 2 8、2 6 0 2 ~ 2 6 2 9、2 6 0 2 ~
 2 6 3 0、2 6 0 2 ~ 2 6 3 1、2 6 0 3 ~ 2 6 2 0、2 6 0 3 ~ 2 6 2 1、2 6 0 3 ~
 2 6 2 2、2 6 0 3 ~ 2 6 2 3、2 6 0 3 ~ 2 6 2 4、2 6 0 3 ~ 2 6 2 5、2 6 0 3 ~
 2 6 2 6、2 6 0 3 ~ 2 6 2 7、2 6 0 3 ~ 2 6 2 8、2 6 0 3 ~ 2 6 2 9、2 6 0 3 ~
 2 6 3 0、2 6 0 3 ~ 2 6 3 1、2 6 0 4 ~ 2 6 1 9、2 6 0 4 ~ 2 6 2 0、2 6 0 4 ~
 2 6 2 1、2 6 0 4 ~ 2 6 2 2、2 6 0 4 ~ 2 6 2 3、2 6 0 4 ~ 2 6 2 4、2 6 0 4 ~
 2 6 2 5、2 6 0 4 ~ 2 6 2 6、2 6 0 4 ~ 2 6 2 7、2 6 0 4 ~ 2 6 2 8、2 6 0 4 ~
 2 6 2 9、2 6 0 4 ~ 2 6 3 0、2 6 0 4 ~ 2 6 3 1、2 6 0 5 ~ 2 6 2 0、2 6 0 5 ~
 2 6 2 1、2 6 0 5 ~ 2 6 2 2、2 6 0 5 ~ 2 6 2 3、2 6 0 5 ~ 2 6 2 4、2 6 0 5 ~
 2 6 2 5、2 6 0 5 ~ 2 6 2 6、2 6 0 5 ~ 2 6 2 7、2 6 0 5 ~ 2 6 2 8、2 6 0 5 ~
 2 6 2 9、2 6 0 5 ~ 2 6 3 0、2 6 0 5 ~ 2 6 3 1、2 6 0 6 ~ 2 6 2 1、2 6 0 6 ~
 2 6 2 2、2 6 0 6 ~ 2 6 2 3、2 6 0 6 ~ 2 6 2 4、2 6 0 6 ~ 2 6 2 5、2 6 0 6 ~
 2 6 2 6、2 6 0 6 ~ 2 6 2 7、2 6 0 6 ~ 2 6 2 8、2 6 0 6 ~ 2 6 2 9、2 6 0 6 ~
 2 6 3 0、2 6 0 6 ~ 2 6 3 1、2 6 0 7 ~ 2 6 2 2、2 6 0 7 ~ 2 6 2 3、2 6 0 7 ~
 2 6 2 4、2 6 0 7 ~ 2 6 2 5、2 6 0 7 ~ 2 6 2 6、2 6 0 7 ~ 2 6 2 7、2 6 0 7 ~
 2 6 2 8、2 6 0 7 ~ 2 6 2 9、2 6 0 7 ~ 2 6 3 0、2 6 0 7 ~ 2 6 3 1、2 6 0 8 ~
 2 6 2 3、2 6 0 8 ~ 2 6 2 4、2 6 0 8 ~ 2 6 2 5、2 6 0 8 ~ 2 6 2 6、2 6 0 8 ~
 2 6 2 7、2 6 0 8 ~ 2 6 2 8、2 6 0 8 ~ 2 6 2 9、2 6 0 8 ~ 2 6 3 0、2 6 0 8 ~
 2 6 3 1、2 6 0 9 ~ 2 6 2 4、2 6 0 9 ~ 2 6 2 5、2 6 0 9 ~ 2 6 2 6、2 6 0 9 ~
 2 6 2 7、2 6 0 9 ~ 2 6 2 8、2 6 0 9 ~ 2 6 2 9、2 6 0 9 ~ 2 6 3 0、2 6 0 9 ~
 2 6 3 1、2 6 1 0 ~ 2 6 2 5、2 6 1 0 ~ 2 6 2 6、2 6 1 0 ~ 2 6 2 7、2 6 1 0 ~
 2 6 2 8、2 6 1 0 ~ 2 6 2 9、2 6 1 0 ~ 2 6 3 0、2 6 1 0 ~ 2 6 3 1、2 6 1 1 ~
 2 6 2 6、2 6 1 1 ~ 2 6 2 7、2 6 1 1 ~ 2 6 2 8、2 6 1 1 ~ 2 6 2 9、2 6 1 1 ~
 2 6 3 0、2 6 1 1 ~ 2 6 3 1、2 6 1 2 ~ 2 6 2 7、2 6 1 2 ~ 2 6 2 8、2 6 1 2 ~
 2 6 2 9、2 6 1 2 ~ 2 6 3 0、2 6 1 2 ~ 2 6 3 1、2 6 1 3 ~ 2 6 2 8、2 6 1 3 ~
 2 6 2 9、2 6 1 3 ~ 2 6 3 0、2 6 1 3 ~ 2 6 3 1、2 6 1 4 ~ 2 6 2 9、2 6 1 4 ~
 2 6 3 0、2 6 1 4 ~ 2 6 3 1、2 6 1 5 ~ 2 6 3 0、2 6 1 5 ~ 2 6 3 1、または 2 6
 1 6 ~ 2 6 3 1 内の一領域を標的とする修飾オリゴヌクレオチドとを含むか、またはそれ

20

30

40

50

らからなる。特定の態様では、アンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが、前述の核酸塩基領域内の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、または16個の連続する核酸塩基を標的とする。

【0177】

特定の実施形態では、配列番号1の以下のヌクレオチド領域が、アンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの標的となった時に、少なくとも50%の阻害を示す

: 30 ~ 49、48 ~ 63、150 ~ 169、151 ~ 170、152 ~ 171、154 ~ 169、154 ~ 173、156 ~ 171、156 ~ 175、157 ~ 176、158 ~ 173、158 ~ 177、480 ~ 499、600 ~ 619、638 ~ 657、644 ~ 663、738 ~ 757、1089 ~ 1108、1135 ~ 1154、1141 ~ 1160、1147 ~ 1166、1150 ~ 1169、1153 ~ 1172、1159 ~ 1178、1162 ~ 1181、1165 ~ 1184、1171 ~ 1186、1171 ~ 1190、1173 ~ 1188、1173 ~ 1192、1175 ~ 1190、1175 ~ 1194、1177 ~ 1196、1183 ~ 1202、1208 ~ 1227、1235 ~ 1254、1298 ~ 1317、1304 ~ 1323、1310 ~ 1329、1316 ~ 1335、1319 ~ 1338、1322 ~ 1341、1328 ~ 1347、1349 ~ 1368、1355 ~ 1374、1393 ~ 1412、1396 ~ 1415、1399 ~ 1418、1405 ~ 1424、1421 ~ 1440、1621 ~ 1640、1646 ~ 1665、1646 ~ 1665、1647 ~ 1666、1689 ~ 1708、1749 ~ 1768、1763 ~ 1782、1912 ~ 1931、2073 ~ 2092、2085 ~ 2104、2166 ~ 2185、2172 ~ 2191、2189 ~ 2208、2191 ~ 2210、2193 ~ 2212、2195 ~ 2210、2195 ~ 2214、2196 ~ 2215、2197 ~ 2212、2197 ~ 2216、2202 ~ 2221、2223 ~ 2238、2223 ~ 2242、2225 ~ 2240、2226 ~ 2245、2227 ~ 2242、2227 ~ 2246、2238 ~ 2257、2241 ~ 2260、2267 ~ 2286、2361 ~ 2380、2388 ~ 2407、2397 ~ 2416、2448 ~ 2467、2453 ~ 2472、2455 ~ 2474、2457 ~ 2472、2457 ~ 2476、2459 ~ 2474、2459 ~ 2478、2461 ~ 2476、2461 ~ 2480、2532 ~ 2551、2550 ~ 2569、2551 ~ 2566、2551 ~ 2570、2552 ~ 2568、2552 ~ 2570、2552 ~ 2571、2553 ~ 2568、2553 ~ 2570、2553 ~ 2571、2553 ~ 2572、2554 ~ 2571、2554 ~ 2572、2554 ~ 2573、2555 ~ 2570、2555 ~ 2572、2555 ~ 2574、2556 ~ 2573、2556 ~ 2574、2556 ~ 2575、2557 ~ 2573、2557 ~ 2574、2557 ~ 2575、2557 ~ 2576、2558 ~ 2575、2558 ~ 2576、2558 ~ 2577、2559 ~ 2576、2559 ~ 2577、2559 ~ 2578、2560 ~ 2577、2560 ~ 2578、2560 ~ 2579、2561 ~ 2576、2561 ~ 2578、2561 ~ 2580、2561 ~ 2580、2562 ~ 2577、2562 ~ 2579、2562 ~ 2581、2563 ~ 2578、2563 ~ 2580、2563 ~ 2582、2564 ~ 2581、2564 ~ 2583、2565 ~ 2584、2566 ~ 2583、2566 ~ 2585、2567 ~ 2582、2567 ~ 2584、2567 ~ 2586、2568 ~ 2583、2568 ~ 2585、2568 ~ 2587、2569 ~ 2586、2569 ~ 2588、2570 ~ 2585、2570 ~ 2587、2570 ~ 2589、2571 ~ 2586、2571 ~ 2588、2571 ~ 2590、2572 ~ 2589、2572 ~ 2590、2572 ~ 2591、2573 ~ 2590、2573 ~ 2592、2574 ~ 2590、2574 ~ 2591、2574 ~ 2593、2575 ~ 2590、2575 ~ 2591、2575 ~ 2592、2575 ~ 2594、2576 ~ 2593、2576 ~ 2595、2577 ~ 2594、2577 ~ 2595、2577 ~ 2596、2578 ~ 2594、2578 ~ 2596、2578 ~ 2597、2579 ~ 2598、2580 ~ 2596、2580 ~ 2597、2580 ~ 2598、2580 ~ 2599、2581 ~ 2

10

20

30

40

50

5 9 7、2 5 8 1 ~ 2 5 9 8、2 5 8 1 ~ 2 5 9 9、2 5 8 1 ~ 2 6 0 0、2 5 8 2 ~ 2
 5 9 8、2 5 8 2 ~ 2 5 9 9、2 5 8 2 ~ 2 6 0 0、2 5 8 2 ~ 2 6 0 1、2 5 8 3 ~ 2
 5 9 9、2 5 8 3 ~ 2 6 0 0、2 5 8 3 ~ 2 6 0 1、2 5 8 3 ~ 2 6 0 2、2 5 8 4 ~ 2
 6 0 0、2 5 8 4 ~ 2 6 0 1、2 5 8 4 ~ 2 6 0 2、2 5 8 4 ~ 2 6 0 3、2 5 8 5 ~ 2
 6 0 1、2 5 8 5 ~ 2 6 0 3、2 5 8 5 ~ 2 6 0 4、2 5 8 6 ~ 2 6 0 1、2 5 8 6 ~ 2
 6 0 2、2 5 8 6 ~ 2 6 0 4、2 5 8 6 ~ 2 6 0 5、2 5 8 7 ~ 2 6 0 2、2 5 8 7 ~ 2
 6 0 3、2 5 8 7 ~ 2 6 0 5、2 5 8 7 ~ 2 6 0 6、2 5 8 8 ~ 2 6 0 3、2 5 8 8 ~ 2
 6 0 4、2 5 8 8 ~ 2 6 0 5、2 5 8 8 ~ 2 6 0 6、2 5 8 8 ~ 2 6 0 7、2 5 8 9 ~ 2
 6 0 4、2 5 8 9 ~ 2 6 0 5、2 5 8 9 ~ 2 6 0 6、2 5 8 9 ~ 2 6 0 7、2 5 8 9 ~ 2
 6 0 8、2 5 9 0 ~ 2 6 0 5、2 5 9 0 ~ 2 6 0 6、2 5 9 0 ~ 2 6 0 7、2 5 9 0 ~ 2
 6 0 8、2 5 9 0 ~ 2 6 0 9、2 5 9 0 ~ 2 6 0 9、2 5 9 1 ~ 2 6 0 7、2 5 9 1 ~ 2
 6 0 8、2 5 9 1 ~ 2 6 0 9、2 5 9 1 ~ 2 6 1 0、2 5 9 2 ~ 2 6 0 7、2 5 9 2 ~ 2
 6 0 8、2 5 9 2 ~ 2 6 0 9、2 5 9 2 ~ 2 6 1 0、2 5 9 2 ~ 2 6 1 1、2 5 9 3 ~ 2
 6 0 8、2 5 9 3 ~ 2 6 0 9、2 5 9 3 ~ 2 6 1 0、2 5 9 3 ~ 2 6 1 2、2 5 9 4 ~ 2
 6 0 9、2 5 9 4 ~ 2 6 1 0、2 5 9 4 ~ 2 6 1 1、2 5 9 4 ~ 2 6 1 2、2 5 9 4 ~ 2
 6 1 3、2 5 9 5 ~ 2 6 1 0、2 5 9 5 ~ 2 6 1 1、2 5 9 5 ~ 2 6 1 2、2 5 9 5 ~ 2
 6 1 3、2 5 9 5 ~ 2 6 1 4、2 5 9 6 ~ 2 6 1 1、2 5 9 6 ~ 2 6 1 2、2 5 9 6 ~ 2
 6 1 3、2 5 9 6 ~ 2 6 1 4、2 5 9 6 ~ 2 6 1 5、2 5 9 7 ~ 2 6 1 2、2 5 9 7 ~ 2
 6 1 2、2 5 9 7 ~ 2 6 1 3、2 5 9 7 ~ 2 6 1 4、2 5 9 7 ~ 2 6 1 5、2 5 9 7 ~ 2
 6 1 6、2 5 9 8 ~ 2 6 1 3、2 5 9 8 ~ 2 6 1 4、2 5 9 8 ~ 2 6 1 5、2 5 9 8 ~ 2
 6 1 6、2 5 9 8 ~ 2 6 1 7、2 5 9 9 ~ 2 6 1 4、2 5 9 9 ~ 2 6 1 5、2 5 9 9 ~ 2
 6 1 6、2 5 9 9 ~ 2 6 1 7、2 5 9 9 ~ 2 6 1 8、2 6 0 0 ~ 2 6 1 5、2 6 0 0 ~ 2
 6 1 6、2 6 0 0 ~ 2 6 1 7、2 6 0 0 ~ 2 6 1 8、2 6 0 0 ~ 2 6 1 9、2 6 0 1 ~ 2
 6 1 6、2 6 0 1 ~ 2 6 1 7、2 6 0 1 ~ 2 6 1 8、2 6 0 1 ~ 2 6 1 9、2 6 0 1 ~ 2
 6 2 0、2 6 0 2 ~ 2 6 1 7、2 6 0 2 ~ 2 6 1 8、2 6 0 2 ~ 2 6 1 9、2 6 0 2 ~ 2
 6 2 0、2 6 0 2 ~ 2 6 2 1、2 6 0 3 ~ 2 6 1 8、2 6 0 3 ~ 2 6 1 9、2 6 0 3 ~ 2
 6 2 0、2 6 0 3 ~ 2 6 2 1、2 6 0 3 ~ 2 6 2 2、2 6 0 4 ~ 2 6 1 9、2 6 0 4 ~ 2
 6 2 0、2 6 0 4 ~ 2 6 2 1、2 6 0 4 ~ 2 6 2 2、2 6 0 4 ~ 2 6 2 3、2 6 0 5 ~ 2
 6 2 0、2 6 0 5 ~ 2 6 2 1、2 6 0 5 ~ 2 6 2 2、2 6 0 5 ~ 2 6 2 3、2 6 0 5 ~ 2
 6 2 4、2 6 0 6 ~ 2 6 2 1、2 6 0 6 ~ 2 6 2 2、2 6 0 6 ~ 2 6 2 3、2 6 0 6 ~ 2
 6 2 4、2 6 0 6 ~ 2 6 2 5、2 6 0 7 ~ 2 6 2 2、2 6 0 7 ~ 2 6 2 3、2 6 0 7 ~ 2
 6 2 4、2 6 0 7 ~ 2 6 2 5、2 6 0 7 ~ 2 6 2 6、2 6 0 8 ~ 2 6 2 3、2 6 0 8 ~ 2
 6 2 4、2 6 0 8 ~ 2 6 2 5、2 6 0 8 ~ 2 6 2 6、2 6 0 8 ~ 2 6 2 7、2 6 0 9 ~ 2
 6 2 4、2 6 0 9 ~ 2 6 2 5、2 6 0 9 ~ 2 6 2 6、2 6 0 9 ~ 2 6 2 7、2 6 0 9 ~ 2
 6 2 8、2 6 1 0 ~ 2 6 2 5、2 6 1 0 ~ 2 6 2 6、2 6 1 0 ~ 2 6 2 7、2 6 1 0 ~ 2
 6 2 8、2 6 1 0 ~ 2 6 2 9、2 6 1 1 ~ 2 6 2 6、2 6 1 1 ~ 2 6 2 7、2 6 1 1 ~ 2
 6 2 8、2 6 1 1 ~ 2 6 2 9、2 6 1 1 ~ 2 6 3 0、2 6 1 2 ~ 2 6 2 7、2 6 1 2 ~ 2
 6 2 8、2 6 1 2 ~ 2 6 2 9、2 6 1 2 ~ 2 6 3 0、2 6 1 2 ~ 2 6 3 1、2 6 1 3 ~ 2
 6 2 8、2 6 1 3 ~ 2 6 2 9、2 6 1 3 ~ 2 6 3 0、2 6 1 3 ~ 2 6 3 1、2 6 1 4 ~ 2
 6 2 9、2 6 1 4 ~ 2 6 3 0、2 6 1 4 ~ 2 6 3 1、2 6 1 5 ~ 2 6 3 0、2 6 1 5 ~ 2
 6 3 1、及び 2 6 1 6 ~ 2 6 3 1。

【 0 1 7 8 】

特定の実施形態では、配列番号 2 の以下のヌクレオチド領域が、アンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの標的となった時に、少なくとも 5 0 % の阻害を示す

: 1 6 0 8 ~ 1 6 2 7、1 6 8 5 ~ 1 7 0 4、1 6 8 6 ~ 1 7 0 5、1 7 5 1 ~ 1 7 7
 0、1 7 6 9 ~ 1 7 8 4、1 8 7 1 ~ 1 8 9 0、1 8 7 2 ~ 1 8 9 1、1 8 7 3 ~ 1 8 9
 2、1 8 7 5 ~ 1 8 9 0、1 8 7 5 ~ 1 8 9 4、1 8 7 7 ~ 1 8 9 2、1 8 7 7 ~ 1 8 9
 6、1 8 7 8 ~ 1 8 9 7、1 8 7 9 ~ 1 8 9 4、1 8 7 9 ~ 1 8 9 8、2 2 8 8 ~ 2 3 0
 7、2 8 0 8 ~ 2 8 2 7、2 8 4 6 ~ 2 8 6 5、2 8 5 2 ~ 2 8 7 1、2 9 4 6 ~ 2 9 6
 5、3 7 7 3 ~ 3 7 9 2、3 8 1 9 ~ 3 8 3 8、3 8 2 5 ~ 3 8 4 4、3 8 3 1 ~ 3 8 5

10

20

30

40

50

0、3834~3853、3837~3856、3843~3862、4151~4166、
 6、4151~4170、4153~4172、4159~4178、4184~4203、
 3、4211~4230、4609~4628、4612~4631、4615~4634、
 4、4621~4640、4642~4661、4648~4667、4686~4705、
 5、4689~4708、4692~4711、4698~4717、4714~4733、
 3、5270~5289、5295~5314、5296~5315、5830~5849、
 9、5890~5909、5904~5923、6406~6425、6662~6681、
 1、6674~6693、6954~6973、6960~6979、6977~6996、
 6、6979~6998、6981~7000、6983~6998、6983~7002、
 2、6984~7003、6985~7000、6985~7004、6990~7005、
 9、7122~7141、7125~7144、7151~7170、7353~7372、
 2、7362~7381、7683~7702、7688~7707、7690~7705、
 9、7692~7707、7692~7711、7694~7709、7694~7713、
 3、7696~7711、7696~7715、7767~7786、7785~7804、
 4、7786~7801、7787~7803、7787~7805、7787~7806、
 6、7788~7803、7788~7805、7788~7806、7788~7807、
 7、7789~7806、7789~7807、7789~7808、7790~7805、
 5、7790~7807、7790~7809、7791~7808、7791~7806、
 9、7791~7810、7792~7808、7792~7809、7792~7811、
 0、7792~7811、7793~7810、7793~7811、7793~7812、
 2、7794~7811、7794~7812、7794~7813、7795~7811、
 2、7795~7813、7795~7814、7796~7811、7796~7812、
 3、7796~7814、7796~7815、7797~7812、7797~7813、
 4、7797~7816、7798~7813、7798~7815、7798~7814、
 7、7799~7816、7799~7818、7800~7819、7801~7814、
 8、7801~7820、7802~7817、7802~7819、7802~7821、
 1、7803~7818、7803~7820、7803~7822、7804~7819、
 1、7804~7823、7805~7820、7805~7822、7805~7821、
 4、7806~7821、7806~7823、7806~7825、7807~7822、
 4、7807~7825、7807~7826、7808~7825、7808~7823、
 7、7809~7825、7809~7826、7809~7828、7810~7824、
 5、7810~7826、7810~7827、7810~7829、7811~7825、
 8、7811~7830、7812~7829、7812~7830、7812~7831、
 1、7813~7829、7813~7831、7813~7832、7814~7831、
 3、7815~7831、7815~7832、7815~7833、7815~7832、
 4、7816~7832、7816~7833、7816~7834、7816~7833、
 5、7817~7833、7817~7834、7817~7835、7817~7834、
 6、7818~7834、7818~7835、7818~7836、7818~7835、
 7、7819~7835、7819~7836、7819~7837、7819~7836、
 8、7820~7836、7820~7838、7820~7839、7821~7836、
 6、7821~7837、7821~7839、7821~7840、7822~7837、
 7、7822~7838、7822~7840、7822~7841、7823~7838、
 8、7823~7839、7823~7839、7823~7840、7823~7841、
 1、7823~7842、7824~7839、7824~7840、7824~7841、
 0、7824~7841、7824~7842、7824~7843、7825~7841、
 0、7825~7841、7825~7842、7825~7843、7825~7842、
 4、7826~7842、7826~7843、7826~7844、7826~7843、
 5、7827~7842、7827~7843、7827~7844、7827~7843、
 5、7827~7846、7828~7843、7828~7844、7828~7844、
 5、7828~7847、7829~7844、7829~7845、7829~7844

10

20

30

40

50

6、7829～7847、7829～7848、7830～7845、7830～784
 6、7830～7847、7830～7848、7830～7849、7831～784
 6、7831～7847、7831～7848、7831～7849、7831～785
 0、7832～7847、7832～7848、7832～7849、7832～785
 0、7832～7851、7833～7848、7833～7849、7833～785
 0、7833～7851、7833～7852、7834～7849、7834～785
 0、7834～7851、7834～7852、7834～7853、7835～785
 0、7835～7851、7835～7852、7835～7853、7835～785
 4、7836～7851、7836～7852、7836～7853、7836～785
 4、7836～7855、7837～7852、7837～7853、7837～785
 4、7837～7855、7837～7856、7838～7853、7838～785
 4、7838～7855、7838～7856、7838～7857、7839～785
 4、7839～7855、7839～7856、7839～7857、7839～785
 8、7840～7855、7840～7856、7840～7857、7840～785
 8、7840～7859、7841～7856、7841～7857、7841～785
 8、7841～7859、7841～7860、7842～7857、7842～785
 8、7842～7859、7842～7860、7842～7861、7843～785
 8、7843～7859、7843～7860、7843～7861、7843～786
 2、7844～7859、7844～7860、7844～7861、7844～786
 2、7845～7860、7845～7861、7845～7862、7846～786
 1、及び7846～7862。

【0179】

特定の実施形態では、配列番号1の以下のヌクレオチド領域が、アンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの標的となった時に、少なくとも60%の阻害を示す

: 48～63、150～169、152～171、154～169、154～173、1
 56～171、156～175、158～173、158～177、600～619、1
 135～1154、1141～1160、1147～1166、1153～1172、1
 171～1186、1173～1188、1175～1190、1749～1768、1
 763～1782、1763～1782、1912～1931、2189～2208、2
 191～2210、2193～2212、2195～2210、2195～2214、2
 197～2212、2197～2216、2223～2238、2225～2240、2
 227～2242、2238～2257、2448～2467、2453～2472、2
 455～2474、2457～2472、2457～2476、2459～2474、2
 459～2478、2461～2476、2461～2480、2550～2569、2
 551～2566、2552～2571、2553～2568、2553～2570、2
 553～2571、2553～2572、2554～2571、2554～2572、2
 554～2573、2555～2572、2555～2574、2556～2573、2
 556～2574、2556～2575、2557～2574、2557～2575、2
 557～2576、2558～2575、2558～2576、2558～2577、2
 559～2576、2559～2577、2559～2578、2560～2577、2
 560～2578、2560～2579、2561～2578、2561～2579、2
 561～2580、2562～2577、2562～2579、2562～2581、2
 563～2578、2563～2580、2563～2582、2564～2581、2
 564～2583、2565～2584、2566～2583、2566～2585、2
 567～2582、2567～2584、2567～2586、2568～2583、
 2568～2585、2568～2587、2569～2586、2569～2588、
 2570～2587、2570～2589、2571～2588、2572～2590、
 2572～2591、2573～2590、2573～2592、2574～2591、
 2574～2593、2575～2590、2575～2592、2575～2594、
 2576～2593、2576～2595、2577～2594、2577～2595、

10

20

30

40

50

2 5 7 7 ~ 2 5 9 6、 2 5 7 8 ~ 2 5 9 4、 2 5 7 8 ~ 2 5 9 7、 2 5 7 9 ~ 2 5 9 8、
 2 5 8 0 ~ 2 5 9 6、 2 5 8 0 ~ 2 5 9 7、 2 5 8 0 ~ 2 5 9 8、 2 5 8 0 ~ 2 5 9 9、
 2 5 8 1 ~ 2 5 9 7、 2 5 8 1 ~ 2 5 9 8、 2 5 8 1 ~ 2 5 9 9、 2 5 8 1 ~ 2 6 0 0、
 2 5 8 2 ~ 2 5 9 8、 2 5 8 2 ~ 2 5 9 9、 2 5 8 2 ~ 2 6 0 0、 2 5 8 2 ~ 2 6 0 1、
 2 5 8 3 ~ 2 5 9 9、 2 5 8 3 ~ 2 6 0 0、 2 5 8 3 ~ 2 6 0 1、 2 5 8 3 ~ 2 6 0 2、
 2 5 8 4 ~ 2 6 0 0、 2 5 8 4 ~ 2 6 0 2、 2 5 8 4 ~ 2 6 0 3、 2 5 8 5 ~ 2 6 0 1、
 2 5 8 5 ~ 2 6 0 3、 2 5 8 5 ~ 2 6 0 4、 2 5 8 6 ~ 2 6 0 2、 2 5 8 6 ~ 2 6 0 4、
 2 5 8 6 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 7 ~ 2 6 0 3、 2 5 8 7 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 7 ~ 2 6 0 6、
 2 5 8 8 ~ 2 6 0 3、 2 5 8 8 ~ 2 6 0 4、 2 5 8 8 ~ 2 6 0 6、 2 5 8 8 ~ 2 6 0 7、
 2 5 8 9 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 6、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 7、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 8、 10
 2 5 9 0 ~ 2 6 0 5、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 6、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 7、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 8、
 2 5 9 0 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 1 ~ 2 6 0 7、 2 5 9 1 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 1 ~ 2 6 1 0、
 2 5 9 2 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 2 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 2 ~ 2 6 1 1、 2 5 9 3 ~ 2 6 0 8、
 2 5 9 3 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 3 ~ 2 6 1 2、 2 5 9 4 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 4 ~ 2 6 1 0、
 2 5 9 4 ~ 2 6 1 1、 2 5 9 4 ~ 2 6 1 2、 2 5 9 4 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 0、
 2 5 9 5 ~ 2 6 1 1、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 2、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 4、
 2 5 9 6 ~ 2 6 1 1、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 2、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 4、
 2 5 9 6 ~ 2 6 1 5、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 2、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 4、
 2 5 9 7 ~ 2 6 1 5、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 6、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 4、
 2 5 9 8 ~ 2 6 1 5、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 6、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 7、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 4、 20
 2 5 9 9 ~ 2 6 1 5、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 6、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 7、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 8、
 2 6 0 0 ~ 2 6 1 5、 2 6 0 0 ~ 2 6 1 6、 2 6 0 0 ~ 2 6 1 7、 2 6 0 0 ~ 2 6 1 8、
 2 6 0 0 ~ 2 6 1 9、 2 6 0 1 ~ 2 6 1 6、 2 6 0 1 ~ 2 6 1 7、 2 6 0 1 ~ 2 6 1 8、
 2 6 0 1 ~ 2 6 1 9、 2 6 0 1 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 2 ~ 2 6 1 7、 2 6 0 2 ~ 2 6 1 8、
 2 6 0 2 ~ 2 6 1 9、 2 6 0 2 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 2 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 3 ~ 2 6 1 8、
 2 6 0 3 ~ 2 6 1 9、 2 6 0 3 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 3 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 3 ~ 2 6 2 2、
 2 6 0 4 ~ 2 6 1 9、 2 6 0 4 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 4 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 4 ~ 2 6 2 2、
 2 6 0 4 ~ 2 6 2 3、 2 6 0 5 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 5 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 5 ~ 2 6 2 2、
 2 6 0 5 ~ 2 6 2 3、 2 6 0 5 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 6 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 6 ~ 2 6 2 2、
 2 6 0 6 ~ 2 6 2 3、 2 6 0 6 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 6 ~ 2 6 2 5、 2 6 0 7 ~ 2 6 2 2、 30
 2 6 0 7 ~ 2 6 2 3、 2 6 0 7 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 7 ~ 2 6 2 5、 2 6 0 7 ~ 2 6 2 6、
 2 6 0 8 ~ 2 6 2 3、 2 6 0 8 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 8 ~ 2 6 2 5、 2 6 0 8 ~ 2 6 2 5、
 2 6 0 8 ~ 2 6 2 6、 2 6 0 8 ~ 2 6 2 7、 2 6 0 9 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 9 ~ 2 6 2 5、
 2 6 0 9 ~ 2 6 2 6、 2 6 0 9 ~ 2 6 2 7、 2 6 0 9 ~ 2 6 2 8、 2 6 1 0 ~ 2 6 2 5、
 2 6 1 0 ~ 2 6 2 6、 2 6 1 0 ~ 2 6 2 7、 2 6 1 0 ~ 2 6 2 8、 2 6 1 0 ~ 2 6 2 9、
 2 6 1 1 ~ 2 6 2 6、 2 6 1 1 ~ 2 6 2 6、 2 6 1 1 ~ 2 6 2 7、 2 6 1 1 ~ 2 6 2 8、
 2 6 1 1 ~ 2 6 2 9、 2 6 1 1 ~ 2 6 3 0、 2 6 1 2 ~ 2 6 2 7、 2 6 1 2 ~ 2 6 2 8、
 2 6 1 2 ~ 2 6 2 9、 2 6 1 2 ~ 2 6 3 0、 2 6 1 2 ~ 2 6 3 1、 2 6 1 3 ~ 2 6 2 8、
 2 6 1 3 ~ 2 6 2 9、 2 6 1 3 ~ 2 6 3 0、 2 6 1 3 ~ 2 6 3 1、 2 6 1 4 ~ 2 6 2 9、
 2 6 1 4 ~ 2 6 3 0、 2 6 1 4 ~ 2 6 3 1、 2 6 1 5 ~ 2 6 3 0、 2 6 1 5 ~ 2 6 3 0、 40
 2 6 1 5 ~ 2 6 3 1、 2 6 1 5 ~ 2 6 3 1、 及び 2 6 1 6 ~ 2 6 3 1。

【 0 1 8 0 】

特定の実施形態では、配列番号 2 の以下のヌクレオチド領域が、アンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの標的となった時に、少なくとも 60% の阻害を示す：

1 6 8 5 ~ 1 7 0 4、 1 6 8 6 ~ 1 7 0 5、 1 7 6 9 ~ 1 7 8 4、 1 8 7 1 ~ 1 8 9
 0、 1 8 7 3 ~ 1 8 9 2、 1 8 7 5 ~ 1 8 9 0、 1 8 7 5 ~ 1 8 9 4、 1 8 7 7 ~ 1 8 9
 2、 1 8 7 7 ~ 1 8 9 6、 1 8 7 9 ~ 1 8 9 4、 1 8 7 9 ~ 1 8 9 8、 2 8 0 8 ~ 2 8 2
 7、 3 8 1 9 ~ 3 8 3 8、 3 8 2 5 ~ 3 8 4 4、 3 8 3 1 ~ 3 8 5 0、 3 8 3 7 ~ 3 8 5
 6、 4 1 5 1 ~ 4 1 6 6、 5 8 9 0 ~ 5 9 0 9、 5 9 0 4 ~ 5 9 2 3、 5 9 0 4 ~ 5 9 2
 3、 6 4 0 6 ~ 6 4 2 5、 6 9 7 7 ~ 6 9 9 6、 6 9 7 9 ~ 6 9 9 8、 6 9 8 1 ~ 7 0 0 50

0、6983~6998、6983~7002、6985~7000、6985~700
4、7122~7141、7683~7702、7688~7707、7690~770
9、7692~7707、7692~7711、7694~7709、7696~771
1、7696~7715、7786~7801、7787~7806、7788~780
3、7788~7805、7788~7806、7788~7807、7789~780
6、7789~7807、7789~7808、7790~7807、7790~780
9、7791~7808、7791~7809、7791~7810、7792~780
9、7792~7810、7792~7811、7793~7810、7793~781
1、7793~7812、7794~7811、7794~7812、7794~781
3、7795~7812、7795~7813、7795~7814、7796~781
3、7796~7814、7796~7815、7797~7812、7797~781
4、7797~7816、7798~7813、7798~7815、7798~781
7、7799~7816、7799~7818、7800~7819、7801~781
8、7801~7820、7802~7817、7802~7819、7802~782
1、7803~7818、7803~7820、7803~7822、7804~782
1、7804~7823、7805~7822、7805~7824、7806~782
3、7806~7825、7807~7824、7807~7825、7807~782
6、7808~7825、7808~7827、7809~7826、7809~782
8、7810~7825、7810~7827、7810~7829、7811~782
8、7811~7830、7812~7829、7812~7830、7812~783
1、7813~7829、7813~7832、7814~7833、7815~783
1、7815~7832、7815~7833、7815~7834、7816~783
2、7816~7833、7816~7834、7816~7835、7817~783
3、7817~7834、7817~7835、7817~7836、7818~783
4、7818~7835、7818~7836、7818~7837、7819~783
5、7819~7837、7819~7838、7820~7836、7820~783
8、7820~7839、7821~7837、7821~7839、7821~784
0、7822~7838、7822~7840、7822~7841、7823~783
8、7823~7839、7823~7841、7823~7842、7824~784
0、7824~7841、7824~7842、7824~7843、7825~784
0、7825~7841、7825~7842、7825~7843、7825~784
4、7826~7842、7826~7844、7826~7845、7827~784
3、7827~7844、7827~7846、7828~7843、7828~784
4、7828~7847、7829~7844、7829~7845、7829~784
6、7829~7847、7829~7848、7830~7845、7830~784
6、7830~7847、7830~7848、7830~7849、7831~784
6、7831~7847、7831~7848、7831~7849、7831~785
0、7832~7847、7832~7848、7832~7849、7832~785
0、7832~7851、7833~7848、7833~7849、7833~785
0、7833~7851、7833~7852、7834~7849、7834~785
0、7834~7851、7834~7852、7834~7853、7835~785
0、7835~7851、7835~7852、7835~7853、7835~785
4、7836~7851、7836~7852、7836~7853、7836~785
4、7836~7855、7837~7852、7837~7853、7837~785
4、7837~7855、7837~7856、7838~7853、7838~785
4、7838~7855、7838~7856、7838~7857、7839~785
4、7839~7855、7839~7856、7839~7857、7839~785
8、7840~7855、7840~7856、7840~7857、7840~785
8、7840~7859、7841~7856、7841~7857、7841~785
8、7841~7859、7841~7860、7842~7857、7842~785

10

20

30

40

50

8、7842～7859、7842～7860、7842～7861、7843～785
 8、7843～7859、7843～7860、7843～7861、7843～786
 2、7844～7859、7844～7860、7844～7861、7844～786
 2、7845～7860、7845～7861、7845～7862、7846～786
 1、7846～7862、及び7847～7862。

【0181】

特定の実施形態では、配列番号1の以下のヌクレオチド領域が、アンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの標的となった時に、少なくとも70%の阻害を示す

: 48～63、150～169、152～171、154～169、154～173、1
 56～171、156～175、158～173、158～177、1135～1154 10
 、1141～1160、1147～1166、1171～1186、1173～1188
 、1175～1190、1749～1768、1763～1782、1912～1931
 、2193～2212、2195～2210、2195～2214、2197～2212
 、2197～2216、2223～2238、2225～2240、2227～2242
 、2453～2472、2455～2474、2457～2472、2457～2476
 、2459～2474、2461～2476、2461～2480、2550～2569
 、2551～2566、2552～2571、2553～2570、2553～2571
 、2553～2572、2554～2571、2554～2572、2554～2573
 、2554～2573、2555～2572、2555～2574、2555～2574
 、2556～2573、2556～2574、2556～2575、2557～2574 20
 、2557～2576、2558～2575、2558～2576、2558～2577
 、2559～2576、2559～2577、2559～2578、2560～2577
 、2560～2578、2560～2579、2561～2578、2561～2579
 、2561～2580、2562～2577、2562～2579、2562～2581
 、2563～2578、2563～2580、2563～2582、2564～2581
 、2564～2583、2565～2584、2566～2583、2566～2585
 、2567～2582、2567～2584、2567～2586、2568～2585
 、2568～2587、2569～2586、2569～2588、2570～2587
 、2570～2589、2571～2588、2571～2590、2572～2589
 、2572～2591、2573～2590、2573～2592、2574～2591 30
 、2574～2593、2575～2592、2575～2594、2576～2593
 、2576～2595、2577～2594、2577～2596、2578～2597
 、2579～2598、2580～2596、2580～2598、2580～2599
 、2581～2597、2581～2600、2582～2598、2582～2600
 、2582～2601、2583～2599、2583～2601、2583～2602
 、2584～2600、2584～2602、2584～2603、2585～2601
 、2585～2603、2585～2604、2586～2605、2587～2606
 、2588～2604、2588～2606、2588～2607、2589～2605
 、2589～2606、2589～2607、2589～2608、2590～2605
 、2590～2606、2590～2607、2590～2609、2591～2607 40
 、2591～2610、2592～2611、2593～2608、2593～2612
 、2594～2609、2594～2610、2594～2612、2594～2613
 、2595～2610、2595～2611、2595～2612、2595～2613
 、2595～2614、2596～2611、2596～2614、2596～2615
 、2597～2612、2597～2613、2597～2614、2597～261
 5、2597～2616、2598～2613、2598～2614、2598～261
 5、2598～2616、2598～2617、2599～2614、2599～261
 5、2599～2616、2599～2617、2599～2618、2600～261
 5、2600～2616、2600～2617、2600～2618、2600～261
 9、2601～2616、2601～2617、2601～2618、2601～261 50

9、2601~2620、2602~2617、2602~2618、2602~261
 9、2602~2620、2602~2621、2603~2619、2603~262
 0、2603~2621、2603~2622、2604~2619、2604~262
 0、2604~2621、2604~2622、2604~2623、2605~262
 0、2605~2621、2605~2622、2605~2623、2605~262
 4、2606~2621、2606~2622、2606~2623、2606~262
 4、2606~2625、2607~2622、2607~2623、2607~262
 4、2607~2625、2607~2626、2608~2623、2608~262
 4、2608~2625、2608~2626、2608~2627、2609~262
 4、2609~2625、2609~2626、2609~2627、2609~262
 8、2610~2625、2610~2626、2610~2627、2610~262
 8、2610~2629、2611~2626、2611~2627、2611~262
 9、2611~2630、2612~2627、2612~2628、2612~262
 9、2612~2630、2612~2631、2613~2628、2613~262
 9、2613~2630、2613~2631、2614~2629、2614~263
 0、2614~2631、2615~2630、2615~2630、2615~263
 1、及び2616~2631。

【0182】

特定の実施形態では、配列番号2の以下のヌクレオチド領域が、アンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの標的となった時に、少なくとも70%の阻害を示す

: 1685~1704、1686~1705、1769~1784、1871~1890
 、1873~1892、1875~1890、1875~1894、1877~1892
 、1877~1896、1879~1894、1879~1898、3819~3838
 、3825~3844、3831~3850、4151~4166、5890~5909
 、5904~5923、5904~5923、6406~6425、6983~6998
 、6983~7002、6985~7000、6985~7004、7688~7707
 、7690~7709、7692~7707、7692~7711、7694~7709
 、7696~7711、7696~7715、7786~7801、7787~7806
 、7788~7805、7788~7806、7788~7807、7789~7806
 、7789~7807、7789~7808、7790~7807、7790~7809
 、7791~7808、7791~7809、7791~7810、7792~7809
 、7792~7811、7793~7810、7793~7811、7793~7812
 、7794~7811、7794~7812、7794~7813、7795~7812
 、7795~7813、7795~7814、7796~7813、7796~7814
 、7796~7815、7797~7812、7797~7814、7797~7816
 、7798~7813、7798~7815、7798~7817、7799~7816
 、7799~7818、7800~7819、7801~7818、7801~7820
 、7802~7817、7802~7819、7802~7821、7803~7820
 、7803~7822、7804~7821、7804~7823、7805~7822
 、7805~7824、7806~7823、7806~7825、7807~7824
 、7807~7826、7808~7825、7808~7827、7809~7826
 、7809~7828、7810~7827、7811~7828、7811~7830
 、7812~7829、7812~7831、7813~7832、7814~7833
 、7815~7831、7815~7833、7815~7834、7816~7832
 、7816~7835、7817~7833、7817~7835、7817~783
 6、7818~7834、7818~7836、7818~7837、7819~783
 5、7819~7837、7819~7838、7820~7836、7820~783
 8、7820~7839、7821~7840、7822~7841、7823~783
 9、7823~7841、7823~7842、7824~7840、7824~784
 1、7824~7842、7824~7843、7825~7840、7825~784

10

20

30

40

50

1、7825～7842、7825～7844、7826～7842、7826～784
 5、7827～7846、7828～7843、7828～7847、7829～784
 4、7829～7845、7829～7847、7829～7848、7830～784
 5、7830～7846、7830～7847、7830～7848、7830～784
 9、7831～7846、7831～7849、7831～7850、7832～784
 7、7832～7848、7832～7849、7832～7850、7832～785
 1、7833～7848、7833～7849、7833～7850、7833～785
 1、7833～7852、7834～7849、7834～7850、7834～785
 1、7834～7852、7834～7853、7835～7850、7835～785
 1、7835～7852、7835～7853、7835～7854、7836～785
 1、7836～7852、7836～7853、7836～7854、7836～785
 5、7837～7852、7837～7853、7837～7854、7837～785
 5、7837～7856、7838～7854、7838～7855、7838～785
 6、7838～7857、7839～7854、7839～7855、7839～785
 6、7839～7857、7839～7858、7840～7855、7840～785
 6、7840～7857、7840～7858、7840～7859、7841～785
 6、7841～7857、7841～7858、7841～7859、7841～786
 0、7842～7857、7842～7858、7842～7859、7842～786
 0、7842～7861、7843～7858、7843～7859、7843～786
 0、7843～7861、7843～7862、7844～7859、7844～786
 0、7844～7861、7844～7862、7845～7860、7845～786
 1、7845～7862、7846～7861、7846～7862、及び7847～7
 862。

【0183】

特定の実施形態では、配列番号1の以下のヌクレオチド領域が、アンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの標的となった時に、少なくとも80%の阻害を示す

: 152～171、154～169、156～171、158～173、1135～11
 54、1171～1186、1173～1188、1175～1190、1763～17
 82、1912～1931、2197～2212、2223～2238、2225～22
 40、2227～2242、2457～2472、2459～2474、2461～24
 76、2551～2566、2553～2570、2553～2571、2553～25
 72、2554～2573、2555～2572、2555～2574、2556～25
 73、2556～2574、2556～2575、2557～2574、2557～25
 76、2558～2575、2558～2576、2559～2577、2559～25
 78、2560～2577、2560～2578、2560～2579、2561～25
 78、2561～2579、2561～2580、2562～2577、2562～25
 79、2562～2581、2563～2580、2563～2582、2564～25
 81、2564～2583、2565～2584、2566～2583、2567～25
 84、2567～2586、2568～2585、2568～2587、2569～25
 86、2569～2588、2570～2587、2571～2588、2571～25
 90、2572～2589、2572～2591、2573～2590、2573～25
 92、2574～2591、2574～2593、2575～2592、2576～25
 93、2576～2595、2577～2594、2577～2596、2578～25
 97、2580～2598、2580～2599、2581～2597、2581～26
 00、2582～2601、2583～2602、2584～2603、2585～2
 604、2586～2605、2587～2606、2588～2607、2589～2
 608、2590～2606、2590～2607、2590～2609、2591～2
 610、2592～2611、2593～2608、2593～2612、2594～2
 613、2595～2611、2595～2614、2596～2615、2597～2
 612、2597～2613、2597～2614、2597～2615、2597～2

10

20

30

40

50

6 1 6、2 5 9 8 ~ 2 6 1 3、2 5 9 8 ~ 2 6 1 3、2 5 9 8 ~ 2 6 1 4、2 5 9 8 ~ 2
 6 1 5、2 5 9 8 ~ 2 6 1 6、2 5 9 8 ~ 2 6 1 7、2 5 9 9 ~ 2 6 1 4、2 5 9 9 ~ 2
 6 1 7、2 5 9 9 ~ 2 6 1 8、2 6 0 0 ~ 2 6 1 5、2 6 0 0 ~ 2 6 1 7、2 6 0 0 ~ 2
 6 1 8、2 6 0 0 ~ 2 6 1 9、2 6 0 1 ~ 2 6 1 6、2 6 0 1 ~ 2 6 1 7、2 6 0 1 ~ 2
 6 1 9、2 6 0 1 ~ 2 6 2 0、2 6 0 2 ~ 2 6 1 8、2 6 0 2 ~ 2 6 2 1、2 6 0 3 ~ 2
 6 2 0、2 6 0 3 ~ 2 6 2 1、2 6 0 3 ~ 2 6 2 2、2 6 0 4 ~ 2 6 1 9、2 6 0 4 ~ 2
 6 2 0、2 6 0 4 ~ 2 6 2 1、2 6 0 4 ~ 2 6 2 2、2 6 0 4 ~ 2 6 2 3、2 6 0 5 ~ 2
 6 2 0、2 6 0 5 ~ 2 6 2 1、2 6 0 5 ~ 2 6 2 2、2 6 0 5 ~ 2 6 2 3、2 6 0 5 ~ 2
 6 2 4、2 6 0 6 ~ 2 6 2 1、2 6 0 6 ~ 2 6 2 2、2 6 0 6 ~ 2 6 2 3、2 6 0 6 ~ 2
 6 2 4、2 6 0 6 ~ 2 6 2 5、2 6 0 7 ~ 2 6 2 2、2 6 0 7 ~ 2 6 2 3、2 6 0 7 ~ 2
 6 2 4、2 6 0 7 ~ 2 6 2 5、2 6 0 7 ~ 2 6 2 6、2 6 0 8 ~ 2 6 2 3、2 6 0 8 ~ 2
 6 2 4、2 6 0 8 ~ 2 6 2 5、2 6 0 8 ~ 2 6 2 7、2 6 0 9 ~ 2 6 2 4、2 6 0 9 ~ 2
 6 2 6、2 6 0 9 ~ 2 6 2 7、2 6 0 9 ~ 2 6 2 8、2 6 1 0 ~ 2 6 2 5、2 6 1 0 ~ 2
 6 2 6、2 6 1 0 ~ 2 6 2 8、2 6 1 0 ~ 2 6 2 9、2 6 1 1 ~ 2 6 2 6、2 6 1 1 ~ 2
 6 2 7、2 6 1 1 ~ 2 6 2 9、2 6 1 1 ~ 2 6 3 0、2 6 1 2 ~ 2 6 2 7、2 6 1 2 ~ 2
 6 2 8、2 6 1 2 ~ 2 6 3 0、2 6 1 2 ~ 2 6 3 1、2 6 1 3 ~ 2 6 2 8、2 6 1 3 ~ 2
 6 2 9、2 6 1 3 ~ 2 6 3 1、2 6 1 4 ~ 2 6 2 9、2 6 1 4 ~ 2 6 3 0、2 6 1 4 ~ 2
 6 3 1、2 6 1 5 ~ 2 6 3 0、及び 2 6 1 6 ~ 2 6 3 1。

【 0 1 8 4 】

特定の実施形態では、配列番号 2 の以下のヌクレオチド領域が、アンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの標的となった時に、少なくとも 80% の阻害を示す

: 1 6 8 5 ~ 1 7 0 4、1 6 8 6 ~ 1 7 0 5、1 8 7 3 ~ 1 8 9 2、1 8 7 5 ~ 1 8 9 0
 、 1 8 7 7 ~ 1 8 9 2、1 8 7 9 ~ 1 8 9 4、3 8 1 9 ~ 3 8 3 8、4 1 5 1 ~ 4 1 6 6
 、 5 9 0 4 ~ 5 9 2 3、6 4 0 6 ~ 6 4 2 5、6 9 8 5 ~ 7 0 0 0、7 6 9 2 ~ 7 7 0 7
 、 7 6 9 4 ~ 7 7 0 9、7 6 9 6 ~ 7 7 1 1、7 7 8 6 ~ 7 8 0 1、7 7 8 8 ~ 7 8 0 5
 、 7 7 8 8 ~ 7 8 0 6、7 7 8 8 ~ 7 8 0 7、7 7 8 9 ~ 7 8 0 8、7 7 9 0 ~ 7 8 0 7
 、 7 7 9 0 ~ 7 8 0 9、7 7 9 1 ~ 7 8 0 8、7 7 9 1 ~ 7 8 0 9、7 7 9 1 ~ 7 8 1 0
 、 7 7 9 2 ~ 7 8 0 9、7 7 9 2 ~ 7 8 1 1、7 7 9 3 ~ 7 8 1 0、7 7 9 3 ~ 7 8 1 1
 、 7 7 9 4 ~ 7 8 1 2、7 7 9 4 ~ 7 8 1 3、7 7 9 5 ~ 7 8 1 2、7 7 9 5 ~ 7 8 1 3
 、 7 7 9 5 ~ 7 8 1 4、7 7 9 6 ~ 7 8 1 3、7 7 9 6 ~ 7 8 1 4、7 7 9 6 ~ 7 8 1 5
 、 7 7 9 7 ~ 7 8 1 2、7 7 9 7 ~ 7 8 1 4、7 7 9 7 ~ 7 8 1 6、7 7 9 8 ~ 7 8 1 5
 、 7 7 9 8 ~ 7 8 1 7、7 7 9 9 ~ 7 8 1 6、7 7 9 9 ~ 7 8 1 8、7 8 0 0 ~ 7 8 1 9
 、 7 8 0 1 ~ 7 8 1 8、7 8 0 2 ~ 7 8 1 9、7 8 0 2 ~ 7 8 2 1、7 8 0 3 ~ 7 8 2 0
 、 7 8 0 3 ~ 7 8 2 2、7 8 0 4 ~ 7 8 2 1、7 8 0 4 ~ 7 8 2 3、7 8 0 5 ~ 7 8 2 2
 、 7 8 0 6 ~ 7 8 2 3、7 8 0 6 ~ 7 8 2 5、7 8 0 7 ~ 7 8 2 4、7 8 0 7 ~ 7 8 2 6
 、 7 8 0 8 ~ 7 8 2 5、7 8 0 8 ~ 7 8 2 7、7 8 0 9 ~ 7 8 2 6、7 8 0 9 ~ 7 8 2 8
 、 7 8 1 0 ~ 7 8 2 7、7 8 1 1 ~ 7 8 2 8、7 8 1 2 ~ 7 8 2 9、7 8 1 2 ~ 7 8 3 1
 、 7 8 1 3 ~ 7 8 3 2、7 8 1 4 ~ 7 8 3 3、7 8 1 5 ~ 7 8 3 4、7 8 1 6 ~ 7 8 3 2
 、 7 8 1 6 ~ 7 8 3 5、7 8 1 7 ~ 7 8 3 6、7 8 1 8 ~ 7 8 3 7、7 8 1 9 ~ 7 8 3 8
 、 7 8 2 0 ~ 7 8 3 9、7 8 2 1 ~ 7 8 4 0、7 8 2 2 ~ 7 8 4 1、7 8 2 3 ~ 7 8 4 2
 、 7 8 2 4 ~ 7 8 4 3、7 8 2 5 ~ 7 8 4 1、7 8 2 5 ~ 7 8 4 2、7 8 2 5 ~ 7 8 4 4
 、 7 8 2 6 ~ 7 8 4 5、7 8 2 7 ~ 7 8 4 6、7 8 2 8 ~ 7 8 4 3、7 8 2 8 ~ 7 8 4 7
 、 7 8 2 9 ~ 7 8 4 8、7 8 3 0 ~ 7 8 4 6、7 8 3 0 ~ 7 8 4 9、7 8 3 1 ~ 7 8 5 0
 、 7 8 3 2 ~ 7 8 4 7、7 8 3 2 ~ 7 8 4 8、7 8 3 2 ~ 7 8 4 9、7 8 3 2 ~ 7 8 5 0
 、 7 8 3 2 ~ 7 8 5 1、7 8 3 3 ~ 7 8 4 8、7 8 3 3 ~ 7 8 4 9、7 8 3 3 ~ 7 8 5
 0、7 8 3 3 ~ 7 8 5 1、7 8 3 3 ~ 7 8 5 2、7 8 3 4 ~ 7 8 4 9、7 8 3 4 ~ 7 8 5
 2、7 8 3 4 ~ 7 8 5 3、7 8 3 5 ~ 7 8 5 0、7 8 3 5 ~ 7 8 5 2、7 8 3 5 ~ 7 8 5
 3、7 8 3 5 ~ 7 8 5 4、7 8 3 6 ~ 7 8 5 1、7 8 3 6 ~ 7 8 5 2、7 8 3 6 ~ 7 8 5
 4、7 8 3 6 ~ 7 8 5 5、7 8 3 7 ~ 7 8 5 3、7 8 3 7 ~ 7 8 5 6、7 8 3 8 ~ 7 8 5
 5、7 8 3 8 ~ 7 8 5 6、7 8 3 8 ~ 7 8 5 7、7 8 3 9 ~ 7 8 5 4、7 8 3 9 ~ 7 8 5

10

20

30

40

50

5、7839～7856、7839～7857、7839～7858、7840～7855、7840～7856、7840～7857、7840～7858、7840～7859、7841～7856、7841～7857、7841～7858、7841～7859、7841～7860、7842～7857、7842～7858、7842～7859、7842～7860、7842～7861、7843～7858、7843～7859、7843～7860、7843～7862、7844～7859、7844～7860、7844～7861、7844～7862、7845～7860、7845～7861、7845～7862、及び7847～7862。

【0185】

特定の実施形態では、配列番号1の以下のヌクレオチド領域が、アンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの標的となった時に、少なくとも90%の阻害を示す

: 154～169、156～171、158～173、1135～1154、1171～1186、1173～1188、1763～1782、1912～1931、2223～2238、2227～2242、2459～2474、2461～2476、2554～2573、2555～2574、2560～2577、2561～2578、2561～2579、2562～2581、2563～2580、2563～2582、2564～2581、2566～2583、2567～2584、2568～2585、2568～2587、2569～2586、2570～2587、2576～2593、2577～2594、2577～2596、2578～2597、2580～2599、2581～2600、2582～2601、2583～2602、2584～2603、2586～2605、2587～2605、2587～2606、2588～2607、2589～2608、2590～2607、2590～2609、2592～2611、2595～2614、2596～2615、2597～2612、2597～2613、2597～2615、2597～2616、2598～2613、2598～2613、2598～2617、2599～2614、2599～2618、2600～2615、2600～2619、2601～2617、2601～2620、2602～2621、2603～2622、2604～2623、2605～2621、2605～2622、2605～2624、2606～2625、2607～2626、2608～2623、2608～2625、2609～2628、2611～2627、2611～2630、2612～2628、2612～2631、2613～2629、2614～2629、2615～2630、及び2616～2631。

【0186】

特定の実施形態では、配列番号2の以下のヌクレオチド領域が、アンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの標的となった時に、少なくとも90%の阻害を示す

: 1685～1704、1686～1705、1875～1890、1877～1892、1879～1894、3819～3838、5904～5923、6406～6425、7694～7709、7696～7711、7789～7808、7790～7809、7795～7812、7795～7813、7796～7813、7796～7814、7797～7814、7797～7816、7798～7815、7798～7817、7799～7816、7801～7818、7802～7819、7803～7820、7803～7822、7804～7821、7805～7822、7811～7828、7812～7829、7812～7831、7813～7832、7815～7834、7818～7837、7819～7838、7821～7840、7822～7840、7822～7841、7825～7842、7832～7847、7832～7848、7832～7850、7833～7848、7833～7852、7834～7849、7834～7853、7835～7850、7836～7852、7836～7855、7837～7856、7838～7856、7839～7857、7839～7858、7840～7856、7840～7857、7840～7859、7843～7858、7843～7860、及び7846～7862。

【0187】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、以下のアンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドがCFB核酸の一領域を標的とし、少なくとも50%のCFB mRNA阻害を達成する；ISIS番号：516350、532614、532632、532635、532638、532639、532686、532687、532688、532689、532690、532691、532692、532692、532693、532694、532695、532696、532697、532698、532699、532700、532701、532702、532703、532704、532705、532706、532707、532770、532775、532778、532780、532791、532800、532809、532810、532811、532917、532952、588509、588510、588511、588512、588513、588514、588515、588516、588517、588518、588519、588520、588522、588523、588524、588525、588527、588528、588529、588530、588531、588532、588533、588534、588535、588536、588537、588538、588539、588540、588541、588542、588543、588544、588545、588546、588547、588548、588549、588550、588551、588552、588553、588554、588555、588556、588557、588558、588559、588560、588561、588562、588563、588564、588565、588566、588567、588568、588569、588570、588571、588572、588573、588574、588575、588576、588577、588580、588581、588585、588586、588589、588590、588599、588603、588606、588608、588610、588614、588616、588628、588631、588632、588634、588636、588638、588640、588645、588646、588654、588656、588658、588660、588662、588664、588670、588672、588676、588682、588688、588696、588698、588807、588808、588809、588813、588814、588815、588819、588820、588822、588823、588838、588839、588840、588841、588842、588846、588847、588848、588849、588850、588851、588852、588853、588854、588855、588856、588857、588858、588859、588860、588861、588862、588863、588864、588865、588866、588867、588868、588870、588871、588872、588873、588874、588875、588876、588877、588878、588879、588880、588881、588882、588883、588884、598999、599000、599001、599002、599003、599004、599005、599006、599007、599008、599009、599010、599011、599012、599013、599014、599015、599018、599019、599023、599024、599025、599026、599027、599028、599029、599030、599031、599032、599033、599034、599035、599058、599062、599063、599064、599065、599070、599071、599072、599073、599074、599076、599077、599078、599079、599080、599081、599082、599083、599084、599085、599086、599087、599088、599089、599090、599091、599092、599093、599094、599095、599096、599097、599098、599102、599119、599123、599124、599125、599126、599127、599128、599132、599133、599134、599135、599136、59

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

5 9 9 5 6 9、5 9 9 5 7 0、5 9 9 5 7 7、5 9 9 5 7 8、5 9 9 5 7 9、5 9 9 5 8
 0、5 9 9 5 8 1、5 9 9 5 8 1、5 9 9 5 8 2、5 9 9 5 8 4、5 9 9 5 8 5、5 9 9
 5 8 6、5 9 9 5 8 7、5 9 9 5 8 8、5 9 9 5 8 9、5 9 9 5 9 0、5 9 9 5 9 1、5
 9 9 5 9 2、5 9 9 5 9 3、5 9 9 5 9 4、5 9 9 5 9 5、6 0 1 3 2 1、6 0 1 3 2 2
 、6 0 1 3 2 3、6 0 1 3 2 5、6 0 1 3 2 7、6 0 1 3 2 8、6 0 1 3 2 9、6 0 1 3
 3 0、6 0 1 3 3 2、6 0 1 3 3 3、6 0 1 3 3 4、6 0 1 3 3 5、6 0 1 3 3 6、6 0
 1 3 3 7、6 0 1 3 3 8、6 0 1 3 3 9、6 0 1 3 4 1、6 0 1 3 4 2、6 0 1 3 4 3、
 6 0 1 3 4 4、6 0 1 3 4 5、6 0 1 3 4 6、6 0 1 3 4 7、6 0 1 3 4 8、6 0 1 3 4
 9、6 0 1 3 6 2、6 0 1 3 6 7、6 0 1 3 6 8、6 0 1 3 6 9、6 0 1 3 7 1、6 0 1
 3 7 2、6 0 1 3 7 3、6 0 1 3 7 4、6 0 1 3 7 5、6 0 1 3 7 7、6 0 1 3 7 8、6
 0 1 3 8 0、6 0 1 3 8 1、6 0 1 3 8 2、6 0 1 3 8 3、6 0 1 3 8 4、6 0 1 3 8 5
 、6 0 1 3 8 6、6 0 1 3 8 7、及び6 0 1 3 8 8。

10

【 0 1 8 8 】

特定の実施形態では、以下のアンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチド
 が C F B 核酸の一領域を標的とし、少なくとも 5 0 % の C F B m R N A 阻害を達成する
 ; 配列番号 : 1 2、3 0、3 3、3 6、3 7、8 4、8 5、8 6、8 7、8 8、8 9、9

0、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、1 0 0、1 0 1、
 1 0 2、1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 9 8、2 0 3、2 0 6、2 0 8、2 1 9、2 2 8、
 2 3 7、2 3 8、2 3 9、3 1 7、3 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8、3 9 9、4 0 0、
 4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4 0 5、4 0 6、4 0 7、4 0 8、4 0 9、4 1 0、
 4 1 1、4 1 2、4 1 3、4 1 4、4 1 5、4 1 6、4 1 7、4 1 8、4 1 9、4 2 0、
 4 2 1、4 2 2、4 2 3、4 2 4、4 2 5、4 2 6、4 2 7、4 2 8、4 2 9、4 3 0、
 4 3 1、4 3 2、4 3 3、4 3 4、4 3 4、4 3 5、4 3 6、4 3 7、4 3 8、4 3 9、
 4 4 0、4 4 1、4 4 2、4 4 3、4 4 4、4 4 5、4 4 6、4 4 7、4 4 8、4 4 9、
 4 5 0、4 5 1、4 5 2、4 5 3、4 5 4、4 5 5、4 5 6、4 5 7、4 5 8、4 5 9、
 4 6 0、4 6 1、4 6 2、4 6 3、4 6 4、4 6 5、4 6 8、4 7 2、4 7 3、4 7 5、
 4 7 8、4 7 9、4 8 8、4 9 2、4 9 4、4 9 5、4 9 8、4 9 9、5 0 0、5 0 2、
 5 0 3、5 0 9、5 1 0、5 1 1、5 1 2、5 1 3、5 1 4、5 1 5、5 1 7、5 1 8、
 5 2 2、5 2 3、5 2 4、5 2 5、5 2 9、5 3 0、5 3 1、5 3 4、5 3 5、5 3 7、
 5 4 0、5 4 1、5 4 2、5 4 3、5 4 4、5 4 5、5 4 6、5 4 7、5 4 9、5 5 0、
 5 5 1、5 5 2、5 5 3、5 5 4、5 5 5、5 5 6、5 5 7、5 5 8、5 5 9、5 6 3、
 5 6 4、5 6 5、5 6 9、5 7 0、5 7 2、5 7 3、5 7 7、5 8 8、5 8 9、5 9 0、
 5 9 1、5 9 2、5 9 4、5 9 5、5 9 6、5 9 7、5 9 8、5 9 9、6 0 0、6 0 1、
 6 0 2、6 0 3、6 0 4、6 0 5、6 0 6、6 0 7、6 0 8、6 0 9、6 1 0、6 1 1、
 6 1 2、6 1 3、6 1 4、6 1 5、6 1 6、6 1 7、6 1 8、6 1 9、6 2 3、6 4 0、
 6 4 1、6 4 4、6 4 5、6 4 6、6 4 7、6 4 8、6 4 9、6 5 0、6 5 1、6 5 2、
 6 5 3、6 5 4、6 5 5、6 5 6、6 5 7、6 5 8、6 5 9、6 6 0、6 6 1、6 6 2、
 6 6 3、6 6 4、6 6 5、6 6 6、6 6 7、6 6 8、6 6 9、6 7 0、6 7 1、6 7 2、
 6 7 3、6 7 4、6 7 5、6 7 6、6 7 7、6 7 8、6 7 9、6 8 0、6 8 1、6 8 2、
 6 8 3、6 8 4、6 8 5、6 8 6、6 8 7、6 8 8、6 8 9、7 0 0、7 0 4、7 0 5、
 7 0 6、7 0 7、7 0 8、7 0 9、7 1 1、7 1 2、7 1 3、7 1 4、7 1 5、7 1 6、
 7 1 7、7 1 8、7 2 0、7 2 1、7 2 2、7 2 3、7 2 4、7 2 5、7 2 6、7 2 7、
 7 2 8、7 2 9、7 3 0、7 3 1、7 3 2、7 3 3、7 3 4、7 3 5、7 3 6、7 3 7、
 7 3 8、7 3 9、7 4 0、7 4 1、7 4 2、7 4 3、7 4 4、7 4 5、7 4 5、7 4 6、
 7 4 7、7 4 8、7 4 9、7 5 0、7 5 1、7 5 2、7 5 3、7 5 4、7 5 5、7 5 6
 、7 5 8、7 5 9、7 6 0、7 6 1、7 6 2、7 6 6、7 6 7、7 6 8、7 6 9、7 7 0
 、7 7 1、7 7 2、7 7 3、7 7 4、7 7 5、7 7 6、7 7 7、7 7 8、7 7 9、7 8 0
 、7 8 1、7 8 2、7 8 3、7 8 4、7 8 5、7 8 6、7 8 7、7 8 8、7 8 9、7 9 0
 、7 9 1、7 9 2、7 9 3、7 9 4、7 9 5、7 9 6、7 9 7、7 9 8、7 9 9、8 1 3
 、8 3 3、8 3 4、8 4 1、8 4 6、8 4 9、8 5 0、8 6 7、及び8 7 3

20

30

40

50

【 0 1 8 9 】

特定の実施形態では、以下のアンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドがCFB核酸の一領域を標的とし、少なくとも60%のCFB mRNA阻害を達成する

; ISIS番号: 5 1 6 3 5 0、5 3 2 6 1 4、5 3 2 6 3 5、5 3 2 6 8 6、5 3 2 6 8 7、5 3 2 6 8 8、5 3 2 6 8 9、5 3 2 7 7 0、5 3 2 8 0 0、5 3 2 8 0 9、5 3 2 8 1 0、5 3 2 8 1 1、5 3 2 9 1 7、5 3 2 9 5 2、5 8 8 5 1 2、5 8 8 5 1 3、5 8 8 5 1 4、5 8 8 5 1 5、5 8 8 5 1 6、5 8 8 5 1 7、5 8 8 5 1 8、5 8 8 5 1 9、5 8 8 5 2 2、5 8 8 5 2 3、5 8 8 5 2 4、5 8 8 5 2 5、5 8 8 5 2 7、5 8 8 5 2 8、5 8 8 5 2 9、5 8 8 5 3 0、5 8 8 5 3 1、5 8 8 5 3 2、5 8 8 5 3 3、5 8 8 5 3 4、5 8 8 5 3 5、5 8 8 5 3 6、5 8 8 5 3 7、5 8 8 5 3 8、5 8 8 5 3 9、5 8 8 5 4 0、5 8 8 5 4 1、5 8 8 5 4 2、5 8 8 5 4 3、5 8 8 5 4 4、5 8 8 5 4 5、5 8 8 5 4 6、5 8 8 5 4 7、5 8 8 5 4 8、5 8 8 5 4 9、5 8 8 5 5 0、5 8 8 5 5 1、5 8 8 5 5 2、5 8 8 5 5 3、5 8 8 5 5 4、5 8 8 5 5 5、5 8 8 5 5 6、5 8 8 5 5 7、5 8 8 5 5 8、5 8 8 5 5 9、5 8 8 5 6 0、5 8 8 5 6 1、5 8 8 5 6 2、5 8 8 5 6 3、5 8 8 5 6 4、5 8 8 5 6 5、5 8 8 5 6 6、5 8 8 5 6 7、5 8 8 5 6 8、5 8 8 5 6 9、5 8 8 5 7 0、5 8 8 5 7 1、5 8 8 5 7 2、5 8 8 5 7 3、5 8 8 5 7 4、5 8 8 5 7 5、5 8 8 5 7 6、5 8 8 5 7 7、5 8 8 6 3 6、5 8 8 6 3 8、5 8 8 6 4 0、5 8 8 6 6 4、5 8 8 6 7 6、5 8 8 6 9 6、5 8 8 6 9 8、5 8 8 8 0 7、5 8 8 8 0 8、5 8 8 8 1 4、5 8 8 8 1 5、5 8 8 8 1 9、5 8 8 8 2 0、5 8 8 8 4 0、5 8 8 8 4 2、5 8 8 8 4 6、5 8 8 8 4 7、5 8 8 8 4 8、5 8 8 8 4 9、5 8 8 8 5 0、5 8 8 8 5 1、5 8 8 8 5 2、5 8 8 8 5 3、5 8 8 8 5 4、5 8 8 8 5 5、5 8 8 8 5 6、5 8 8 8 5 7、5 8 8 8 5 8、5 8 8 8 5 9、5 8 8 8 6 0、5 8 8 8 6 1、5 8 8 8 6 2、5 8 8 8 6 3、5 8 8 8 6 4、5 8 8 8 6 6、5 8 8 8 6 7、5 8 8 8 6 8、5 8 8 8 7 0、5 8 8 8 7 1、5 8 8 8 7 2、5 8 8 8 7 3、5 8 8 8 7 4、5 8 8 8 7 5、5 8 8 8 7 6、5 8 8 8 7 7、5 8 8 8 7 8、5 8 8 8 7 9、5 8 8 8 8 0、5 8 8 8 8 1、5 8 8 8 8 2、5 8 8 8 8 3、5 8 8 8 8 4、5 9 8 9 9 9、5 9 9 0 0 0、5 9 9 0 0 1、5 9 9 0 0 2、5 9 9 0 0 3、5 9 9 0 0 4、5 9 9 0 0 5、5 9 9 0 0 6、5 9 9 0 0 7、5 9 9 0 0 8、5 9 9 0 0 9、5 9 9 0 1 0、5 9 9 0 1 1、5 9 9 0 1 2、5 9 9 0 1 3、5 9 9 0 1 4、5 9 9 0 1 5、5 9 9 0 1 9、5 9 9 0 2 4、5 9 9 0 2 5、5 9 9 0 2 6、5 9 9 0 2 7、5 9 9 0 2 8、5 9 9 0 2 9、5 9 9 0 3 0、5 9 9 0 3 1、5 9 9 0 3 2、5 9 9 0 3 3、5 9 9 0 3 4、5 9 9 0 3 5、5 9 9 0 6 4、5 9 9 0 6 5、5 9 9 0 7 1、5 9 9 0 7 2、5 9 9 0 7 7、5 9 9 0 7 8、5 9 9 0 7 9、5 9 9 0 8 0、5 9 9 0 8 3、5 9 9 0 8 4、5 9 9 0 8 5、5 9 9 0 8 6、5 9 9 0 8 7、5 9 9 0 8 8、5 9 9 0 8 9、5 9 9 0 9 0、5 9 9 0 9 1、5 9 9 0 9 2、5 9 9 0 9 3、5 9 9 0 9 4、5 9 9 0 9 5、5 9 9 0 9 6、5 9 9 0 9 7、5 9 9 1 2 5、5 9 9 1 2 6、5 9 9 1 2 7、5 9 9 1 3 3、5 9 9 1 3 4、5 9 9 1 3 5、5 9 9 1 3 6、5 9 9 1 3 8、5 9 9 1 3 9、5 9 9 1 4 0、5 9 9 1 4 1、5 9 9 1 4 2、5 9 9 1 4 8、5 9 9 1 4 9、5 9 9 1 5 0、5 9 9 1 5 1、5 9 9 1 5 2、5 9 9 1 5 4、5 9 9 1 5 5、5 9 9 1 5 6、5 9 9 1 5 7、5 9 9 1 5 8、5 9 9 1 5 9、5 9 9 1 7 8、5 9 9 1 7 9、5 9 9 1 8 0、5 9 9 1 8 1、5 9 9 1 8 7、5 9 9 1 8 8、5 9 9 1 9 0、5 9 9 1 9 2、5 9 9 1 9 3、5 9 9 1 9 4、5 9 9 1 9 5、5 9 9 1 9 6、5 9 9 1 9 7、5 9 9 1 9 8、5 9 9 1 9 9、5 9 9 2 0 0、5 9 9 2 0 1、5 9 9 2 0 2、5 9 9 2 0 3、5 9 9 2 0 4、5 9 9 2 0 5、5 9 9 2 0 6、5 9 9 2 0 7、5 9 9 2 0 8、5 9 9 2 0 9、5 9 9 2 1 0、5 9 9 2 1 1、5 9 9 2 1 2、5 9 9 2 1 3、5 9 9 2 1 4、5 9 9 2 1 5、5 9 9 2 1 6、5 9 9 2 1 7、5 9 9 2 1 8、5 9 9 2 1 9、5 9 9 2 2 0、5 9 9 2 2 1、5 9 9 2 2 2、5 9 9 2 2 3、5 9 9 2 2 4、5 9 9 2 2 5、5 9 9 2 2 6、5 9 9 2 2 7、5 9 9 2 2 8、5 9 9 2 2 9、5 9 9 2 3 0、5 9 9 2 3 1、5 9 9 2 3 2、5 9 9 2 3 3、5 9 9 2 3 4、5 9 9 2 3 5、5 9 9 2 3 6、5 9 9 2 4 7、5 9 9 2 5 5、5 9 9 2 5 6、5 9 9 2 5 7、5 9 9 2 6 3、5 9 9 2 6 4、5 9 9 2 6 5、5 9 9 2 6 6、5 9 9 2 7 0、5 9 9 2 7 1、5 9 9 2

10

20

30

40

50

72、599273、599274、599275、599276、599277、599278、599279、599280、599306、599307、599308、599311、599312、599313、599314、599315、599316、599317、599318、599319、599320、599321、599322、599323、599324、599325、599327、599328、599329、599330、599349、599353、599355、599356、599357、599358、599359、599360、599361、599362、599363、599364、599369、599371、599372、599373、599376、599378、599379、599382、599384、599386、599387、599388、599389、599390、599391、599392、599393、599394、599395、599396、599397、599398、599399、599400、599401、599402、599403、599404、599405、599406、599407、599408、599409、599410、599412、599413、599414、599415、599416、599417、599418、599419、599420、599421、599422、599423、599424、599425、599433、599434、599435、599436、599437、599438、599439、599440、599441、599442、599443、599444、599445、599446、599447、599448、599456、599467、599468、599471、599472、599473、599474、599475、599476、599477、599478、599479、599480、599481、599482、599483、599484、599485、599486、599487、599488、599489、599490、599491、599492、599493、599494、599495、599496、599497、599498、599499、599500、599501、599502、599503、599504、599505、599506、599507、599508、599512、599531、599547、599548、599549、599552、599553、599554、599555、599557、599558、599562、599563、599564、599565、599566、599567、599568、599569、599570、599577、599578、599579、599580、599581、599582、599584、599585、599586、599587、599588、599589、599590、599591、599592、599593、599594、599595、601323、601327、601329、601332、601333、601333、601334、601335、601336、601338、601339、601341、601342、601343、601344、601345、601346、601347、601348、601349、601368、601369、601371、601372、601374、601375、601377、601378、601380、601381、601382、601383、601384、601385、601386、601387、及び601388。

【0190】

特定の実施形態では、以下のアンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドがCFB核酸の一領域を標的とし、少なくとも60%のCFB mRNA阻害を達成する；配列番号：12、33、84、85、86、87、198、228、237、238、239、317、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463

10

20

30

40

50

、 4 6 4、 4 6 5、 4 7 2、 4 7 3、 5 1 3、 5 1 4、 5 1 5、 5 3 1、 5 3 7、 5 4 1
 、 5 4 2、 5 4 3、 5 4 4、 5 4 5、 5 4 6、 5 4 7、 5 4 9、 5 5 0、 5 5 1、 5 5 2
 、 5 5 3、 5 5 4、 5 5 5、 5 5 6、 5 5 7、 5 5 8、 5 6 4、 5 6 5、 5 6 9、 5 7 0
 、 5 7 7、 5 9 0、 5 9 2、 5 9 5、 5 9 6、 5 9 7、 5 9 8、 5 9 9、 6 0 0、 6 0 1
 、 6 0 2、 6 0 3、 6 0 4、 6 0 5、 6 0 6、 6 0 7、 6 0 8、 6 0 9、 6 1 0、 6 1 1
 、 6 1 2、 6 1 3、 6 1 4、 6 1 5、 6 1 6、 6 1 7、 6 1 8、 6 4 4、 6 4 5、 6 4 6
 、 6 4 7、 6 4 8、 6 4 9、 6 5 0、 6 5 1、 6 5 2、 6 5 3、 6 5 4、 6 5 5、 6 5 6
 、 6 5 7、 6 5 8、 6 5 9、 6 6 0、 6 6 1、 6 6 2、 6 6 3、 6 6 4、 6 6 5、 6 6 6
 、 6 6 7、 6 6 8、 6 6 9、 6 7 0、 6 7 1、 6 7 2、 6 7 3、 6 7 4、 6 7 5、 6 7 6
 、 6 7 7、 6 7 8、 6 7 9、 6 8 0、 6 8 2、 6 8 3、 6 8 4、 6 8 5、 6 8 6、 6 8 7 10
 、 6 8 8、 6 8 9、 7 0 0、 7 0 4、 7 0 6、 7 0 7、 7 0 8、 7 0 9、 7 1 1、 7 1 2
 、 7 1 3、 7 1 4、 7 1 5、 7 1 6、 7 1 7、 7 2 0、 7 2 1、 7 2 2、 7 2 3、 7 2 4
 、 7 2 5、 7 2 6、 7 2 7、 7 2 7、 7 2 8、 7 2 9、 7 3 0、 7 3 1、 7 3 2、 7 3 3
 、 7 3 4、 7 3 6、 7 3 7、 7 3 8、 7 3 9、 7 4 0、 7 4 1、 7 4 2、 7 4 3、 7 4 4
 、 7 4 5、 7 4 5、 7 4 6、 7 4 7、 7 4 8、 7 4 9、 7 5 0、 7 5 1、 7 5 2、 7 5 3
 、 7 5 4、 7 5 5、 7 5 6、 7 5 8、 7 5 9、 7 6 0、 7 6 1、 7 6 7、 7 6 8、 7 7 0
 、 7 7 2、 7 7 3、 7 7 4、 7 7 5、 7 7 5、 7 7 6、 7 7 6、 7 7 7、 7 7 7、 7 7 8
 、 7 7 9、 7 8 0、 7 8 1、 7 8 2、 7 8 3、 7 8 3、 7 8 4、 7 8 4、 7 8 5、 7 8 6
 、 7 8 7、 7 8 8、 7 8 9、 7 9 0、 7 9 1、 7 9 2、 7 9 3、 7 9 4、 7 9 5、 7 9 6
 、 7 9 7、 7 9 8、 7 9 9、 8 1 3、 8 3 3、 8 3 4、 8 4 1、 8 4 6、 8 4 9、 及び 8 20
 5 0。

【 0 1 9 1 】

特定の実施形態では、以下のアンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチド
 が C F B 核酸の一領域を標的とし、少なくとも 7 0 % の C F B m R N A 阻害を達成する
 ; ISIS 番号 : 5 1 6 3 5 0、 5 3 2 6 1 4、 5 3 2 6 8 6、 5 3 2 6 8 7、 5 3 2 6 8 8
 、 5 3 2 7 7 0、 5 3 2 8 0 0、 5 3 2 8 0 9、 5 3 2 8 1 0、 5 3 2 8 1 1、 5 3 2 9
 1 7、 5 3 2 9 5 2、 5 8 8 5 1 2、 5 8 8 5 1 3、 5 8 8 5 1 4、 5 8 8 5 1 5、 5 8
 8 5 1 6、 5 8 8 5 1 7、 5 8 8 5 1 8、 5 8 8 5 2 4、 5 8 8 5 2 9、 5 8 8 5 3 0、
 5 8 8 5 3 1、 5 8 8 5 3 2、 5 8 8 5 3 3、 5 8 8 5 3 4、 5 8 8 5 3 5、 5 8 8 5 3
 6、 5 8 8 5 3 7、 5 8 8 5 3 8、 5 8 8 5 3 9、 5 8 8 5 4 0、 5 8 8 5 4 1、 5 8 8 30
 5 4 2、 5 8 8 5 4 3、 5 8 8 5 4 4、 5 8 8 5 4 5、 5 8 8 5 4 6、 5 8 8 5 4 7、 5
 8 8 5 4 8、 5 8 8 5 4 9、 5 8 8 5 5 0、 5 8 8 5 5 1、 5 8 8 5 5 2、 5 8 8 5 5 3
 、 5 8 8 5 5 4、 5 8 8 5 5 5、 5 8 8 5 5 6、 5 8 8 5 5 7、 5 8 8 5 5 8、 5 8 8 5
 5 9、 5 8 8 5 6 0、 5 8 8 5 6 1、 5 8 8 5 6 2、 5 8 8 5 6 3、 5 8 8 5 6 4、 5 8
 8 5 6 5、 5 8 8 5 6 8、 5 8 8 5 6 9、 5 8 8 5 7 0、 5 8 8 5 7 1、 5 8 8 5 7 2、
 5 8 8 5 7 3、 5 8 8 5 7 4、 5 8 8 5 7 5、 5 8 8 5 7 7、 5 8 8 6 3 6、 5 8 8 6 3
 8、 5 8 8 6 4 0、 5 8 8 6 9 6、 5 8 8 6 9 8、 5 8 8 8 0 7、 5 8 8 8 1 4、 5 8 8
 8 1 5、 5 8 8 8 1 9、 5 8 8 8 4 2、 5 8 8 8 4 7、 5 8 8 8 4 8、 5 8 8 8 4 9、 5
 8 8 8 5 0、 5 8 8 8 5 1、 5 8 8 8 5 2、 5 8 8 8 5 3、 5 8 8 8 5 6、 5 8 8 8 5 7
 、 5 8 8 8 5 8、 5 8 8 8 5 9、 5 8 8 8 6 0、 5 8 8 8 6 1、 5 8 8 8 6 2、 5 8 8 8 40
 6 3、 5 8 8 8 6 6、 5 8 8 8 6 7、 5 8 8 8 7 0、 5 8 8 8 7 1、 5 8 8 8 7 2、 5 8
 8 8 7 3、 5 8 8 8 7 4、 5 8 8 8 7 5、 5 8 8 8 7 6、 5 8 8 8 7 7、 5 8 8 8 7 8、
 5 8 8 8 7 9、 5 8 8 8 8 0、 5 8 8 8 8 1、 5 8 8 8 8 2、 5 8 8 8 8 3、 5 8 8 8 8
 4、 5 9 9 0 0 0、 5 9 9 0 0 1、 5 9 9 0 0 3、 5 9 9 0 0 4、 5 9 9 0 0 5、 5 9 9
 0 0 8、 5 9 9 0 0 9、 5 9 9 0 1 0、 5 9 9 0 1 1、 5 9 9 0 1 4、 5 9 9 0 1 5、
 5 9 9 0 2 4、 5 9 9 0 2 5、 5 9 9 0 2 7、 5 9 9 0 2 8、 5 9 9 0 2 9、 5 9 9 0 3
 0、 5 9 9 0 3 1、 5 9 9 0 3 2、 5 9 9 0 3 3、 5 9 9 0 3 4、 5 9 9 0 7 2、 5 9 9
 0 7 7、 5 9 9 0 8 0、 5 9 9 0 8 5、 5 9 9 0 8 6、 5 9 9 0 8 7、 5 9 9 0 8 8、 5
 9 9 0 8 9、 5 9 9 0 9 0、 5 9 9 0 9 1、 5 9 9 0 9 3、 5 9 9 0 9 4、 5 9 9 0 9 5
 、 5 9 9 0 9 6、 5 9 9 0 9 7、 5 9 9 1 2 5、 5 9 9 1 2 6、 5 9 9 1 3 4、 5 9 9 1 50

38、599139、599148、599149、599150、599151、599152、599154、599155、599156、599157、599158、599187、599188、599193、599195、599196、599197、599198、599199、599200、599201、599202、599203、599204、599205、599206、599207、599208、599210、599211、599212、599213、599214、599215、599216、599217、599218、599219、599220、599221、599222、599223、599224、599225、599226、599227、599228、599229、599230、599231、599232、599233、599234、599235、599236、599266、599272、599272、599273、599274、599275、599277、599278、599279、599280、599280、599306、599311、599312、599313、599314、599315、599316、599317、599318、599319、599320、599321、599322、599323、599325、599327、599328、599329、599330、599355、599357、599358、599359、599360、599361、599362、599363、599364、599369、599371、599372、599373、599378、599379、599382、599384、599386、599387、599388、599389、599390、599391、599392、599393、599394、599395、599396、599397、599398、599399、599400、599401、599402、599403、599404、599405、599406、599407、599408、599409、599410、599413、599414、599415、599416、599417、599418、599419、599420、599421、599422、599423、599424、599433、599434、599435、599436、599437、599438、599439、599440、599441、599442、599443、599445、599446、599447、599448、599472、599473、599474、599475、599476、599477、599478、599479、599480、599481、599482、599483、599484、599485、599486、599487、599488、599489、599490、599491、599492、599493、599494、599495、599496、599497、599498、599499、599500、599501、599502、599503、599504、599505、599506、599507、599508、599512、599547、599548、599552、599553、599554、599555、599558、599562、599563、599564、599566、599567、599568、599569、599570、599577、599578、599579、599580、599581、599582、599585、599586、599587、599588、599589、599590、599591、599592、599593、599594、599595、601332、601335、601341、601343、601344、601345、601346、601347、601348、601349、601371、601372、601380、601382、601383、601384、601385、601386、及び601387。

【0192】

特定の実施形態では、以下のアンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドがCFB核酸の一領域を標的とし、少なくとも70%のCFB mRNA阻害を達成する；配列番号：12、84、85、86、198、228、237、238、239、317、395、396、397、398、399、402、403、404、405、407、408、410、411、412、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、4

10

20

30

40

50

27、428、429、430、431、432、433、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、464、465、472、473、513、514、515、541、542、543、544、545、546、547、549、550、551、552、553、554、555、556、557、564、565、569、592、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、617、618、645、646、647、648、649、650、653、654、655、656、659、660、662、663、664、665、666、668、669、670、671、672、673、674、675、676、677、677、678、679、680、682、683、684、686、687、688、689、706、708、709、711、712、713、714、715、720、721、722、723、724、725、726、727、728、729、730、731、732、733、734、736、737、738、739、740、741、742、743、744、745、746、747、748、749、750、751、752、753、754、755、756、767、768、773、775、776、777、778、779、780、781、782、783、784、785、786、787、788、789、790、791、792、793、793、794、795、797、798、799、813、833、834、841、846、849、867、及び873。

10

20

【0193】

特定の実施形態では、以下のアンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドがCFB核酸の一領域を標的とし、少なくとも80%のCFB mRNA阻害を達成する；ISIS番号：532686、532809、532810、532811、532917、532952、588512、588517、588518、588533、588534、588535、588536、588537、588538、588539、588540、588542、588543、588544、588545、588546、588547、588548、588549、588550、588551、588552、588553、588554、588555、588556、588557、588558、588559、588560、588561、588562、588563、588564、588565、588571、588638、588640、588696、588698、588807、588814、588849、588850、588851、588853、588857、588858、588859、588860、588861、588862、588863、588866、588867、588871、588872、588873、588874、588875、588876、588877、588878、588879、588880、588881、588882、588883、599001、599024、599025、599033、599086、599087、599088、599089、599093、599094、599095、599096、599134、599139、599148、599149、599151、599154、599155、599156、599158、599188、599195、599196、599198、599201、599202、599203、599204、599205、599206、599207、599212、599213、599215、599216、599217、599218、599219、599220、599221、599222、599223、599224、599225、599226、599227、599228、599229、599230、599231、599232、599233、599234、599235、599236、599272、599273、599275、599277、599278、599279、599280、599311、599313、599314、599316、599317、599318、599320、599321、599322、599323、5993

30

40

50

27、599328、599329、599330、599355、599357、599358、599359、599360、599361、599362、599363、599364、599371、599372、599373、599378、599379、599382、599384、599386、599387、599388、599389、599390、599391、599392、599393、599397、599398、599399、599400、599401、599403、599404、599405、599407、599408、599409、599410、599413、599414、599415、599416、599417、599418、599419、599420、599421、599422、599423、599424、599433、599434、599435、599436、599437、599438、599439、599440、599441、599445、599446、599447、599448、599474、599476、599477、599479、599481、599482、599483、599485、599486、599487、599488、599489、599490、599491、599492、599494、599495、599496、599497、599498、599499、599500、599502、599503、599504、599505、599506、599507、599508、599547、599552、599553、599554、599558、599563、599567、599568、599569、599570、599577、599578、599581、599582、599585、599587、599588、599590、599591、599592、599593、599594、601332、601344、601345、601382、601383、及び601385。

【0194】

特定の実施形態では、以下のアンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドがCFB核酸の一領域を標的とし、少なくとも80%のCFB mRNA阻害を達成する；配列番号：84、237、238、239、317、395、397、411、412、413、414、415、417、418、419、420、421、422、423、425、426、427、429、430、431、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、472、473、514、515、542、543、544、545、546、547、550、551、552、553、554、555、556、557、564、595、599、600、601、602、603、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、617、618、646、655、660、662、663、666、669、670、671、672、673、675、676、677、678、679、682、684、686、687、688、689、706、708、709、711、712、713、714、715、720、722、723、724、725、726、727、729、730、731、732、733、736、737、738、739、740、741、742、743、744、745、746、747、748、749、750、751、752、753、754、755、756、768、775、776、778、781、782、783、784、785、787、788、789、790、791、792、793、794、799、813、833、834、841、849、867、及び873。

【0195】

特定の実施形態では、以下のアンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチドがCFB核酸の一領域を標的とし、少なくとも90%のCFB mRNA阻害を達成する；ISIS番号：532686、532811、532917、588536、588537、588538、588539、588544、588545、588546、588548、588551、588552、588553、588554、588555、58

10

20

30

40

50

8 5 5 6、5 8 8 5 5 7、5 8 8 5 5 8、5 8 8 5 5 9、5 8 8 5 6 0、5 8 8 5 6 1、
 5 8 8 5 6 2、5 8 8 5 6 4、5 8 8 6 3 8、5 8 8 6 4 0、5 8 8 6 9 6、5 8 8 6 9
 8、5 8 8 8 4 9、5 8 8 8 5 0、5 8 8 8 5 1、5 8 8 8 6 0、5 8 8 8 6 6、5 8 8
 8 6 7、5 8 8 8 7 2、5 8 8 8 7 3、5 8 8 8 7 4、5 8 8 8 7 6、5 8 8 8 7 7、5
 8 8 8 7 8、5 8 8 8 7 9、5 8 8 8 8 1、5 8 8 8 8 3、5 9 9 1 4 9、5 9 9 1 8 8
 、5 9 9 2 0 3、5 9 9 2 0 6、5 9 9 2 2 0、5 9 9 2 2 1、5 9 9 2 2 2、5 9 9 2
 2 3、5 9 9 2 2 4、5 9 9 2 2 5、5 9 9 2 2 6、5 9 9 2 2 7、5 9 9 2 2 8、5 9
 9 2 2 9、5 9 9 2 3 5、5 9 9 2 3 6、5 9 9 2 7 9、5 9 9 2 8 0、5 9 9 3 1 4、
 5 9 9 3 2 1、5 9 9 3 6 2、5 9 9 3 7 8、5 9 9 3 9 0、5 9 9 3 9 1、5 9 9 3 9
 8、5 9 9 3 9 9、5 9 9 4 0 4、5 9 9 4 1 3、5 9 9 4 1 4、5 9 9 4 1 6、5 9 9
 4 1 9、5 9 9 4 2 0、5 9 9 4 2 2、5 9 9 4 3 5、5 9 9 4 3 7、5 9 9 4 3 8、5
 9 9 4 4 1、5 9 9 4 8 3、5 9 9 4 9 4、5 9 9 5 0 8、5 9 9 5 5 2、5 9 9 5 5 3
 、5 9 9 5 5 4、5 9 9 5 6 8、5 9 9 5 7 0、5 9 9 5 7 7、5 9 9 5 8 1、5 9 9 5
 9 1、5 9 9 5 9 2、及び5 9 9 5 9 3。

【0196】

特定の実施形態では、以下のアンチセンス化合物またはアンチセンスオリゴヌクレオチド
 がCFB核酸の一領域を標的とし、少なくとも90%のCFB mRNA阻害を達成する

；配列番号：84、238、239、317、412、413、420、421、426
 、434、436、437、438、439、440、442、443、444、445
 、446、448、451、452、453、454、455、456、457、458
 、459、460、461、462、464、465、472、473、514、515
 、542、543、544、545、546、551、553、555、556、599
 、600、601、602、610、616、617、618、662、666、670
 、676、677、678、688、689、713、723、729、730、740
 、741、742、743、744、745、746、747、748、749、755
 、756、768、783、793、833、及び867。

【0197】

特定の実施形態では、化合物が、本明細書に記載するCFBを標的とする任意のオリゴヌ
 クレオチドと共役基とを含むか、またはそれらからなることができる。

【0198】

特定の実施形態では、化合物が修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含み、前記修飾オリ
 ゴヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド2193~2212、2195~2210
 、2457~2476、2571~2590、2584~2603、2588~2607
 、2592~2611、2594~2613、2597~2616、2600~2619
 、または2596~2611内で相補的な10~30個の連結されたヌクレオチドからなる。

【0199】

特定の実施形態では、化合物が修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含み、前記修飾オリ
 ゴヌクレオチドは、配列番号198、228、237、440、444、448、450
 、453、455、549、及び598のいずれか一つを含む核酸塩基配列を有する10
 ~30個の連結されたヌクレオチドからなる。

【0200】

特定の実施形態では、化合物が修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含み、前記修飾オリ
 ゴヌクレオチドは、配列番号198、228、237、440、444、448、450
 、453、455、549、及び598のいずれか一つからなる核酸塩基配列を有する
 。

【0201】

特定の実施形態において、前述の化合物またはオリゴヌクレオチドは、いずれも、少なく
 とも1つの修飾ヌクレオチド間連結部、少なくとも1つの修飾糖、及び/または少なくと
 も1つの修飾核酸塩基を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0202】

特定の態様において、前述の化合物またはオリゴヌクレオチドはいずれも、少なくとも1つの修飾糖を含むことができる。特定の態様では、少なくとも1つの修飾糖が、2'-O-メトキシエチル基を含む。特定の態様では、少なくとも1つの修飾糖が二環式糖、例えば4'-CH(CH₃)-O-2'基、4'-C₂H₅-O-2'基、または4'-(CH₂)₂-O-2'基である。

【0203】

特定の態様では、前記修飾オリゴヌクレオチドが、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間連結部、例えばホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。

【0204】

特定の実施形態では、前記修飾オリゴヌクレオチドが、少なくとも1、2、3、4、5、6、または7個のホスホジエステルヌクレオシド間連結部を含む。

【0205】

特定の実施形態では、前記修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間連結部が、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部及びホスホロチオエートヌクレオシド間連結部から選択される。

【0206】

特定の実施形態では、前記修飾オリゴヌクレオチドの各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。

【0207】

特定の実施形態において、前述の化合物またはオリゴヌクレオチドは、いずれも、少なくとも1つの修飾核酸塩基、例えば5-メチルシトシンを含む。

【0208】

特定の実施形態では、化合物が、共役基と、
連結されたデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、
連結されたヌクレオシドからなる5'ウイングセグメント、及び
連結されたヌクレオシドからなる3'ウイングセグメント
を含む修飾オリゴヌクレオチドとを含み、前記ギャップセグメントは前記5'ウイングセグメントと前記3'ウイングセグメントの間に配置されており、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。特定の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドが、配列番号198、228、237、440、444、448、450、453、455、549、または598に示す配列を含む核酸塩基配列を有する10~30個の連結されたヌクレオシドからなる。

【0209】

特定の実施形態では、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号198、228、237、440、444、448、450、453、もしくは455に示す配列を含むか、またはそれからなる核酸塩基配列を有し、前記修飾オリゴヌクレオチドは、10個の連結されたデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、5個の連結されたヌクレオシドからなる5'ウイングセグメント、及び5個の連結されたヌクレオシドからなる3'ウイングセグメント
を含み、前記ギャップセグメントは前記5'ウイングセグメントと前記3'ウイングセグメントの間に配置されており、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、各ヌクレオシド間連結部はホスホロチオエート連結部であり、かつ各シトシンは5-メチルシトシンである。

【0210】

特定の実施形態では、化合物が一本鎖修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むか、またはそれらからなり、前記修飾オリゴヌクレオチドは配列番号198、228、237、440、444、448、450、453、または455に示す配列からなる核酸塩基配列を有する20個の連結されたヌクレオシドからなり、前記オリゴヌクレオチドは、10個の連結されたデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、

10

20

30

40

50

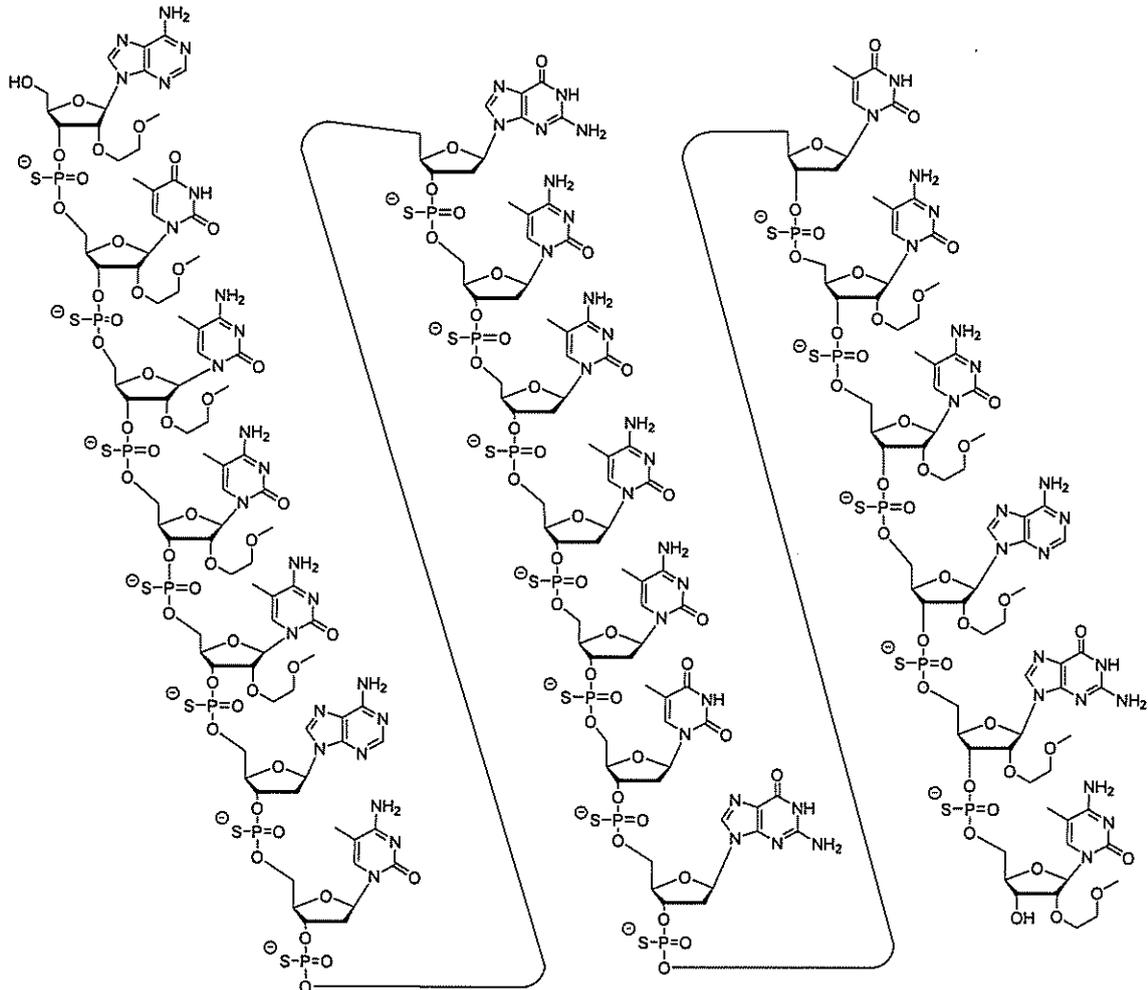
5 個の連結されたヌクレオシドからなる 5' ウイングセグメント、及び
 5 個の連結されたヌクレオシドからなる 3' ウイングセグメント
 を含み、前記ギャップセグメントは前記 5' ウイングセグメントと前記 3' ウイングセグメントの間に配置されており、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは 2'-O-メトキシエチル糖を含み；各ヌクレオシド間連結部はホスホロチオエート連結部であり、各シトシンは 5-メチルシトシンである。

【0211】

特定の実施形態では、化合物が ISIS 588540 と共役基とを含むか、またはそれらからなる。特定の実施形態では、ISIS 588540 が以下の化学構造を有する：

【0212】

【化3】



【0213】

特定の実施形態では、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号 549 に示す配列を含むか、配列番号 549 に示す配列からなる核酸塩基配列を有し、前記修飾オリゴヌクレオチドは、

10 個の連結されたデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、
 3 個の連結されたヌクレオシドからなる 5' ウイングセグメント、及び
 3 個の連結されたヌクレオシドからなる 3' ウイングセグメント
 を含み、前記ギャップセグメントは前記 5' ウイングセグメントと前記 3' ウイングセグメントの間に配置されており、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドは cEt 糖を含み、各ヌクレオシド間連結部はホスホロチオエート連結部であり、かつ各シトシンは 5-メチルシトシンである。

【0214】

10

20

30

40

50

特定の態様では、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号598に示す配列を含むか、配列番号598に示す配列からなる核酸塩基配列を有し、前記修飾オリゴヌクレオチドは10個の連結されたデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、3個の連結されたヌクレオシドからなる5'ウイングセグメント、及び3個の連結されたヌクレオシドからなる3'ウイングセグメントを含み、前記ギャップセグメントは前記5'ウイングセグメントと前記3'ウイングセグメントの間に配置されており、前記5'ウイングセグメントは5' - 3'方向に2'-O-メトキシエチル糖、2'-O-メトキシエチル糖、及びcEt糖を含み、前記3'ウイングセグメントは5' - 3'方向にcEt糖、cEt糖、及び2'-O-メトキシエチル糖を含み、各ヌクレオシド間連結部はホスホロチオエート連結部であり、かつ各シトシンは5-メチルシトシンである。 10

【0215】

前述の実施形態のいずれにおいても、前記化合物またはオリゴヌクレオチドは、CFBをコードする核酸に対して少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相補的であることができる。

【0216】

前述の実施形態のいずれにおいても、前記化合物またはオリゴヌクレオチドは一本鎖であることができる。

【0217】

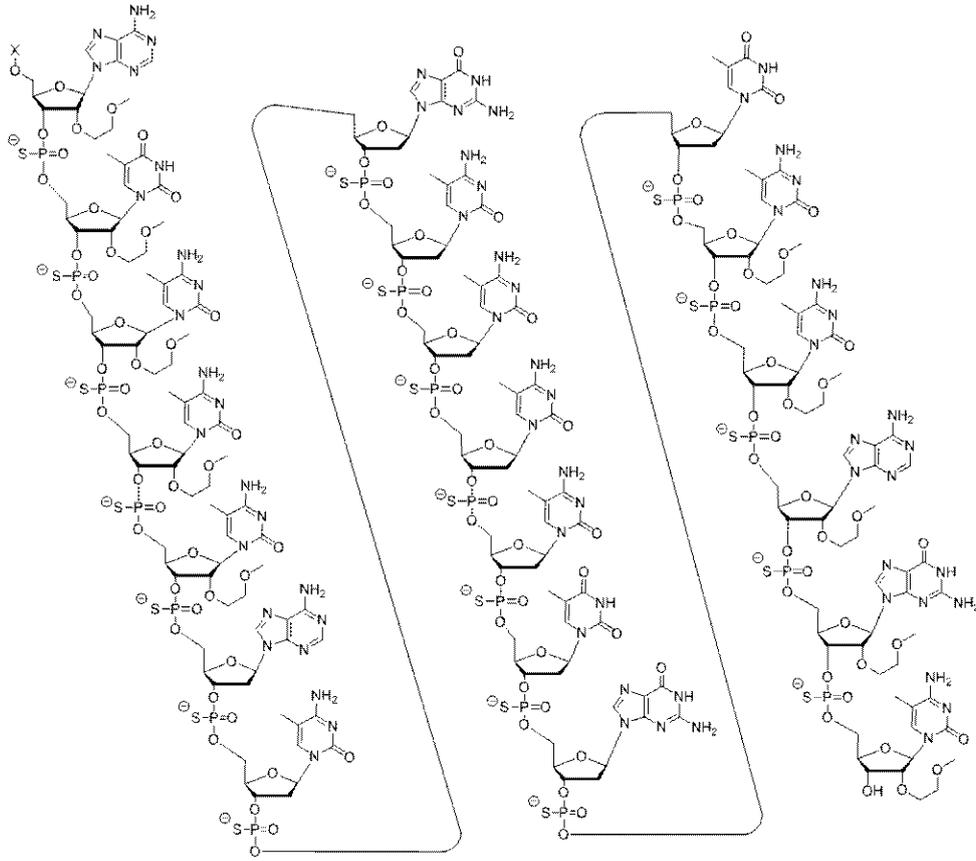
特定の実施形態では、前記共役基が前記修飾オリゴヌクレオチドの5'端で前記修飾オリゴヌクレオチドに連結される。特定の実施形態では、前記共役基は、前記修飾オリゴヌクレオチドの3'端で前記修飾オリゴヌクレオチドに連結される。特定の実施形態では、前記共役基が少なくとも1つのN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、少なくとも2つのN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、または少なくとも3つのN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を含む。 20

【0218】

特定の実施形態では、以下の化学構造を有する化合物が、5'-Xを伴うISIS588540を含むか、または5'-Xを伴うISIS588540からなり、ここでXは本明細書に記載するGalNAcを含む共役基である：

【0219】 30

【化 4】



10

20

【 0 2 2 0】

特定の実施形態では、化合物が、以下の化学構造によって表されるとおり、配列番号 4 4 0、5'-GalNAc、及び化学修飾を含むか、またはそれらからなる：

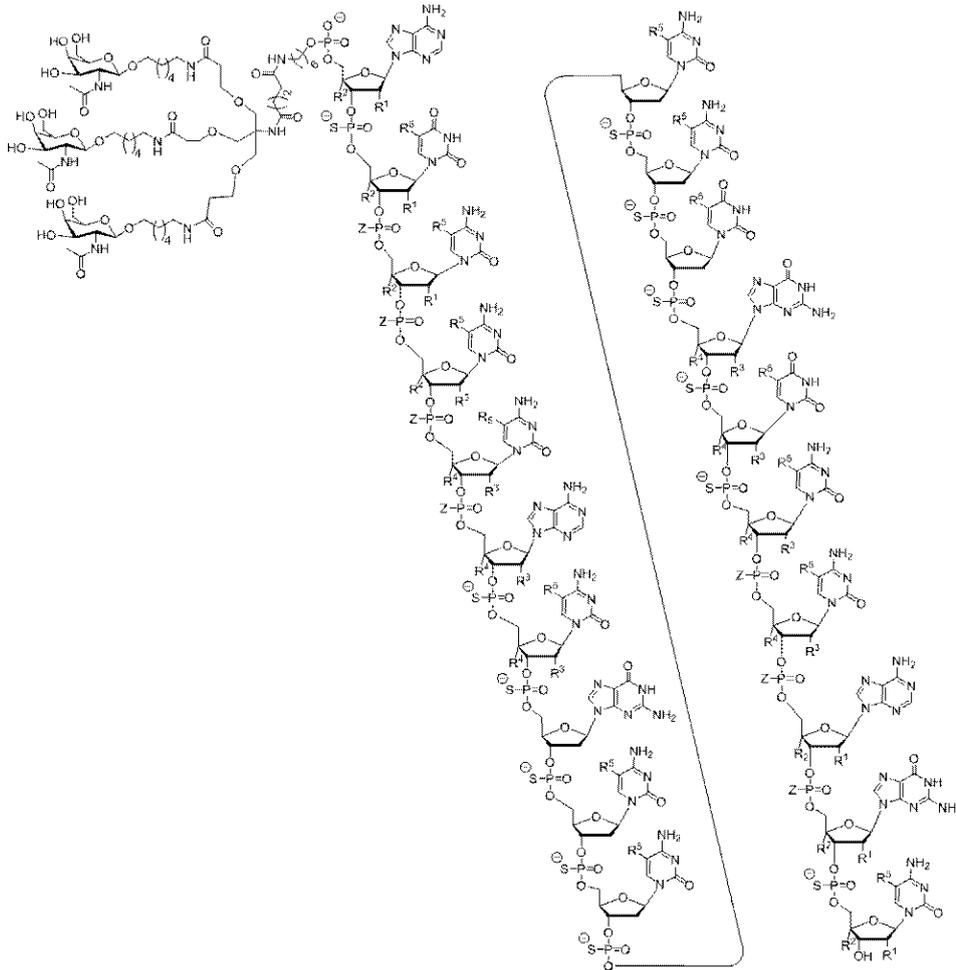
【 0 2 2 1】

30

40

50

【化5】



10

20

[式中、 R^1 は $-OCH_2CH_2OCH_3$ (MOE) であり、かつ R^2 がHであるか、または R^1 と R^2 とが全体として橋を形成し、その場合、 R^1 は $-O-$ であり、 R^2 は $-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、または $-CH_2CH_2-$ であって、 R^1 と R^2 は、結果として生じる橋が $-O-CH_2-$ 、 $-O-CH(CH_3)-$ 、及び $-O-CH_2CH_2-$ から選択されることになるように直接つながれている。

30

また、同じ環上の R^3 と R^4 の各ペアについては、環ごとに独立して、 R^3 がH及び $-OCH_2CH_2OCH_3$ から選択され、かつ R^4 がHであるか、または R^3 と R^4 とが全体として橋を形成し、その場合、 R^3 は $-O-$ 、かつ R^4 は $-CH_2-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、または $-CH_2CH_2-$ であって、 R^3 と R^4 は、結果として生じる橋が $-O-CH_2-$ 、 $-O-CH(CH_3)-$ 、及び $-O-CH_2CH_2-$ から選択されることになるように直接つながれている；

また、 R^5 はH及び $-CH_3$ から選択され、

また、 Z は $S-$ 及び $O-$ から選択される]。

40

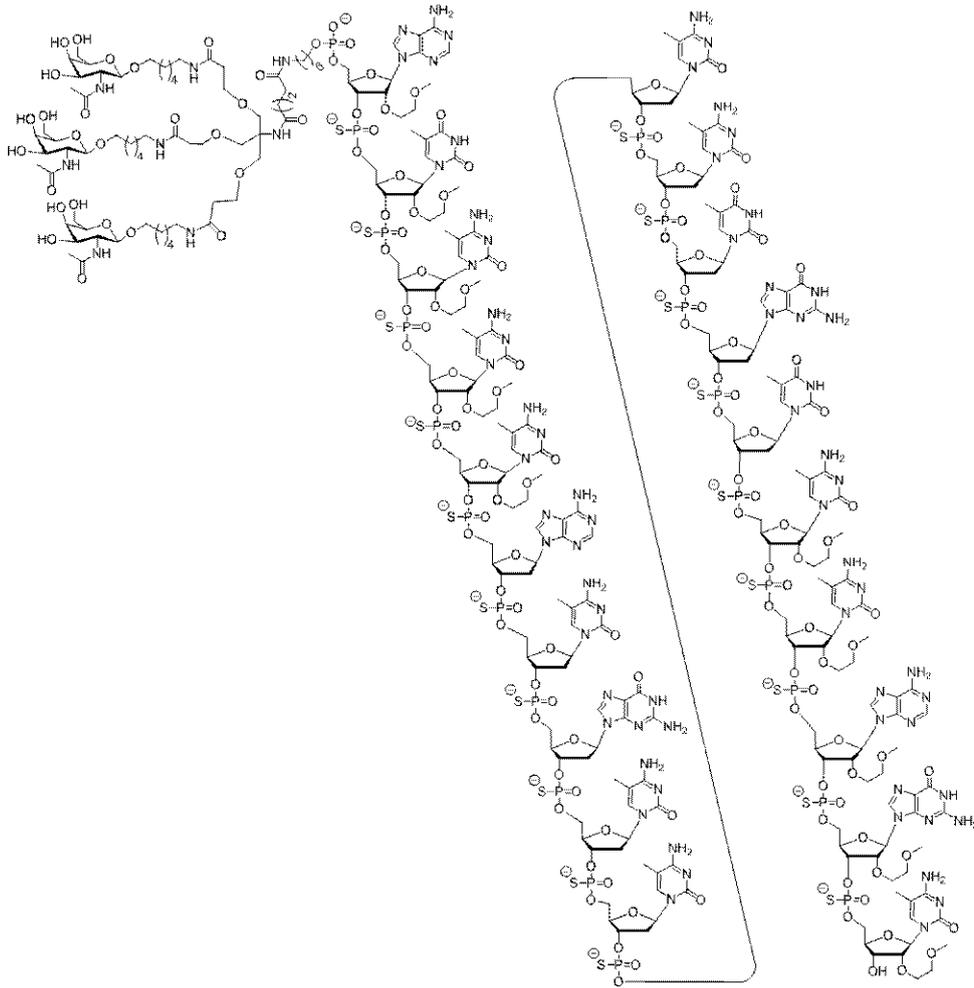
【0222】

特定の実施形態では、化合物がISIS696844を含む。特定の実施形態では、化合物がISIS696844からなる。特定の実施形態では、ISIS696844が以下の化学構造を有する：

【0223】

50

【化 6】



10

20

【 0 2 2 4 】

特定の実施形態では、化合物が I S I S 6 9 6 8 4 5 を含む。特定の実施形態では、化合物が I S I S 6 9 6 8 4 5 からなる。特定の実施形態では、I S I S 6 9 6 8 4 5 が以下の化学構造を有する：

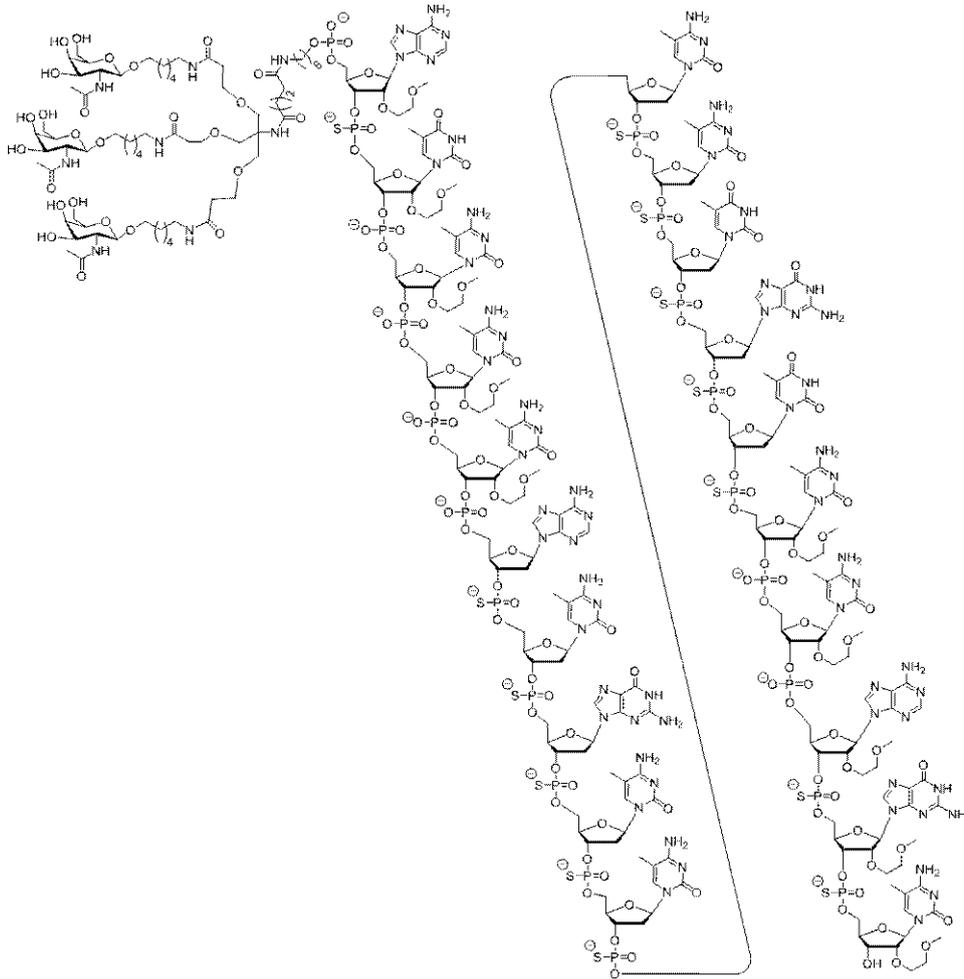
30

【 0 2 2 5 】

40

50

【化 7】



10

20

【 0 2 2 6】

特定の実施形態では、化合物が I S I S 6 9 8 9 6 9 を含む。特定の実施形態では、化合物が I S I S 6 9 8 9 6 9 からなる。特定の実施形態では、I S I S 6 9 8 9 6 9 が以下の化学構造を有する：

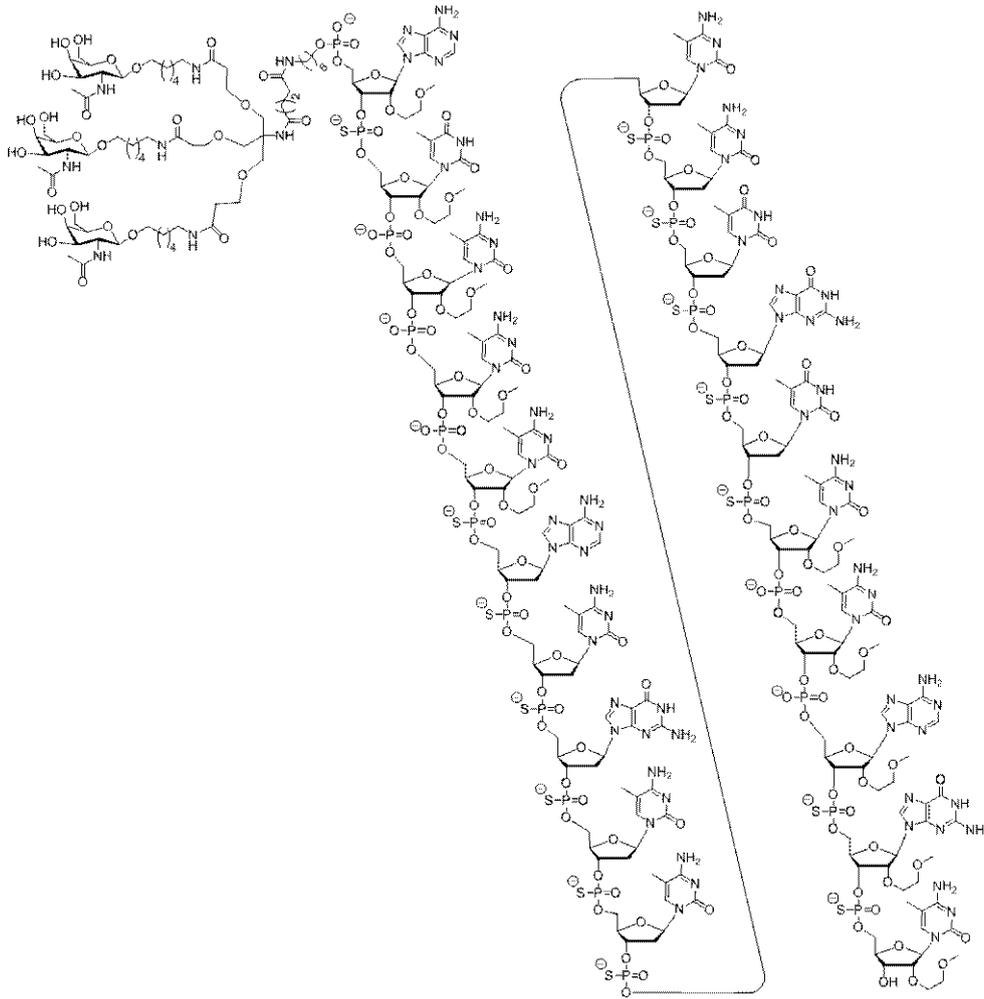
30

【 0 2 2 7】

40

50

【化 8】



10

20

【 0 2 2 8】

特定の実施形態では、化合物がISIS698970を含む。特定の実施形態では、化合物がISIS698970からなる。特定の実施形態では、ISIS698970が以下の化学構造を有する：

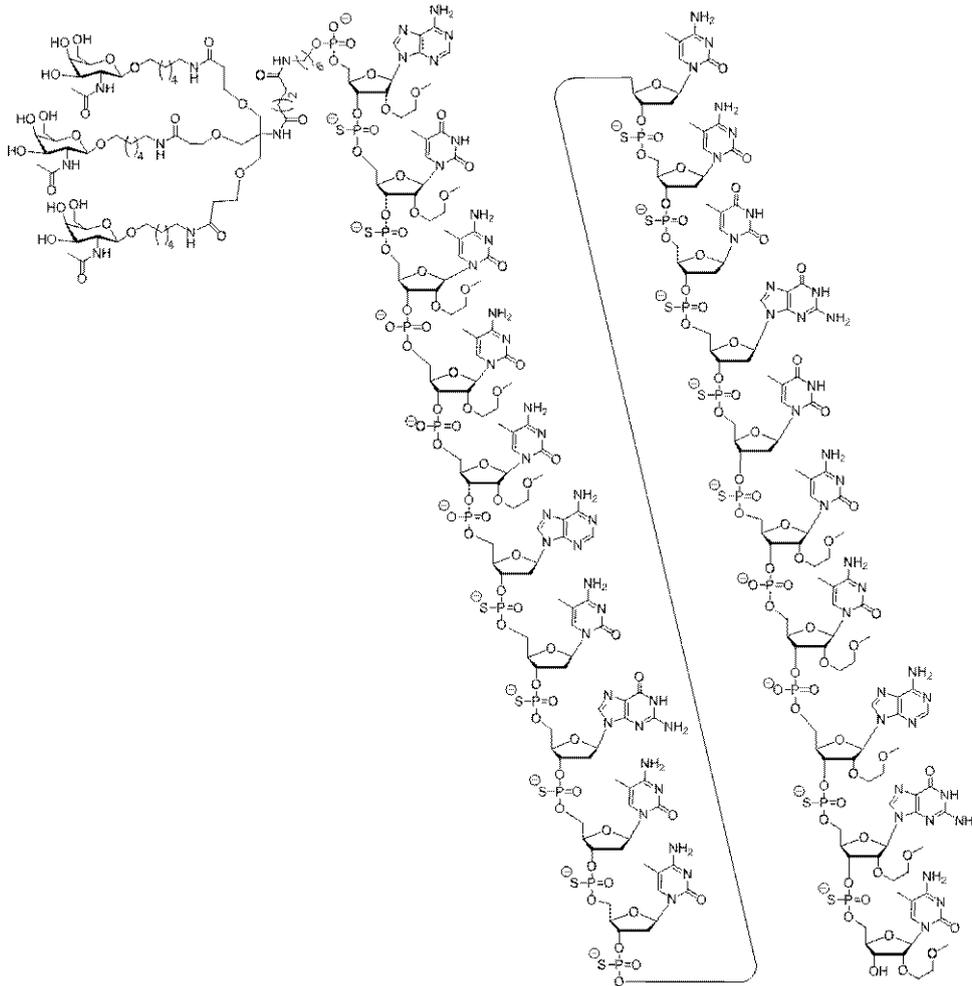
30

【 0 2 2 9】

40

50

【化 9】



10

20

【0230】

特定の実施形態は、CFBを標的とする修飾オリゴヌクレオチドまたはその塩と共役基を含む化合物またはそれらからなる化合物のいずれか、及び医薬上許容される担体もしくは希釈剤の少なくとも1つを含む組成物を提供する。

30

【0231】

特定の実施形態では、本明細書に記載する化合物または組成物が、250 nM未満、200 nM未満、150 nM未満、100 nM未満、90 nM未満、80 nM未満、70 nM未満、65 nM未満、60 nM未満、55 nM未満、50 nM未満、45 nM未満、40 nM未満、35 nM未満、30 nM未満、25 nM未満、または20 nM未満のインビトロIC₅₀の少なくとも1つを有することから、有効である。

【0232】

特定の実施形態において、本明細書に記載する化合物または組成物は、食塩水で処置した動物と比較してALT値またはAST値の増加が4倍以下、3倍以下、または2倍以下であること、または肝臓重量、脾臓重量もしくは腎臓重量の増加が30%以下、20%以下、15%以下、12%以下、10%以下、5%以下、または2%以下であることのうちの少なくとも1つによって実証されるように、耐容性が高い。特定の実施形態において、本明細書に記載する化合物または組成物は、食塩水で処置した動物と比較してALT値またはAST値の増加がないことによって実証されるように、耐容性が高い。特定の実施形態において、本明細書に記載する化合物または組成物は、食塩水で処置した動物と比較して肝臓重量、脾臓重量または腎臓重量の増加がないことによって実証されるように、耐容性が高い。

40

【0233】

特定の実施形態は、上述の実施形態のいずれかの化合物またはその塩と少なくとも1つの

50

医薬上許容される担体または希釈剤とを含む組成物を提供する。特定の態様では、前記組成物が、約40センチポアズ(cP)未満、約30センチポアズ(cP)未満、約20センチポアズ(cP)未満、約15センチポアズ(cP)未満、または約10センチポアズ(cP)未満の粘度を有する。特定の態様では、上述した粘度のいずれかを有する前記組成物が、ここに提供する化合物を、約100mg/mL、約125mg/mL、約150mg/mL、約175mg/mL、約200mg/mL、約225mg/mL、約250mg/mL、約275mg/mL、または約300mg/mLの濃度で含む。特定の態様では、上述した粘度及び/または化合物濃度のいずれかを有する前記組成物が、室温または約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、もしくは約30の温度を有する。

10

【0234】

特定の実施形態において、対象における補体代替経路の調節異常に関連する疾患を処置し、防止し、または改善する方法は、本明細書に記載する化合物または組成物を前記対象に投与し、それによって前記疾患を処置し、防止し、または改善することを含む。特定の態様では、補体代替経路が正常より強く活性化されている。特定の実施形態では、対象における補体代替経路の調節異常に関連する疾患を処置し、防止し、または改善する方法が、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは10~30個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号6~808のいずれか一つの核酸塩基配列を含む核酸塩基配列を有する。特定の実施形態では、対象における補体代替経路の調節異常に関連する疾患を処置し、防止し、または改善する方法が、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号198、228、237、440、444、448、450、453、455、549、及び598のいずれか一つを含む核酸塩基配列を有する10~30個の連結されたヌクレオシドからなる。特定の実施形態では、対象における補体代替経路の調節異常に関連する疾患を処置し、防止し、または改善する方法が、ISIS696844、ISIS696845、ISIS698969、もしくはISIS698970を含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含む。

20

【0235】

特定の実施形態において、対象における加齢黄斑変性(AMD)などの黄斑変性を処置し、防止し、または改善する方法は、本明細書に記載する化合物または組成物を前記対象に投与し、よってAMDを処置し、防止し、または改善することを含む。特定の態様では、補体代替経路が正常より強く活性化されている。特定の態様では、前記AMDが滲出型AMDである。特定の態様では、前記AMDが地図状萎縮などの乾性AMDである。特定の実施形態では、対象における加齢黄斑変性(AMD)、滲出型AMD、乾性AMD、または地図状萎縮などの黄斑変性を処置し、防止し、または改善する方法が、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは10~30個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号6~808のいずれか一つの核酸塩基配列を含む核酸塩基配列を有する。特定の実施形態では、対象における加齢黄斑変性(AMD)、滲出型AMD、乾性AMD、または地図状萎縮などの黄斑変性を処置し、防止し、または改善する方法が、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは配列番号198、228、237、440、444、448、450、453、455、549、及び598のいずれか一つを含む核酸塩基配列を有する10~30個の連結されたヌクレオシドからなる。特定の実施形態では、対象における加齢黄斑変性(AMD)、滲出型AMD、乾性AMD、または地図状萎縮などの黄斑変性を処置し、防止し、または改善する方法が、ISIS696844、ISIS696845、ISIS698969、もしくはISIS698970を含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含む。特定の態様では、前記化合物または組成物が、前記対象に非経口投与される。

30

40

50

【 0 2 3 6 】

特定の実施形態において、対象における補体代替経路の調節異常に関連する腎臓疾患を処置し、防止し、または改善する方法は、本明細書に記載する化合物または組成物を前記対象に投与し、よって前記腎臓疾患を処置し、防止し、または改善することを含む。特定の実施形態では、対象における補体代替経路の調節異常に関連する腎臓疾患を処置し、防止し、または改善する方法が、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは10～30個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号6～808のいずれか一つの核酸塩基配列を含む核酸塩基配列を有する。特定の実施形態では、対象における補体代替経路の調節異常に関連する腎臓疾患を処置し、防止し、または改善する方法が、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号198、228、237、440、444、448、450、453、455、549、及び598のいずれか一つを含む核酸塩基配列を有する10～30個の連結されたヌクレオシドからなる。特定の実施形態では、対象における補体代替経路の調節異常に関連する腎臓疾患を処置し、防止し、または改善する方法が、ISIS696844、ISIS696845、ISIS698969、もしくはISIS698970を含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含む。特定の態様では、補体代替経路が正常より強く活性化されている。特定の態様では、前記腎臓疾患が、ループス腎炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、デンスデポジット病(DDD)、C3系球体腎炎(C3GN)、CFHR5ネフロパシー、もしくは非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)、またはそれらの任意の組み合わせである。特定の態様では、前記腎臓疾患が、系球体におけるC3沈着などといったC3沈着に関連する。特定の態様では、前記腎臓疾患が、正常値未満の循環C3レベル、例えば血清中または血漿中C3レベルに関連する。特定の態様では、前記化合物または組成物を投与することにより、C3タンパク質レベルなどの眼C3レベルの蓄積が低減し、または阻害される。特定の態様では、前記化合物または組成物を投与することにより、眼C3沈着のレベルが低減し、または眼C3沈着の蓄積が阻害される。特定の態様では、前記化合物または組成物が前記対象に非経口投与される。特定の態様では、前記化合物または組成物を投与することにより、腎臓におけるC3レベル、例えばC3タンパク質レベルの蓄積が低減し、または阻害される。特定の態様では、前記化合物または組成物を投与することにより、例えば系球体におけるC3レベルなどの腎臓C3沈着のレベルが低減し、または腎臓C3沈着の蓄積が阻害される。特定の態様において、前記対象は、例えば対象の血中の補体レベルまたは膜侵襲複合体レベルを検出し、かつ/または補体代替経路の調節異常に関連する疾患に関連する補体因子の遺伝子突然変異に関する遺伝子検査を行うことによって、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するか、または前記疾患を有するリスクがあると特定される。

【 0 2 3 7 】

特定の実施形態において、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象における補体B因子(CFB)の発現を阻害する方法は、本明細書に記載する化合物または組成物を前記対象に投与し、それによって前記対象におけるCFBの発現を阻害することを含む。特定の実施形態では、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象における補体B因子(CFB)の発現を阻害する方法が、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは10～30個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号6～808のいずれか一つの核酸塩基配列を含む核酸塩基配列を有する。特定の実施形態では、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象における補体B因子(CFB)の発現を阻害する方法が、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号198、228、237、440、444、448、450、453、

10

20

30

40

50

455、549、及び598のいずれか一つを含む核酸塩基配列を有する10～30個の連結されたヌクレオシドからなる。特定の実施形態では、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象における補体B因子(CFB)の発現を阻害する方法が、ISIS696844、ISIS696845、ISIS698969、もしくはISIS698970を含むかまたはそれからなる化合物を前記対象に投与することを含む。特定の態様では、前記化合物または組成物を投与することにより、眼におけるCFBの発現が阻害される。特定の態様において、前記対象は、加齢黄斑変性(AMD)、例えば滲出型AMD及び乾性AMDを有するか、またはそれらを有するリスクがある。特定の態様では、乾性AMDが地図状萎縮でありうる。地図状萎縮は、網膜の変性を伴う進行した形態の乾性AMDとみなされる。特定の態様では、前記化合物または組成物を投与することにより、腎臓、例えば糸球体におけるCFBの発現が阻害される。特定の態様において、前記対象は、ループ腎炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、デンスデポジット病(DDD)、C3糸球体腎炎(C3GN)、CFHR5ネフロパシー、もしくは非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)、またはそれらの任意の組み合わせを有するか、またはそれらを有するリスクがある。

10

【0238】

特定の実施形態において、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象の眼におけるC3沈着を低減またはC3沈着の蓄積を阻害する方法は、本明細書に記載する化合物または組成物を前記対象に投与し、それによって前記対象の眼におけるC3沈着を低減またはC3沈着の蓄積を阻害することを含む。特定の実施形態では、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象の眼におけるC3沈着を低減またはC3沈着の蓄積を阻害する方法が、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは10～30個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号6～808のいずれか一つの核酸塩基配列を含む核酸塩基配列を有する。特定の実施形態では、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象の眼におけるC3沈着を低減またはC3沈着の蓄積を阻害する方法が、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号198、228、237、440、444、448、450、453、455、549、及び598のいずれか一つを含む核酸塩基配列を有する10～30個の連結されたヌクレオシドからなる。特定の実施形態では、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象の眼におけるC3沈着を低減またはC3沈着の蓄積を阻害する方法が、ISIS696844、ISIS696845、ISIS698969、もしくはISIS698970を含むかまたはそれからなる化合物を前記対象に投与することを含む。特定の態様では、前記対象が、加齢黄斑変性(AMD)、例えば滲出型AMD及び乾性AMDを有するか、またはそれらを有するリスクがある。特定の態様では、乾性AMDが地図状萎縮でありうる。特定の態様では、前記化合物または組成物が前記対象に非経口投与される。

20

30

【0239】

特定の実施形態において、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象の腎臓におけるC3沈着を低減またはC3沈着の蓄積を阻害する方法は、本明細書に記載する化合物または組成物を前記対象に投与し、それによって前記対象の腎臓におけるC3沈着を低減またはC3沈着の蓄積を阻害することを含む。特定の実施形態では、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象の腎臓におけるC3沈着を低減またはC3沈着の蓄積を阻害する方法が、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは10～30個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号6～808のいずれか一つの核酸塩基配列を含む核酸塩基配列を有する。特定の実施形態では、補体代替経路の調節異常に関連する疾

40

50

患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象の腎臓におけるC3沈着を低減しまたはC3沈着の蓄積を阻害する方法が、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含み、前記修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号198、228、237、440、444、448、450、453、455、549、及び598のいずれか一つを含む核酸塩基配列を有する10～30個の連結されたヌクレオシドからなる。特定の実施形態では、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象の腎臓におけるC3沈着を低減しまたはC3沈着の蓄積を阻害する方法が、ISIS696844、ISIS696845、ISIS698969、もしくはISIS698970を含むかまたはそれらからなる化合物を前記対象に投与することを含む。特定の態様では、前記対象が、ループス腎炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、デンスデポジット病(DDD)、C3系球体腎炎(C3GN)、CFHR5ネフロパシー、もしくは非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)、またはそれらの任意の組み合わせを有するか、またはそれらを有するリスクがある。特定の態様において、前記化合物または組成物が前記対象に非経口投与される。

10

【0240】

特定の実施形態は、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を処置するための、本明細書に記載する化合物または組成物の使用に向けられる。特定の実施形態は、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を処置するための、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物の使用であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが10～30個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号6～808のいずれか一つの核酸塩基配列を含む核酸塩基配列を有するものに向けられる。特定の実施形態は、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を処置するための、修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含むかまたはそれらからなる化合物の使用であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号198、228、237、440、444、448、450、453、455、549、及び598のいずれか一つを含む核酸塩基配列を有する10～30個の連結されたヌクレオシドからなるものに向けられる。特定の実施形態は、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を処置するための、ISIS696844、ISIS696845、ISIS698969、もしくはISIS698970を含むかまたはそれらからなる化合物の使用に向けられる。特定の態様では、補体代替経路が正常より強く活性化されている。特定の態様では、前記疾患が黄斑変性、例えば加齢黄斑変性(AMD)であり、これは滲出型AMDまたは乾性AMDでありうる。特定の態様では、乾性AMDが地図状萎縮でありうる。特定の態様では、前記疾患が、ループス腎炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、デンスデポジット病(DDD)、C3系球体腎炎(C3GN)、CFHR5ネフロパシー、もしくは非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)、またはそれらの任意の組み合わせなどといった腎臓疾患である。特定の態様では、前記化合物または組成物が前記対象に非経口投与される。

20

30

【0241】

特定の実施形態では、本明細書に記載する化合物または組成物が非経口投与される。例えば特定の態様では、前記化合物または組成物を、注射または注入によって投与することができる。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、例えば髄腔内投与または脳室内投与が含まれる。

40

【0242】

アンチセンス化合物

オリゴマー化合物には、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオチド模倣物、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が含まれるが、これらに限定されない。オリゴマー化合物は、標的核酸に対して「アンチセンス」である(つまり、水素結合によって標的核酸にハイブリダイゼーションを起こす能力を有する)ことができる。

【0243】

特定の態様では、アンチセンス化合物が、5' 3'方向に記載した場合に、そのアン

50

チセンス化合物が標的とする標的核酸の標的セグメントの逆相補鎖を含む核酸塩基配列を有する。

【0244】

特定の実施形態では、アンチセンス化合物が10～30サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が12～30サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が12～22サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が14～30サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が14～20サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が15～30サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が15～20サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が16～30サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が16～20サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が17～30サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が17～20サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が18～30サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が18～21サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が18～20サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が20～30サブユニット長である。言い換えると、そのようなアンチセンス化合物は、それぞれ12～30個の連結されたサブユニット、14～30個の連結されたサブユニット、14～20個のサブユニット、15～30個のサブユニット、15～20個のサブユニット、16～30個のサブユニット、16～20個のサブユニット、17～30個のサブユニット、17～20個のサブユニット、18～30個のサブユニット、18～20個のサブユニット、18～21個のサブユニット、20～30個のサブユニット、または12～22個の連結されたサブユニットである。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が14サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が16サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が17サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が18サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が19サブユニット長である。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が20サブユニット長である。別の実施形態では、アンチセンス化合物が、8～80、12～50、13～30、13～50、14～30、14～50、15～30、15～50、16～30、16～50、17～30、17～50、18～22、18～24、18～30、18～50、19～22、19～30、19～50、または20～30個の連結されたサブユニットである。特定のそのような実施形態では、アンチセンス化合物が、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個の連結されたサブユニットの長さ、または上記の値のいずれか2つによって画定される範囲である。いくつかの実施形態では、前記アンチセンス化合物がアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、前記連結されたサブユニットがヌクレオチドである。

【0245】

特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドが短縮または切断されていてもよい。例えば、単一のサブユニットを5'端から欠失させるか(5'切断)、あるいは3'端から欠失させること(3'切断)ができる。CFB核酸を標的とする短縮型または切断型アンチセンス化合物は、アンチセンス化合物の5'端から2つのサブユニットが欠失しているか、あるいは3'端から2つのサブユニットが欠失していてもよい。あるいは、欠失したヌクレオチドは、アンチセンス化合物全体に分散していてもよい(例えば1つのヌクレオチドが5'端から欠失し1つのヌクレオチドが3'端から欠失しているアンチセンス化合物)。

【0246】

10

20

30

40

50

延長されたアンチセンス化合物中に単一の追加サブユニットが存在する場合、前記追加サブユニットはアンチセンス化合物の5'端にあっても、3'端にあってもよい。2つ以上のサブユニットが存在する場合、追加されたサブユニットは互いに隣り合っているか(5'付加)、あるいは3'端に付加されている(3'付加)アンチセンス化合物)。あるいは、付加されたサブユニットは、アンチセンス化合物全体に分散しているか(例えば1つのサブユニットが5'端に付加され、1つのサブユニットが3'端に付加されているアンチセンス化合物)。

【0247】

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など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ら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992)では、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が、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された。アンチセンスオリゴヌクレオチドの末端近くに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の特異的切断を指示することができた。また、標的的特異的切断が、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つのミスマッチを持つものを含む)を使って達成された。

【0248】

Gautschiら(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、インピトロ及びインピボでbcl-2とbcl-xLの発現をどちらも低減できることを実証した。さらにまた、このオリゴヌクレオチドはインピボで強力な抗腫瘍活性も示した。

【0249】

Maherと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つの前記タンデムアンチ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。

【0250】

特定のアンチセンス化合物モチーフ及び機序

特定の実施形態では、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アフィニティ、またはインピボヌクレアーゼによる分解に対する耐性などといった性質が前記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。

【0251】

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アフィニティ、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、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などといった、もう一つの望ましい性質を付与する。

【0252】

アンチセンス活性は、アンチセンス化合物(例えばオリゴヌクレオチド)と標的核酸とのハイブリダイゼーションが関与し、そのハイブリダイゼーションが最終的に生物学的活

10

20

30

40

50

性をもたらす機序であれば、どの機序に起因するものであってもよい。特定の実施形態では、標的核酸の量及び/または活性が調節される。特定の実施形態では、標的核酸の量及び/または活性が低減する。特定の実施形態では、標的核酸へのアンチセンス化合物のハイブリダイゼーションが、最終的に、標的核酸分解をもたらす。特定の実施形態では、標的核酸へのアンチセンス化合物のハイブリダイゼーションが、標的核酸分解をもたらさない。特定のそのような実施形態では、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）が、アンチセンス活性の調節をもたらす。特定の実施形態では、ある特定の化学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が、1つ以上の機序を活用するのに、特に適している。特定の実施形態では、2つ以上の機序によって、かつ/またはまだ解明されていない機序によって、アンチセンス化合物が機能する。したがって、本明細書に記載するアンチセンス化合物は、ある特定の機序に限定されるものではない。

10

【0253】

アンチセンス機序には、RNase Hによるアンチセンス；RNAi機序（これはRISC経路を利用するもので、siRNA、ssRNA及びマイクロRNA機序がこれに含まれるが、これらに限定されない）；及び占有に基づく機序などがあるが、これらに限定されない。特定のアンチセンス化合物は、2つ以上のそのような機序によって、かつ/またはさらに他の機序によって、作用しうる。

【0254】

RNase Hによるアンチセンス

特定の実施形態では、アンチセンス活性が、少なくとも部分的には、RNase Hによる標的RNAの分解に起因する。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は哺乳動物細胞においてRNase H活性を引き出すことが、当技術分野では知られている。したがって、DNAヌクレオシドまたはDNA様ヌクレオシドの少なくとも一部分を含むアンチセンス化合物は、RNase Hを活性化して、標的核酸の切断をもたらす。特定の実施形態では、RNase Hを利用するアンチセンス化合物が、1つ以上の修飾ヌクレオシドを含む。特定の実施形態では、そのようなアンチセンス化合物が、1～8個の修飾ヌクレオシドのブロックを少なくとも1つは含む。特定のそのような実施形態では、前記修飾ヌクレオシドがRNase H活性を支持しない。特定の実施形態では、そのようなアンチセンス化合物が、本明細書に記載するギャップマーである。特定のそのような実施形態では、前記ギャップマーのギャップがDNAヌクレオシドを含む。特定のそのような実施形態では、前記ギャップマーのギャップがDNA様ヌクレオシドを含む。特定の実施形態では、前記ギャップマーのギャップがDNAヌクレオシドとDNA様ヌクレオシドを含む。

20

30

【0255】

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みなされる。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チ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役立ち、一方、ウイングセグメントは修飾ヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、ギャップマーの領域が、個々の異なる領域を構成する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では、 $2'$ -D-リボヌクレオチド、 $2'$ -D-デオキシリボヌクレオチド、 $2'$ -修飾ヌクレオチド（そのような $2'$ -修飾ヌクレオチドとして、例えば $2'$ -MOEや $2'$ -O-CH₃などを挙げることができる）、及び二環式糖修飾ヌクレオチド（そのような二環式糖修飾ヌクレオチ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。特定の実施形態では、ウイング中のヌクレオチドがいくつかの修飾糖部分、例えば

40

$2'$ -MOEや、拘束エチルまたはLNAなどの二環式糖部分を含む。特定の実施形態では

50

、ウイングがいくつかの修飾糖部分と無修飾糖部分を含む。特定の実施形態では、ウイングが、2'-MOEヌクレオシド、拘束エチルヌクレオシドやLNAヌクレオシドなどの二環式糖部分、及び2'-デオキシヌクレオシドのさまざまな組み合わせを含みうる。

【0256】

異なる領域は、それぞれ一様な糖部分を含むか、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うる。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」と「Z」は、一様な糖部分を含むか、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うる。特定の実施形態では、「X」と「Y」が、1つ以上の2'-デオキシヌクレオシドを含みうる。「Y」は2'-デオキシヌクレオシドを含みうる。本明細書において、「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り合っ

10

【0257】

特定の実施形態において、CFB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個の連結されたヌクレオシドからなるギャップマーモチーフを有する。

20

【0258】

特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、以下の式Aによって記述される糖モチーフを有する： $(J)_m - (B)_n - (J)_p - (B)_r - (A)_t - (D)_g - (A)_v - (B)_w - (J)_x - (B)_y - (J)_z$

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であり、

各Dは2'-デオキシヌクレオシドであり、

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

ただし、

m、n、及びrのうちの少なくとも1つは0ではなく、

w及びyのうちの少なくとも1つは0ではなく、

m、n、p、r、及びtの和は2~5であり、かつ

v、w、x、y、及びzの和は2~5であるものとする。

30

40

【0259】

RNAi化合物

特定の実施形態では、アンチセンス化合物が干渉RNA化合物(RNAi)であり、これには、二本鎖RNA化合物(短鎖干渉RNAまたはsiRNAともいう)と一本鎖RNAi化合物(すなわちssRNA)が含まれる。そのような化合物は、少なくとも部分的には、RISC経路によって作動して、標的核酸を分解しかつ/または隔離する(したがってマイクロRNA/マイクロRNA模倣化合物を含む)。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、それらをそのような機序に特に適したものに修飾を含む。

【0260】

i. ssRNA化合物

50

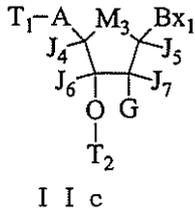
特定の実施形態において、アンチセンス化合物（一本鎖RNA_i化合物（ssRNA））としての使用に特に適したものを含む）は、修飾5'末端を含む。特定のそのような実施形態では、前記5'末端が修飾ホスフェート部分を含む。特定の実施形態では、そのような修飾ホスフェートが安定化されている（例えば無修飾5'-ホスフェートと比較して分解/切断に対して耐性である）。特定の実施形態では、そのような5'末端ヌクレオシドが5'-リン部分を安定化する。当技術分野では、いくつかの修飾5'末端ヌクレオシドを、例えばWO/2011/139702などに見いだすことができる。

【0261】

特定の実施形態では、ssRNA化合物の5'-ヌクレオシドが式IIcを有する：

【0262】

【化10】



式中、

T₁は、保護されていてもよいリン部分であり、

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は式：

【0263】

【化11】



の一つを有し；

Q₁及びQ₂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、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、

各R₃、R₄、R₅、R₆及びR₇は、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)(B×2)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、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、

B×1は複素環式塩基部分であるか；または

B×2が存在する場合には、B×2が複素環式塩基部分であり、かつB×1が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

10

20

30

40

50

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 $C_2 - C_6$ アルキニルであるか；または

J_4 が、 J_5 または J_7 の一方と共に、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む橋を形成し、かつ J_5 、 J_6 及び J_7 の残り 2 つが、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、各 R_{19} 、 R_{20} 及び R_{21} は、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 $C_2 - C_6$ アルキニルであり、 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、

各 R_8 及び R_9 は、独立して、H、ハロゲン、 $C_1 - C_6$ アルキルまたは置換 $C_1 - C_6$ アルキルであり、

X_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、

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 つ以上の置換されていてもよい置換基を含み、

X_2 は、O、S または NJ_3 であり、

各 J_1 、 J_2 及び J_3 は、独立して、H または $C_1 - C_6$ アルキルであり、

j が 1 である場合、 Z はハロゲンでも $N(E_2)(E_3)$ でもなく、かつ

前記オリゴマー化合物は 8 ~ 40 個のモノマー型サブユニットを含み、標的核酸の少なくとも一部分にハイブリダイズ可能である。

【0264】

特定の実施形態では、 M_3 が、O、 $CH=CH$ 、 OCH_2 または $OC(H)(B \times 2)$ である。特定の実施形態では、 M_3 が O である。

【0265】

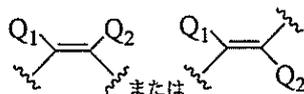
特定の実施形態では、 J_4 、 J_5 、 J_6 及び J_7 がそれぞれ H である。特定の実施形態では、 J_4 が、 J_5 または J_7 の一方と共に橋を形成する。

【0266】

特定の実施形態では、 A が、式：

【0267】

【化12】



の一方を有し、

10

20

30

40

50

式中、

Q₁及びQ₂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アルコキシまたは置換C₁-C₆アルコキシである。特定の実施形態では、Q₁及びQ₂が、それぞれHである。特定の実施形態では、Q₁及びQ₂が、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、Q₁及びQ₂がHであり、Q₁及びQ₂の他方がF、CH₃またはOCH₃である。

【0268】

特定の実施形態では、T₁が式：

【0269】

【化13】



10

を有し、

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、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、保護アミノまたは置換アミノであり、かつ

R_bは、OまたはSである。特定の実施形態では、R_bがOであり、R_a及びR_cが、それぞれ独立して、OCH₃、OCH₂CH₃またはCH(CH₃)₂である。

20

【0270】

特定の実施形態では、Gが、ハロゲン、OCH₃、OCH₂F、OCHF₂、OCF₃、OCH₂CH₃、O(CH₂)₂F、OCH₂CHF₂、OCH₂CF₃、OCH₂-CH=CH₂、O(CH₂)₂-OCH₃、O(CH₂)₂-SCH₃、O(CH₂)₂-OCF₃、O(CH₂)₃-N(R₁₀)(R₁₁)、O(CH₂)₂-ON(R₁₀)(R₁₁)、O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(R₁₀)(R₁₁)、OCH₂C(=O)-N(R₁₀)(R₁₁)、OCH₂C(=O)-N(R₁₂)-(CH₂)₂-N(R₁₀)(R₁₁)またはO(CH₂)₂-N(R₁₂)-C(=NR₁₃)[N(R₁₀)(R₁₁)]であり、式中、R₁₀、R₁₁、R₁₂及びR₁₃は、それぞれ独立して、HまたはC₁-C₆アルキルである。特定の実施形態では、Gが、ハロゲン、OCH₃、OCF₃、OCH₂CH₃、OCH₂CF₃、OCH₂-CH=CH₂、O(CH₂)₂-OCH₃、O(CH₂)₂-O(CH₂)₂-N(CH₃)₂、OCH₂C(=O)-N(H)CH₃、OCH₂C(=O)-N(H)-(CH₂)₂-N(CH₃)₂またはOCH₂-N(H)-C(=NH)NH₂である。特定の実施形態では、Gが、F、OCH₃またはO(CH₂)₂-OCH₃である。特定の実施形態では、GがO(CH₂)₂-OCH₃である。

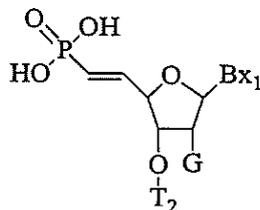
30

【0271】

特定の実施形態では、前記5'末端ヌクレオシドが式I I e：

【0272】

【化14】



I I e

40

50

を有する。

【0273】

特定の実施形態において、アンチセンス化合物（ssRNAに特に適したものを含む）は、オリゴヌクレオチドまたはその領域に沿って、所定のパターンまたは糖修飾モチーフで配置された、1タイプ以上の修飾糖部分及び/または天然に存在する糖部分を含む。そのようなモチーフは、本明細書で論じる糖修飾及び/または他の既知の糖修飾をどれでも含む。

【0274】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、一様な糖修飾を有する領域を含むか、または一様な糖修飾を有する領域からなる。特定のそのような実施形態では、前記領域の各ヌクレオチドが、同じRNA様糖修飾を含む。特定の実施形態では、前記領域の各ヌクレオチドが2'-Fヌクレオチドである。特定の実施形態では、前記領域の各ヌクレオチドが2'-OMeヌクレオチドである。特定の実施形態では、前記領域の各ヌクレオチドが2'-MOEヌクレオチドである。特定の実施形態では、前記領域の各ヌクレオチドがcEtヌクレオチドである。特定の実施形態では、前記領域の各ヌクレオチドがLNAヌクレオチドである。特定の実施形態では、前記一様な領域が、前記オリゴヌクレオチドの全部または本質的に全部を構成する。特定の実施形態では、前記領域が1~4個の末端ヌクレオチドを除くオリゴヌクレオチド全体を構成する。

【0275】

特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、糖修飾が交互に並んだ1つ以上の領域を含み、前記ヌクレオチドは、第1タイプの糖修飾を有するヌクレオチドと、第2タイプの糖修飾を有するヌクレオチドとの間で交互する。特定の実施形態では、両タイプのヌクレオチドがRNA様ヌクレオチドである。特定の実施形態では、交互に並ぶヌクレオチドが、2'-OMe、2'-F、2'-MOE、LNA、及びcEtから選択される。特定の実施形態では、交互修飾が、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いし、異なる修飾がなされたヌクレオチドまたは共役ヌクレオチドによって中断されていてもよい。

【0276】

特定の実施形態では、交互修飾の交互領域が、それぞれ単一のヌクレオチドからなる（すなわち、パターンは $(AB)_x A_y$ であり、ここでAは第1タイプの糖修飾を有するヌクレオチドであり、Bは第2タイプの糖修飾を有するヌクレオチドである。また、xは1~20であり、yは0または1である）。特定の実施形態では、交互モチーフで交互に並ぶ1つ以上の領域が、あるタイプのヌクレオチドを2つ以上含む。例えばオリゴヌクレオチドは、以下のヌクレオチドモチーフのいずれかの領域を1つ以上含む：

AA BB AA、

AB B A B B、

AA B A A B、

AB B A B A A B B、

AB A B A A、

AA B A B A B、

AB A B A A、

AB B A A B B A B A B A A、

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タイプのヌクレオチドであり、Bは第2タイプのヌクレオチドである]

。特定の実施形態では、A及びBは、それぞれ2'-F、2'-OMe、BNA、及びMOEから選択される。

【0277】

特定の実施形態では、そのような交互モチーフを有するオリゴヌクレオチドが、修飾5'末端ヌクレオチド、例えば式IIcまたは式IIeに示すものも含む。

【0278】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、2 - 2 - 3モチーフを有する領域を含む。

そのような領域は、以下のモチーフを含む：



式中、Aは第1タイプの修飾ヌクレオシドであり、

B及びCは、Aとは異なる修飾がなされたヌクレオシドであるが、BとCとは互いに同じ修飾を有しても異なる修飾を有してもよく、

x及びyは1～15である。

【0279】

特定の実施形態では、Aが2' - OMe修飾ヌクレオシドである。特定の実施形態では、B及びCがどちらも2' - F修飾ヌクレオシドである。特定の実施形態では、Aが2' - OMe修飾ヌクレオシドであり、かつBとCがどちらも2' - F修飾ヌクレオシドである。

10

【0280】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、以下の糖モチーフを有する：



式中、

Qは、安定化されたホスフェート部分を含むヌクレオシドであり（特定の実施形態では、Qが、式IIcまたは式IIEを有するヌクレオシドである）、

Aは、第1タイプの修飾ヌクレオシドであり、

Bは、第2タイプの修飾ヌクレオシドであり、

20

Dは、Dと隣り合う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り（したがって、もしyが0であれば、Dには、Bとは異なる修飾がなされていなければならない、yが1であれば、Dには、Aとは異なる修飾がなされていなくてはならない。特定の実施形態では、Dが、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。

【0281】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが次の糖モチーフを有する：



式中、

Qは、安定化されたホスフェート部分を含むヌクレオシドであり（特定の実施形態では、Qが式IIcまたは式IIEを有するヌクレオシドである）、

Aは、第1タイプ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り、

Xは11～30であり、

Zは0～4である。

30

【0282】

特定の実施形態では、上記モチーフ中のA、B、C、及びDが、2' - OMe、2' - F、2' - MOE、LNA、及びcEtから選択される。特定の実施形態では、Dが末端ヌクレオシドを表す。特定の実施形態では、そのような末端ヌクレオシドが、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（ただし偶然ハイブリダイズするものは多少あるかもしれない）。特定の実施形態では、各Dヌクレオシドの核酸塩基が、標的核酸の対応する位置にある核酸塩基の実体には関わりなく、アデニンである。特定の実施形態では、各Dヌクレオシドの核酸塩基がチミンである。

40

【0283】

特定の実施形態において、アンチセンス化合物（ssRNAとしての使用に特に適したものを含む）は、オリゴヌクレオチドまたはその領域に沿って、所定のパターンまたは修飾ヌクレオシド間連結部モチーフで配置された修飾ヌクレオシド間連結部を含む。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、交互ヌクレオシド間連結部モチーフを有する領域を

50

含む。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、一様な修飾ヌクレオシド間連結部の領域を含む。特定のような実施形態において、前記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連結部によって一様に連結された領域を含む。特定の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドが、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部によって一様に連結されている。特定の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間連結部が、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。特定の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間連結部が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、かつ少なくとも1つのヌクレオシド間連結部がホスホロチオエートである。

【0284】

特定の実施形態において、前記オリゴヌクレオチドは、少なくとも6つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。特定の実施形態において、前記オリゴヌクレオチドは、少なくとも8つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。特定の実施形態において、前記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連結部を含む。特定の実施形態において、前記オリゴヌクレオチドは、少なくとも6つの連続するホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のブロックを少なくとも1つは含む。特定の実施形態において、前記オリゴヌクレオチドは、少なくとも8つの連続するホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のブロックを少なくとも1つは含む。特定の実施形態において、前記オリゴヌクレオチドは、少なくとも10個の連続するホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のブロックを少なくとも1つは含む。特定の実施形態において、前記オリゴヌクレオチドは、少なくとも12個の連続するホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のブロックを少なくとも1つは含む。特定のような実施形態では、少なくとも1つのそのようなブロックが、前記オリゴヌクレオチドの3'端に位置する。特定のような実施形態では、少なくとも1つのそのようなブロックが、前記オリゴヌクレオチドの3'端から3ヌクレオシド以内に位置する。

【0285】

本明細書に記載するさまざまな糖モチーフのいずれかを有するオリゴヌクレオチドは、任意の連結部モチーフを有しうる。例えばオリゴヌクレオチド（例えば上述のものが挙げられるが、それらに限定されない）は、以下の非限定的な表から選択される連結部モチーフを有しうる。

【0286】

【表1】

最も5'側の連結部	中央領域	3'領域
PS	交互PO/PS	6PS
PS	交互PO/PS	7PS
PS	交互PO/PS	8PS

【0287】

i i . s i R N A 化合物

特定の実施形態では、アンチセンス化合物が二本鎖RNA *i i* 化合物 (*s i R N A*) である。そのような実施形態では、一方の鎖または両方の鎖が、*s s R N A* について上述した任意の修飾モチーフを含みうる。特定の実施形態において、*s s R N A* 化合物は無修飾RNAでありうる。特定の実施形態において、*s i R N A* 化合物は無修飾RNAヌクレオシドと修飾ヌクレオシド間連結部とを含みうる。

【0288】

いくつかの実施形態は、二本鎖組成物であって、各鎖が1つ以上の修飾ヌクレオシドまたは無修飾ヌクレオシドの場所によって定義されるモチーフを含む、前記二本鎖組成物に関する。特定の実施形態では、完全にハイブリダイズするかまたは少なくとも部分的にハイ

10

20

30

40

50

ブリダイズして二重鎖領域を形成する第1オリゴマー化合物と第2オリゴマー化合物とを含む組成物であって、核酸標的に相補的で核酸標的にハイブリダイズする領域をさらに含む、前記組成物が提供される。そのような組成物が、核酸標的に対する完全な相補性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オリゴマー化合物と、第1オリゴマー化合物に対して相補的な1つ以上の領域を有し第1オリゴマー化合物と共に少なくとも1つの二重鎖領域を形成する第2オリゴマー化合物とを含むことは、適切である。

【0289】

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してその正常な機能を失わせることにより、遺伝子発現を調節する。いくつかの実施形態では、標的核酸がCFBである。特定の実施形態では、標的としたCFBの分解が、本発明の組成物によって形成される活性化RISC複合体によって助長される。

10

【0290】

いくつかの実施形態は、二本鎖組成物であって、一方の鎖が、例えばRISC（または切断）複合体への反対鎖の優先ローディングに影響を及ぼすのに役立つ、前記二本鎖組成物に向けられる。これらの組成物は、選ばれた核酸分子を標的にし、1つ以上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では、本発明の組成物が、標的RNAの一部分にハイブリダイズすることで、前記標的RNAの正常な機能を失わせる。

【0291】

特定の実施形態は、二本鎖組成物であって、両方の鎖がヘミマー（hemimer）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、前記二本鎖組成物に向けられる。本発明の組成物の各鎖は、例えばsiRNA経路において、ある特定の役割を果たすように、修飾することができる。各鎖に異なるモチーフを使用するか、各鎖に異なる化学修飾を持つ同じモチーフを使用することにより、アンチセンス鎖をRISC複合体に誘導すると同時に、センス鎖の組込みを阻害することができる。このモデルでは、各鎖を、その特定の役割が強化されるように、独立して修飾することができる。アンチセンス鎖は、RISCの一領域におけるその役割を強化するために、5'端を修飾することができ、一方、3'端には、RISCの異なる領域におけるその役割を強化するために、異なる修飾を加えることができる。

20

【0292】

二本鎖オリゴヌクレオチド分子は、自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域とを含み、前記アンチセンス領域は、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、前記センス領域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有する、二本鎖ポリヌクレオチド分子であることができる。二本鎖オリゴヌクレオチド分子は、一方の鎖がセンス鎖であり、他方がアンチセンス鎖である、2つの別個のオリゴヌクレオチドから組み立てることができる、前記アンチセンス鎖及びセンス鎖は自己相補的である（すなわち各鎖は、他方の鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列であって、例えばアンチセンス鎖とセンス鎖は二重鎖構造または二本鎖構造を形成し、例えば前記二本鎖領域は約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塩基対である。また、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うちの約15～約25ヌクレオチドまたはそれ以上が、標的核酸またはその一部分に相補的である）。あるいは、前記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組み立てられ、この場合、siRNAの自己相補的なセンス領域及びアンチセンス領域は、核酸系リンカーまたは非核酸系リンカーを利用して連結されている。

30

40

【0293】

前記二本鎖オリゴヌクレオチドは、二重鎖、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持ち、自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域とを有する、ポリヌクレオチドであって、前記アンチセンス領域が、別個の標的核酸分子またはその一部分のヌクレ

50

オチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、前記センス領域が前記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有するものであることができる。前記二本鎖オリゴヌクレオチドは、2つ以上のループ構造と、自己相補的なセンス領域及びアンチセンス領域を含むステムとを有する環状一本鎖ポリヌクレオチドであって、前記アンチセンス領域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、かつ前記センス領域は前記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有するものであることができ、前記環状ポリヌクレオチドは、インピボまたはインピトロでプロセッシングを受けて、RNAiを媒介する能力を有する活性なsiRNA分子を生成させることができる。

【0294】

特定の実施形態では、前記二本鎖オリゴヌクレオチドが、別個のセンス配列またはセンス領域及びアンチセンス配列またはアンチセンス領域を含み、前記センス領域とアンチセンス領域は、当技術分野に知られているヌクレオチド連結分子または非ヌクレオチド連結分子によって共有結合的に連結されているか、あるいはイオン相互作用、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ている。特定の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドが、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。もう一つの実施形態では、前記二本鎖オリゴヌクレオチドが、標的遺伝子のヌクレオチド配列と、前記標的遺伝子の発現阻害を引き起こすような形で相互作用する。

【0295】

本明細書にいう二本鎖オリゴヌクレオチドは、RNAだけを含有する分子に限定される必要はなく、さらに化学修飾ヌクレオチド及び非ヌクレオチドも包含する。特定の実施形態において、短鎖干渉核酸分子は2'-ヒドロキシ(2'-OH)含有ヌクレオチドを欠く。特定の実施形態において、短鎖干渉核酸は、場合によっては、リボヌクレオチド(例えば2'-OH基を有するヌクレオチド)を一切含まない。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には、2'-OH基を持つ1つまたは複数のヌクレオチドを含有する1つまたは複数のリンカーを取り付けておくか、2'-OH基を持つ1つまたは複数のヌクレオチドを含有する他の基、部分、または鎖を取り付けまたは会合させておくことができる。場合により、二本鎖オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド位置の約5、10、20、30、40、または50%に、リボヌクレオチドを含むことができる。本明細書において使用する用語siRNAは、配列特異的RNAiを媒介する能力を有する核酸分子を記載するために使用される他の用語、例えば短鎖干渉RNA(sRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、マイクロRNA(miRNA)、低分子ヘアピンRNA(shRNA)、短鎖干渉オリゴヌクレオチド、短鎖干渉核酸、短鎖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)その他と等価であるものとする。加えて、本明細書において使用する用語RNAiは、配列特異的RNA干渉を記述するために使用される他の用語、例えば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などと等価であるものとする。例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドは、転写後レベルと転写前レベルのどちらでも、遺伝子をエピジェネティックにサイレンシングするために使用することができる。非限定的な一例において、本発明のsiRNA分子による遺伝子発現のエピジェネティックな調整は、遺伝子発現を改変するためのクロマチン構造またはメチル化パターンのsiRNA媒介修飾に起因しうる(例えばVerdelet al., 2004, Science, 303, 672-676; Pal-Bhadra et al., 2004, Science, 303, 669-672; Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; 及びHall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237を参照されたい)。

【0296】

ここに提供す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持つ一本のRNA鎖が二本鎖コンフォメーションをとる能力を持つ「ヘアピン」またはステム-ループ二本鎖RNAエフェクター分子や、2本の別個のRNA鎖を含む二重鎖dsRNAエフェクター分子などといったdsRNA媒介遺伝子サイレンシング機序またはRNAi機序によって、CFBを標的にすることができると考えられる。さまざまな実施形態において、dsRNAはもっぱらリボヌクレオチドからなるか、またはリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドの混合物からなる（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出願第60/130,377号などに開示されているRNA/DNAハイブリッド）。dsRNAまたはdsRNAエフェクター分子は、前記分子のセグメントが前記分子のもう一つのセグメントにあるヌクレオチドと塩基対を形成するように自己相補性領域を持つ単一の分子でありうる。さまざまな実施形態において、単一の分子からなるdsRNAは、もっぱらリボヌクレオチドからなるか、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、互いに相補性領域を有する2つの異なる鎖を含みうる。

10

【0297】

さまざまな実施形態では、両方の鎖がもっぱらリボヌクレオチドからなるか、一方の鎖がもっぱらリボヌクレオチドからなり、かつ一方の鎖がもっぱらデオキシリボヌクレオチドからなるか、または一方もしくは両方の鎖がリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドの混合物を含有する。特定の実施形態では、相補性領域が、互いに、及び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。特定の実施形態では、二本鎖コンフォメーションで存在するdsRNAの領域が、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、dsRNAに表現されているcDNAまたは他の標的核酸配列中のヌクレオチドのすべてを含む。いくつかの実施形態では、dsRNAが、一本鎖端などの一本鎖領域を一切含有しないか、またはdsRNAがヘアピンである。別の実施形態では、dsRNAが1つ以上の一本鎖領域またはオーバーハングを有する。特定の実施形態では、RNA/DNAハイブリッドが、アンチセンス鎖またはアンチセンス領域である（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）DNA鎖またはDNA領域と、センス鎖またはセンス領域である（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）RNA鎖またはRNA領域とを含むか、またはその逆である。

20

30

【0298】

さまざまな実施形態では、前記RNA/DNAハイブリッドが、酵素法または化学合成法、例えば本明細書に記載するもの、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出願第60/130,377号に記載されているものを使って、インビトロで作製される。別の実施形態では、インビトロで合成されたDNA鎖が、細胞への前記DNA鎖の形質転換に先だって、またはその後、またはそれと並行して、インビボまたはインビトロで作製されたRNA鎖と複合体を形成する。さらに別の実施形態では、dsRNAが、センス領域とアンチセンス領域とを含有する単一の環状核酸であるか、またはdsRNAが、環状核酸と第二の環状核酸または線状核酸とを含む（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出願第60/130,377号を参照されたい）。例示的環状核酸として、ヌクレオチドの遊離5'ホスホリル基がもう一つのヌクレオチドの2'ヒドロキシル基に輪を描いて元に戻るように連結された状態になる、投げ縄（lariat）構造が挙げられる。

40

【0299】

別の実施形態では、dsRNAが、糖の2'位にハロゲン（フッ素基など）を含有するか、アルコキシ基（メトキシ基など）を含有する修飾ヌクレオチドを1つ以上含有する。この

50

ハロゲンまたはアルコキシ基は、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、dsRNA のインビトロまたはインビボでの半減期を増加させる。さらに別の実施形態では、dsRNA が、隣接するヌクレオチド間に天然に存在するホスホジエステル連結部以外の連結部を 1 つ以上含む。そのような連結部の例として、ホスホルアミド、ホスホロチオエート、及びホスホロジチオエート連結部が挙げられる。dsRNA は、米国特許第 6,673,661 号に教示されているような化学修飾核酸分子であってもよい。別の実施形態では、dsRNA が、例えば 2000 年 4 月 19 日に出版された WO 00/63364 または 1999 年 4 月 21 日に出版された米国出願第 60/130,377 号に開示されているように、1 本または 2 本のキャップ鎖を含有する。

【0300】

10

別の実施形態では、dsRNA が、WO 00/63364 に開示されている少なくとも部分的な dsRNA 分子のいずれかであることも、米国仮特許出願第 60/399,998 号及び米国仮特許出願第 60/419,532 号ならびに PCT/US 2003/033466 に記載の dsRNA 分子のいずれかであることもでき、これらの文献の教示内容は、参照により本明細書に組み込まれる。dsRNA はいずれも、本明細書に記載する方法を使って、または標準的方法、例えば WO 00/63364 に記載の方法を使って、インビトロまたはインビボで発現させることができる。

【0301】

占有

特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、RNase H による標的核酸の切断をもたらすとも、RISC 経路による切断または隔離をもたらすとも予想されない。特定のそのような実施形態では、アンチセンス活性が占有に起因する。この場合は、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。特定のそのような実施形態では、アンチセンス化合物が、一様に修飾されていてもよいし、修飾物が混在し、かつ/または修飾ヌクレオチドと無修飾ヌクレオチドとが混在していてもよい。

20

【0302】

標的核酸、標的領域及びヌクレオチド配列

補体 B 因子 (CFB) をコードするヌクレオチド配列には、次に挙げるものがあるが、これらに限定されない: GENBANK アクセッション番号 NM_001710.5 (本明細書には配列番号 1 として組み込まれる)、ヌクレオチド 31852000 ~ 31861000 が切り出された GENBANK アクセッション番号 NT_007592.15 (本明細書には配列番号 2 として組み込まれる)、ヌクレオチド 536000 ~ 545000 が切り出された GENBANK アクセッション番号 NW_001116486.1 (本明細書には配列番号 3 として組み込まれる)、GENBANK アクセッション番号 XM_001113553.2 (本明細書には配列番号 4 として組み込まれる)、または GENBANK アクセッション番号 NM_008198.2 (本明細書には配列番号 5 として組み込まれる)。

30

【0303】

ハイブリダイゼーション

いくつかの実施形態では、本明細書に開示するアンチセンス化合物と CFB 核酸との間でハイブリダイゼーションが起こる。最もよくあるハイブリダイゼーションの機序は、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、フーグステイーン型または逆フーグステイーン型水素結合形成) を必要とする。

40

【0304】

ハイブリダイゼーションは、さまざまな条件下で起こりうる。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まる。

【0305】

ある配列が標的核酸に特異的にハイブリダイズすることができるかどうかを決定する方法は、当技術分野では周知である。特定の実施形態において、ここに提供するアンチセンス

50

化合物は、C F B 核酸と特異的にハイブリダイズすることができる。

【0306】

相補性

アンチセンス化合物の十分な数の核酸塩基が、所望の効果（例えばC F B 核酸などの標的核酸のアンチセンス阻害）が生じるような形で、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るのであれば、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。

【0307】

アンチセンス化合物が依然として標的核酸に特異的にハイブリダイズできるのであれば、アンチセンス化合物とC F B 核酸の間の非相補的核酸塩基は許容されうる。さらにまた、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な形で、C F B 核酸の1つ以上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）。

【0308】

特定の実施形態において、ここに提供するアンチセンス化合物またはその指定部分は、C F B 核酸、その標的領域、標的セグメント、または指定部分に対して、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%相同であるか、または少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%相同である。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。

【0309】

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であろうアンチセンス化合物は、90パーセントの相補性に相当するであろう。この例では、残りの非相補的核酸塩基は一かたまりになって存在してもよいし、相補的核酸塩基の間に点在していてもよく、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、標的核酸と完全に相補的な2つの領域に挟まれた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であろう。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、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(Altshul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403 410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649 656)を使って、ルーチンに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, ウィスコンシン州マディソン、ユニバーシティ・リサーチ・パーク)により、デフォルト設定を使って決定することができる。

【0310】

特定の実施形態では、ここに提供するアンチセンス化合物またはその指定部分が、標的核酸またはその指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、C F B 核酸、またはその標的領域、または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うる。本明細書にいう「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する能力を有することを意味する。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対応する20核酸塩基部分が標的核酸中に存在するのであれば、400核酸

10

20

30

40

50

塩基長の標的配列に対して完全に相補的である。第1及び/または第2核酸の指定部分に関して完全に相補的という表現を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前記20核酸塩基部分に相補的であるもの）を有するのであれば、標的配列に対して完全に相補的である。同時に、前記30核酸塩基アンチセンス化合物全体は、前記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よって依存して、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。

【0311】

非相補的核酸塩基の場所はアンチセンス化合物の5'端または3'端であることができる。あるいは、1つまたは複数の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。一実施形態では、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中にある。

【0312】

特定の実施形態において、11、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11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20核酸塩基長までのアンチセンス化合物が、CFB核酸またはその指定部分などの標的核酸との比較で含む非相補的核酸塩基は、4つ以下、3つ以下、2つ以下、または1つ以下である。

【0313】

特定の実施形態において、11、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11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30核酸塩基長までのアンチセンス化合物が、CFB核酸またはその指定部分などの標的核酸との比較で含む非相補的核酸塩基は、6つ以下、5つ以下、4つ以下、3つ以下、2つ以下、または1つ以下である。

【0314】

ここ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。ここでいう「一部分」とは、標的核酸の一領域または一セグメント内の所定の数の連続する（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、所定の数の連続する核酸塩基も意味する。特定の実施形態では、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。特定の実施形態では、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9核酸塩基部分に相補的である。特定の実施形態では、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10核酸塩基部分に相補的である。特定の実施形態では、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11核酸塩基部分に相補的である。特定の実施形態では、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。特定の実施形態では、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13核酸塩基部分に相補的である。特定の実施形態では、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14核酸塩基部分に相補的である。特定の実施形態では、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、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、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考えられる。

【0315】

同一性

ここ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

10

20

30

40

50

具体的 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、所定の同一性パーセントも有する。本明細書にいうアンチセンス化合物は、それが同じ核酸塩基対合能を有するのであれば、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 DNA 配列中のチミジンの代わりにウラシルを含有する RNA は、前記 DNA 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、ならびにここ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考えられる。非同一塩基は互いに隣り合っている場合もよいし、アンチセンス化合物全体に散在している場合もよい。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の比較で同一塩基対合を有する塩基の数に従って計算される。

10

【0316】

特定の実施形態では、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、配列番号、またはその一部分の1つ以上と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である。

【0317】

特定の実施形態では、アンチセンス化合物の一部分を、標的核酸のうちの長さが等しい部分と比較する。特定の実施形態では、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25核酸塩基部分を、標的核酸のうちの長さが等しい部分と比較する。

20

【0318】

特定の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドの一部を、標的核酸のうちの長さが等しい部分と比較する。特定の実施形態では、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25核酸塩基部分を、標的核酸のうちの長さが等しい部分と比較する。

【0319】

修飾

ヌクレオシドは塩基 - 糖の組み合わせである。ヌクレオシドの核酸塩基（塩基ともいう）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。オリゴヌクレオチドは、互いに隣り合うヌクレオシドを共有結合で連結して、線状ポリマー状のオリゴヌクレオチドを形成させることによって形成される。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、一般に言われる。

30

【0320】

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み、核酸標的に対する強化されたアフィニティ、ヌクレアーゼの存在下での増加した安定性、増加した阻害活性など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。

40

【0321】

化学修飾ヌクレオシドは、短縮型または切断型アンチオリゴヌクレオチドの、その標的核酸に対する結合アフィニティ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。

【0322】

修飾ヌクレオシド間連結部

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つ以上の修飾（すなわち天然に存在しない）ヌクレオシド間連結部を有

50

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アフィニティ、及びヌクレアーゼの存在下での増加した安定性など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。

【0323】

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、リン原子が保た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、よく知られている。

10

【0324】

特定の実施形態では、CFB核酸を標的とするアンチセンス化合物が、1つ以上の修飾ヌクレオシド間連結部を含む。特定の実施形態では、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。特定の実施形態では、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。

【0325】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドまたはその一領域に沿って、所定のパターンまたは修飾ヌクレオシド間連結部モチーフで配置された修飾ヌクレオシド間連結部を含む。特定の実施形態では、ヌクレオシド間連結部が、ギャップモチーフ (gapped motif) で配置される。そのような実施形態では、2つのウイング領域のそれぞれにあるヌクレオシド間連結部が、ギャップ領域中のヌクレオシド間連結部とは異なる。特定の実施形態では、ウイング中のヌクレオシド間連結部はホスホジエステルであり、ギャップ中のヌクレオシド間連結部はホスホロチオエートである。ヌクレオシドモチーフは独立して選択されるので、ギャップヌクレオシド間連結部モチーフを有するオリゴヌクレオチドは、ギャップヌクレオシドモチーフを有しても有さなくてもよく、ギャップヌクレオシドモチーフを有する場合、ウイング長とギャップ長は同じであっても同じでなくてもよい。

20

【0326】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、交互ヌクレオシド間連結部モチーフを有する領域を含む。特定の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドが、一様に修飾されたヌクレオシド間連結部の一領域を含む。特定のような実施形態では、オリゴヌクレオチドが、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部によって一様に連結された領域を含む。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、ホスホロチオエートによって一様に連結されている。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間連結部が、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。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間連結部が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つのヌクレオシド間連結部がホスホロチオエートである。

30

【0327】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、少なくとも6つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが少なくとも8つのホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが少なくとも10個のホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を含む。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが少なくとも6つの連続するホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のブロックを少なくとも1つは含む。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが少なくとも8つの連続するホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のブロックを少なくとも1つは含む。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが少なくとも10個の連続するホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のブロックを少なくとも1つは含む。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが少なくとも12個の連続するホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のブロックを少なくとも1つは含む。特定の実施形態では、少なくとも1つの上述のブロックが、オリゴヌクレオチドの3'端に位置する。

40

50

特定のそのような実施形態では、少なくとも1つの上述のブロックがオリゴヌクレオチドの3'端から3ヌクレオシド以内に位置する。

【0328】

特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、1つ以上のメチルホスホネート連結部を含む。特定の実施形態では、ギャップマーヌクレオシドモチーフを有するオリゴヌクレオチドが、1つまたは2つのメチルホスホネート連結部を除くすべてがホスホロチオエート連結部である連結部モチーフを含む。特定の実施形態では、1つのメチルホスホネート連結部が、ギャップマーヌクレオシドモチーフを有するオリゴヌクレオチドの中央のギャップ中にある。

【0329】

特定の実施形態では、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部とホスホジエステルヌクレオシド間連結部の数を、ヌクレアーゼ耐性が維持されるように定めることが望ましい。特定の実施形態では、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部の数と位置及びホスホジエステルヌクレオシド間連結部の数と位置を、ヌクレアーゼ耐性が維持されるように定めることが望ましい。特定の実施形態では、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部を減少させ、かつホスホジエステルヌクレオシド間連結部の数を増加させることができる。特定の実施形態では、ヌクレアーゼ耐性を維持したまま、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部の数を減少させ、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部を増加させることができる。特定の実施形態では、ヌクレアーゼ耐性を保ったまま、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部の数を減少させることが望ましい。特定の実施形態では、ヌクレアーゼ活性を保ったまま、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部の数を増加させることが望ましい。

【0330】

修飾糖部分

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つ以上含有しうる。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、増加した結合アフィニティ、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うる。特定の実施形態では、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などがあるが、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と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)などがある。

【0331】

修飾糖部分を有するヌクレオシドの例には、5'-ビニル、5'-メチル(RまたはS)、4'-S、2'-F、2'-O₆H₂-OCH₂CH₃、2'-OCH₂CH₂F及び2'-O(CH₂)₂OCH₃置換基を含むヌクレオシドがあるが、これらに限定されない。2'位の置換基は、アリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル、O-C₁-C₁₀アルキル、OCF₃、OCH₂F、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)、及びO-CH₂-C(=O)-N(R₁)-(CH₂)₂-N(R_m)(R_n)から選択することもできる(ここで、各R₁、R_m及びR_nは、独立して、Hまたは置換もしくは無置換C₁-C₁₀アルキルである)。

10

20

30

40

50

【0332】

本明細書にいう「二環式ヌクレオシド」とは、二環式糖部分を含む修飾ヌクレオシドを指す。二環式ヌクレオシドの例には、4'リボシル環原子と2'リボシル環原子の間に橋を含むヌクレオシドなどがあるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、ここに提供するアンチセンス化合物が、4' 2'橋を含む二環式ヌクレオシドを1つ以上含む。そのような4' 2'架橋二環式ヌクレオシドの例として、次式の一つが挙げられるが、これらに限定されない：4' - (CH₂) - O - 2' (LNA)、4' - (CH) - S - 2'、4' - (CH₂)₂ - O - 2' (ENA)、4' - CH(CH) - O - 2' (拘束エチルまたはcEtともいう)及び4' - C - H(CH₂OCH₃) - O - 2' (及びその類似体、2008年6月15日発行の米国特許第7,399,845号参照)、4' - C(CH₃)(CH₃) - O - 2' (及びその類似体、国際出願公開WO2009/006478(公開日2009年1月8日)参照)；4' - CH₂ - N(OCH₃) - 2' (及びその類似体、国際出願公開WO/2008/150729(公開日2008年12月11日)参照)、4' - CH₂ - O - N(CH₃) - 2' (米国特許出願公開US2004-0171570(公開日2004年9月2日)参照)、4' - CH₂ - N(R) - O - 2' (式中、Rは、H、C₁₋₁₂アルキル、または保護基である)(2008年7月23日発行の米国特許7,427,672号参照)、4' - CH₂ - C - (H)(CH₃) - 2' (Zhou et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134参照)、及び4' - CH₂ - C - (=CH₂) - 2' (及びその類似体、国際出願公開WO 2008/154401(公開日2008年12月8日)参照)。

10

20

【0333】

公表された文献には二環式ヌクレオシドに関する他の報告文も見いだすことができる(例えばSingh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26)8362-8379; Elayadi et al., Curr. Opinion Invest. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7; 及びOrum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; 米国特許第6,268,490号; 同第6,525,191号; 同第6,670,461号; 同第6,770,748号; 同第6,794,499号; 同第7,034,133号; 同第7,053,207号; 同第7,399,845号; 同第7,547,684号; 同第8,530,640号; 及び同第7,696,345号; 米国特許出願公開番号US2008-0039618; 同US2009-0012281; 米国特許出願第61/026,995号及び同第61/097,787号; PCT国際出願公開WO2009/067647; 同WO2011/017521; 同WO2010/036698; 同WO1999/014226; 同WO2004/106356; 同WO2005/021570; 同WO2007/134181; 同WO2008/150729; 同WO2008/154401; 及び同WO2009/006478参照。前述の二環式ヌクレオシドのそれぞれは、例えば -L-リボフラノースと -D-リボフラノースなど、1つ以上の立体化学的糖配置を有するものを調製することができる(1999年3月25日にWO99/14226として公開されたPCT国際出願PCT/DK98/00393を参照されたい)。

30

40

【0334】

特定の実施形態では、限定するわけではないが、BNAヌクレオシドの二環式糖部分として、ペントフラノシル糖部分の4'位と2'位の間に少なくとも1つの橋を有する化合物が

50

挙げられ、その橋は、独立して、 $- [C (R_a) (R_b)]_n -$ 、 $- C (R_a) = C (R_b) -$ 、 $- C (R_a) = N -$ 、 $- C (= O) -$ 、 $- C (= N R_a) -$ 、 $- C (= S) -$ 、 $- O -$ 、 $- S i (R_a)_2 -$ 、 $- S (= O)_x -$ 、及び $- N (R_a) -$ から独立して選択される1つの基または2～4つの連結された基を含み、

式中、

xは、0、1、または2であり、

nは、1、2、3、または4であり、

各 R_a 及び R_b は、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($S(=O)-J_1$)であり、かつ

10

各 J_1 及び J_2 は、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。

20

【0335】

特定の実施形態では、二環式糖部分の橋が $- [C (R_a) (R_b)]_n -$ 、 $- [C (R_a) (R_b)]_n - O -$ 、 $- C (R_a R_b) - N (R) - O -$ または $- C (R_a R_b) - O - N (R) -$ である。特定の実施形態では、前記橋が、 $4' - CH_2 - 2'$ 、 $4' - (CH_2)_2 - 2'$ 、 $4' - (CH_2)_3 - 2'$ 、 $4' - CH_2 - O - 2'$ 、 $4' - (CH_2)_2 - O - 2'$ 、 $4' - CH_2 - O - N (R) - 2'$ 及び $4' - CH_2 - N (R) - O - 2'$ であり、式中、各Rは、独立して、H、保護基または $C_1 - C_{12}$ アルキルである。

【0336】

特定の実施形態では、二環式ヌクレオシドが、さらに異性立体配置によって定義される。例えば、 $4' - 2'$ メチレン-オキシ橋を含むヌクレオシドは、 $- L$ 立体配置または $- D$ 立体配置をとりうる。 $- L$ -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)。

30

【0337】

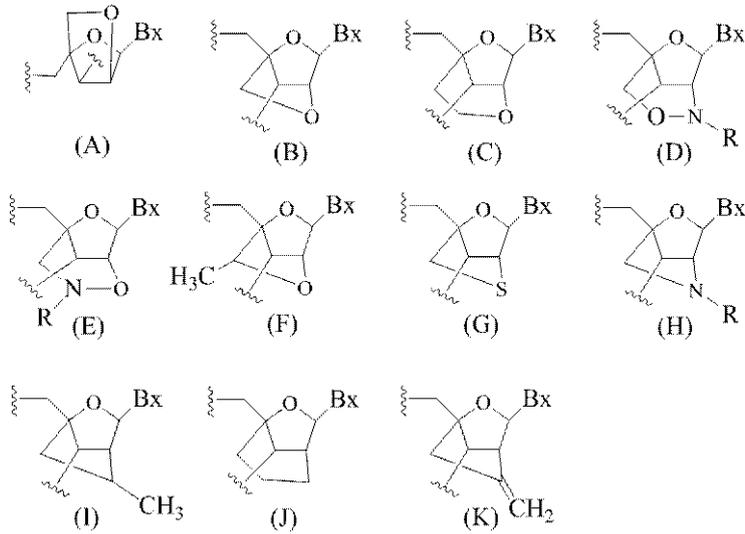
特定の実施形態では、二環式ヌクレオシドとして、以下に図示する(A) $- L$ -メチレンオキシ($4' - CH_2 - O - 2'$)BNA、(B) $- D$ -メチレンオキシ($4' - CH_2 - O - 2'$)BNA、(C)エチレンオキシ($4' - (CH_2)_2 - O - 2'$)BNA、(D)アミノオキシ($4' - CH_2 - O - N (R) - 2'$)BNA、(E)オキシアミノ($4' - CH_2 - N (R) - O - 2'$)BNA、及び(F)メチル(メチレンオキシ)($4' - CH(CH_3) - O - 2'$)BNA、(G)メチレン-チオ($4' - CH_2 - S - 2'$)BNA、(H)メチレン-アミノ($4' - CH_2 - N (R) - 2'$)BNA、(I)メチル炭素環式($4' - CH_2 - CH(CH_3) - 2'$)BNA、(J)プロピレン炭素環式($4' - (CH_2)_3 - 2'$)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：

40

【0338】

50

【化 1 5】



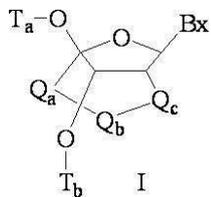
式中、Bxは塩基部分であり、かつRは、独立して、H、保護基、C₁-C₁₂アルキルまたはC₁-C₁₂アルコキシである。

【0339】

特定の実施形態では、式I：

【0340】

【化 1 6】



[式中、

Bxは、複素環式塩基部分であり、

-Q_a-Q_b-Q_c-は、-CH₂-N(R_c)-CH₂-、-C(=O)-N(R_c)-CH₂-、-CH₂-O-N(R_c)-、-CH₂-N(R_c)-O-または-N(R_c)-O-CH₂であり、

R_cは、C₁-C₁₂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による取り付けである]

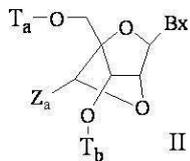
を有する二環式ヌクレオシドが提供される。

【0341】

特定の実施形態では、式II：

【0342】

【化 1 7】



[式中、

Bxは、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による取り付けであり、

10

20

30

40

50

Z_aは、C₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、C₂-C₆アルキニル、置換C₁-C₆アルキル、置換C₂-C₆アルケニル、置換C₂-C₆アルキニル、アシル、置換アシル、置換アミド、チオールまたは置換チオである]
を有する二環式ヌクレオシドが提供される。

【0343】

一実施形態では、前記置換基のそれぞれが、独立して、ハロゲン、オキソ、ヒドロキシル、OJ_c、NJ_cJ_d、SJ_c、N₃、OC(=X)J_c、及びNJ_eC(=X)NJ_cJ_dから独立して選択される置換基で一置換または多置換されており、式中、各J_c、J_d及びJ_eは、独立して、H、C₁-C₆アルキル、または置換C₁-C₆アルキルであり、かつXは、OまたはNJ_cである。

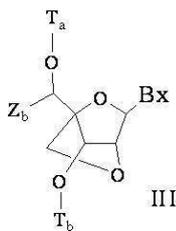
10

【0344】

特定の実施形態では、式III:

【0345】

【化18】



20

[式中、

B_xは、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による取り付けであり、

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]

を有する二環式ヌクレオシドが提供される。

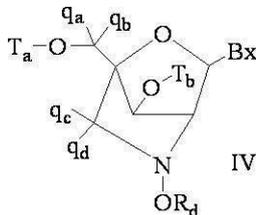
【0346】

30

特定の実施形態では、式IV:

【0347】

【化19】



40

[式中、

B_xは、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による取り付けであり、

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

各q_a、q_b、q_c及びq_dは、独立して、H、ハロゲン、C₁-C₆アルキル、置換C₁-C₆アルキル、C₂-C₆アルケニル、置換C₂-C₆アルケニル、C₂-C₆アルキニルまたは置換C₂-C₆アルキニル、C₁-C₆アルコキシル、置換C₁-C₆アルコキシル、アシル、置換アシル、C₁-C₆アミノアルキルまたは置換C₁-C₆アミノ

50

アルキルである]

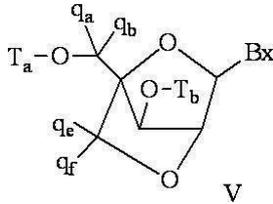
を有する二環式ヌクレオシドが提供される。

【0348】

特定の実施形態では、式V：

【0349】

【化20】



[式中、

Bxは、複素環式塩基部分であり、

Ta及びTb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による取り付けであり、

qa、qb、qe及びqfは、それぞれ独立して、水素、ハロゲン、C₁-C₁₂アルキル、置換C₁-C₁₂アルキル、C₂-C₁₂アルケニル、置換C₂-C₁₂アルケニル、C₂-C₁₂アルキニル、置換C₂-C₁₂アルキニル、C₁-C₁₂アルコキシ、置換C₁-C₁₂アルコキシ、OJ_j、SJ_j、SOJ_j、SO₂J_j、NJ_jJ_k、N₃、CN、C(=O)OJ_j、C(=O)NJ_jJ_k、C(=O)J_j、O-C(=O)-NJ_jJ_k、N(H)C(=NH)NJ_jJ_k、N(H)C(=O)-NJ_jJ_kまたはN(H)C(=S)NJ_jJ_kであるか、または

qe及びqfが全体として=C(qg)(qh)であり、

qg及びqhは、それぞれ独立して、H、ハロゲン、C₁-C₁₂アルキルまたは置換C₁-C₁₂アルキルである]

を有する二環式ヌクレオシドが提供される。

【0350】

メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNAモノマーであるアデニン、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の合成及び調製は、それらのオリゴマー化及び核酸認識特性と共に、既に記述されている(Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630)。BNAとその調製はWO98/39352及びWO99/14226にも記述されている。

【0351】

メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA及び2'-チオ-BNAの類似体も既に調製されている(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のオリゴデオキシリボヌクレオチド二重鎖を構成するロケットヌクレオチド類似体の調製も既に記述されている(Wengel et al., WO99/14226)。さらにまた、コンフォメーションが制限された新規高アフィニティオリゴヌクレオチド類似体である2

'-アミノ-BNAの合成も、当技術分野では既に記述されている(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鎖とのそれらの二重鎖の熱安定性が、以前に報告されている。

【0352】

特定の実施形態では、式VI：

【0353】

10

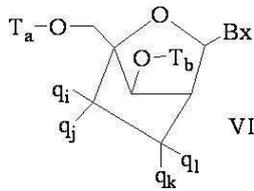
20

30

40

50

【化 2 1】



[式中、

B x は、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による取り付けであり、

各 q i、q j、q k 及び q l は、独立して、H、ハロゲン、C 1 - C 1 2 アルキル、置換
C 1 - C 1 2 アルキル、C 2 - C 1 2 アルケニル、置換 C 2 - C 1 2 アルケニル、C 2 -
C 1 2 アルキニル、置換 C 2 - C 1 2 アルキニル、C 1 - C 1 2 アルコキシル、置換 C 1
- C 1 2 アルコキシル、O J j、S J j、S O J j、S O 2 J j、N J j J k、N 3、C
N、C (= O) O J j、C (= O) N J j J k、C (= O) J j、O - C (= O) - N J
j J k、N (H) C (= N H) N J j J k、N (H) C (= O) - N J j J k または N (H)
C (= S) N J j J k であり、かつ

q i と q j または q l と q k は、全体として、= C (q g) (q h) であり、式中、q g
及び q h は、それぞれ独立して、H、ハロゲン、C 1 - C 1 2 アルキルまたは置換 C 1 -
C 1 2 アルキルである]

を有する二環式ヌクレオシドが提供される。

【 0 3 5 4】

4 ' - (C H 2) 3 - 2 ' 橋を有する炭素環式二環式ヌクレオシド及びアルケニル類似体橋
4 ' - C H = C H - C H 2 - 2 ' は既に記述されている (F r e i e r e t a l . , N u
c l e i c A c i d s R e s e a r c h , 1 9 9 7 , 2 5 (2 2) , 4 4 2 9 - 4 4 4
3 及び A l b a e k e t a l . , J . O r g . C h e m . , 2 0 0 6 , 7 1 , 7 7 3 1
- 7 7 4 0) 。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記述されている (S r i v a s t a v a e t a l . , J . A m .
C h e m . S o c . , 2 0 0 7 , 1 2 9 (2 6) , 8 3 6 2 - 8 3 7 9) 。

【 0 3 5 5】

本明細書にいう「 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橋を含むフラノース環を含み、前記橋が糖環
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。

【 0 3 5 6】

本明細書にいう「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
クレオシドである。特定の実施形態では、ヌクレオシドの糖部分または糖部分類似体が、
どの位置で修飾または置換されていてもよい。

【 0 3 5 7】

本明細書にいう「 2 ' - 修飾糖」とは、 2 ' 位が修飾されたフラノシル糖を意味する。特定
の実施形態では、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、及び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 ' 修飾が、限定するわけではないが、O
[(C H 2) n O] m C H 3、O (C H 2) n N H 2、O (C H 2) n C H 3、O (C H
2) n F、O (C H 2) n O N H 2、O C H 2 C (= O) N (H) C H 3、及び O (C H
2) n O N [(C H 2) n C H 3] 2 などといった置換基 (式中、n 及び m は 1 ~ 約 1 0
である) から選択される。他の 2 ' - 置換基は、C 1 - C 1 2 アルキル、置換アルキル、アル
ケニル、アルキニル、アルカール、アラール、O - アルカールまたは O - アラール
キル、S H、S C H 3、O C N、C l、B r、C N、F、C F 3、O C F 3、S O C H 3

10

20

30

40

50

、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリ-アルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレーター、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。特定の実施形態では、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、無修飾ヌクレオシド及び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、改良された結合アフィニティを有すると記述されている。2'-MOE置換基を有するオリゴヌクレオチドは、インビボ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; 及び Altmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926)。

10

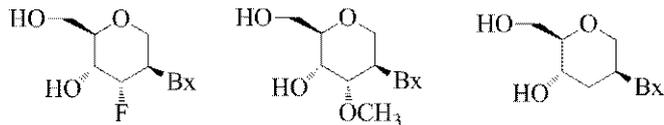
【0358】

本明細書にいう「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」(糖代用物)が使用されているヌクレオシドを意味する。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)またはフルオロHNA(F-HNA)と呼ばれ、以下に図解するようにテトラヒ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。

20

【0359】

【化22】



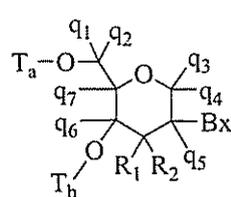
30

【0360】

特定の実施形態では、式VII:

【0361】

【化23】



VII

40

を有する糖代用物が選択され、
 式中、前記少なくとも1つの式VIIのテトラヒドロピランヌクレオシド類似体のそれぞれについて、独立して、
 Bxは、複素環式塩基部分であり、
 Ta及びTbは、それぞれ独立して、テトラヒドロピランヌクレオシド類似体をアンチセンス化合物に連結するヌクレオシド間連結基であるか、またはTa及びTbのうち一方が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、Ta及びTbのうち他方がH、ヒドロキシル保護基、連結された共役基または5'もしくは3'末端基であり、

50

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、かつR₁及びR₂のそれぞれは、水素、ヒドロキシル、ハロゲン、置換または無置換アルコキシ、N_J₁J₂、S_J₁、N₃、OC(=X)_J₁、OC(=X)_N_J₁J₂、N_J₃C(=X)_N_J₁J₂及びCNであり、XはO、SまたはN_J₁であり、かつ各J₁、J₂及びJ₃は、独立して、HまたはC₁-C₆アルキルである。

【0362】

特定の実施形態では、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆及びq₇がそれぞれHである、式VIIの修飾THPヌクレオシドが提供される。特定の実施形態では、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆及びq₇のうち少なくとも1つがH以外である。特定の実施形態では、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆及びq₇のうち少なくとも1つがメチルである。特定の実施形態では、R₁及びR₂のうち的一方がフルオロである、式VIIのTHPヌクレオシドが提供される。特定の実施形態では、R₁がフルオロ、かつR₂がHであり、R₁がメトキシ、かつR₂がHであり、そしてR₁がメトキシエトキシ、かつR₂がHである。

10

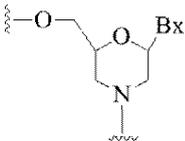
【0363】

特定の実施形態では、糖代用物が、6つ以上の原子及び2つ以上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、報告されている(例えばBraasch et al., Biochemistry, 2002, 41, 4503-4510; 及び米国特許第5,698,685号; 同第5,166,315号; 同第5,185,444号; 及び同第5,034,506号を参照されたい)。本明細書において使用する用語「モルホリノ」とは、以下の式を有する糖代用物を意味する:

20

【0364】

【化24】



30

。特定の実施形態では、例えば上記モルホリノ構造にさまざまな置換基を付加するか、上記モルホリノ構造のさまざまな置換基を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」という。

【0365】

修飾の組み合わせ、例えば限定するわけではないが、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国際出願第WO2008/101157号(公開日2008年8月21日)参照)、及びSによるリボシル環酸素原子の置き換えと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)、あるいは二環式核酸の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4'-CH₂-O-2'二環式ヌクレオシドの5'位が5'-メチル基または5'-ビニル基でさらに置換されている)なども提供される。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試験と共に記載されている(例えば、Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26), 8362-8379を参照のこと)。

40

【0366】

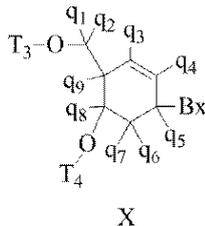
特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、天然に存在するヌクレオシド中のペントフラノシル残基の代わりに六員シクロヘキセニルを有するヌクレオシドである修飾シクロヘキセニルヌクレオシドを1つ以上含む。修飾シクロヘキセニルヌクレオシドとして、当技

50

術分野に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない(例えば同一譲受人によるPCT出願公開WO2010/036696(公開日2010年4月10日)、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. Soc., 2000, 122, 8595-8602; PCT出願公開WO06/047842; 及びPCT出願公開WO01/049687を参照されたい; また、各文献の本文は、参照によりそのまま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。

【0367】

【化25】



X

式中、前記少なくとも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は、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るか、またはT₃及びT₄のうち的一方が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、かつT₃及びT₄のうち他方がH、ヒドロキシル保護基、連結された共役基、または5'末端基もしくは3'末端基であり、かつ

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、置換C₂-C₆アルキニルまたは他の糖置換基である。

【0368】

本明細書にいう「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'-修飾ヌクレオシドには、糖環の2つの炭素原子をつなぐ橋が糖環の2'炭素ともう一つの炭素とをつないでいる二環式ヌクレオシド; 及び非架橋2'置換基、例えばアリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル、O-C₁-C₁₀

アルキル、 $-OCF_3$ 、 $O-(CH_2)_2-O-CH_3$ 、 $2'-O(CH_2)_2SCH_3$ 、 $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$ 、または $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$ [式中、各 R_m 及び R_n は、独立して、Hまたは置換または無置換 C_1-C_{10} アルキルである]を有するヌクレオシドなどがあるが、これらに限定されない。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。

【0369】

本明細書にいう「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。

【0370】

本明細書にいう「2'-OMe」または「2'-OCH₃」または「2'-O-メチル」とは、それぞれ、糖環の2'位に $-OCH_3$ 基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。

【0371】

本明細書にいう「MOE」または「2'-MOE」または「2'-OCH₂CH₂OCH₃」または「2'-O-メトキシエチル」とは、それぞれ、糖環の2'位に $-OCH_2CH_2OCH_3$ 基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。

【0372】

本明細書にいう「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。特定の実施形態では、前記複数のヌクレオシドのうち1つ以上が修飾されている。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドが、1つ以上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。

【0373】

アンチセンス化合物に組み込むためのヌクレオシドの修飾に使用することができるピシク口糖代用環系及びトリシク口糖代用環系は、当技術分野では、他にも多数知られている(例えば総説Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854を参照されたい)。そのような環系には、活性を強化するために、さまざまな追加の置換を行うことができる。

【0374】

修飾糖の調製方法は当業者にはよく知られている。そのような修飾糖の調製を教示する代表的米国特許の一部には、例えば限定するわけではないが、U.S. 4,981,957; U.S. 5,118,800; U.S. 5,319,080; U.S. 5,359,044; U.S. 5,393,878; U.S. 5,446,137; U.S. 5,466,786; U.S. 5,514,785; U.S. 5,519,134; U.S. 5,567,811; U.S. 5,576,427; U.S. 5,591,722; U.S. 5,597,909; U.S. 5,610,300; U.S. 5,627,053; U.S. 5,639,873; U.S. 5,646,265; U.S. 5,670,633; U.S. 5,700,920; U.S. 5,792,847及びU.S. 6,600,032ならびに2005年12月22日にWO2005/121371として公開された国際出願PCT/US-2005/019219(出願日2005年6月2日)などがあり、これらはそれぞれ参照により本明細書にそのまま組み込まれる。

【0375】

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、適当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。

【0376】

特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、修飾糖部分を有する1つ以上のヌクレオシドを含む。特定の実施形態では、修飾糖部分が2'-MOEである。特定の実施形態では、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。特定の実施形態では、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。特定の実施形態では、前記(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。

10

20

30

40

50

【0377】

修飾核酸塩基

核酸塩基（または塩基）の修飾または置換は、天然に存在する無修飾核酸塩基または合成無修飾核酸塩基とは構造上識別できるが、機能的には天然に存在する無修飾核酸塩基または合成無修飾核酸塩基と交換可能である。天然核酸塩基と修飾核酸塩基はどちらも水素結合に参加する能力を有する。そのような核酸塩基修飾は、ヌクレアーゼ安定性、結合アフィニティ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することができる。修飾核酸塩基には、例えば5 - メチルシトシン（5 - me - C）などの合成及び天然核酸塩基が含まれる。5 - メチルシトシン置換などの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アフィニティ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. 及びLebleu, B. 編「Antisense Research and Applications」CRC Press, ボカラトン, 1993, pp. 276 - 278）。

10

【0378】

他の修飾核酸塩基として、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 - メチル誘導体及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2 - プロピル誘導体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（- CoC - CH₃）ウラシル及びシトシンならびにピリミジン塩基の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（シュドウラシル）、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 - ヒドロキシルならびに他の8 - 置換アデニン及びグアニン、5 - ハロ、特に5 - ブロモ、5 - トリフルオロメチルならびに他の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 - デアザアデニンならびに3 - デアザグアニン及び3 - デアザアデニンが挙げられる。

20

【0379】

複素環式塩基部分として、プリン塩基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 - デアザグアノシン、2 - アミノピリジン及び2 - ピリドンで置き換えられているものも挙げることができる。アンチセンス化合物の結合アフィニティを増加させるのにとりわけ有用な核酸塩基として、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジンならびにN - 2、N - 6 及びO - 6 置換プリン、例えば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が挙げられる。

30

【0380】

特定の実施形態では、CFB核酸を標的とするアンチセンス化合物が、1つ以上の修飾核酸塩基を含む。特定の実施形態では、CFB核酸を標的とする短縮型またはギャップ拡幅型アンチセンスオリゴヌクレオチドが1つ以上の修飾核酸塩基を含む。特定の実施形態では、修飾核酸塩基が5 - メチルシトシンである。特定の実施形態では、各シトシンが5 - メチルシトシンである。

40

【0381】

共役アンチセンス化合物

特定の実施形態において、本開示は、共役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、本開示は、核酸転写産物に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む共役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、本開示は、細胞を、核酸転写産物に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む共役アンチセンス化合物と接触させることを含む方法を提供する。特定の実施形態において、本開示は、細胞を、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む共役アンチセンス化合物と接触させること、及び細胞内の核酸転写産物の量または活性を低減させることを含む方法を提供する。

【0382】

50

アジアロ糖タンパク質受容体 (ASGP-R) は以前に記載されている。例えば Park et al., PNAS vol. 102, No. 47, pp. 17125-17129 (2005) を参照されたい。これらの受容体は、肝臓細胞、特に肝細胞上で発現する。さらに、3つのN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) リガンドのクラスターを含む化合物は、ASGP-R に結合して細胞内への当該化合物の取り込みをもたらす能力を有することが示されている。例えば Khorev et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry, 16, 9, pp. 5216-5231 (May 2008) を参照されたい。したがって、そのようなGalNAcクラスターを含む共役体が、肝臓細胞、具体的には肝細胞への特定化合物の取り込みを促進するために使用されている。例えば、特定のGalNAc含有共役体は、インビボで肝臓細胞における二重鎖siRNA化合物の活性を増加させることが示されている。これらの例では、GalNAc含有共役体は、典型的には、siRNA位二重鎖のセンス鎖に取り付けられる。センス鎖はアンチセンス鎖が最終的に標的核酸とハイブリダイズする前に処分されてしまうため、共役体が活性を妨害する懸念はほとんどない。典型的には、共役体は、siRNAのセンス鎖の3'端に取り付けられる。例えば米国特許第8,106,022号を参照されたい。本明細書に記載する特定の共役基は、今までに記載された共役基よりも活性が高く、かつ/または合成が容易である。

【0383】

本発明の特定の実施形態において、共役体は、一本鎖アンチセンス化合物、例えば限定するわけではないが、RNase Hベースのアンチセンス化合物や、プレmRNA標的核酸のスプライシングを改変するアンチセンス化合物に、取り付けられる。そのような実施形態では、共役体は、利益(細胞内への取り込みの改良)をもたらすのに十分な時間、アンチセンス化合物に取り付けられた状態にあるべきだが、その後は、切断されるか、または他の何らかの形で、活性に必要な後続ステップ、例えば標的核酸へのハイブリダイゼーション及びRNase Hまたはスプライシングもしくはスプライシング調節に関連する酵素との相互作用などを妨害しないようにすべきである。この性質のバランスは、共役体を単にセンス鎖に取り付けるだけでよいsiRNA化合物の場合よりも、一本鎖アンチセンス化合物の場合に、より一層重要である。本明細書には、共役体を欠く同じアンチセンス化合物と比較して、インビボで肝臓細胞における力価が改良されている共役一本鎖アンチセンス化合物を開示する。これらの化合物に要求される性質のバランスを考えると、そのような力価の改良は驚くべきことである。

【0384】

特定の実施形態において、本明細書における共役基は、切断可能部分を含む。機序に束縛されることは望まないが、上述のように、共役体を取り込みの強化をもたらすのに十分な時間、化合物上に残っているべきであることは必然だが、その後は、共役体の何らかの部分、理想的には共役体の全部が切断されて、親化合物(例えばアンチセンス化合物)をその最も活性な形態で放出することが望ましい。特定の実施形態では、切断可能部分が切断可能なヌクレオシドである。そのような実施形態では、共役体の残りの部分(クラスター)を、1つ以上の切断可能な結合、例えばホスホジエステル連結部のものによって、ヌクレオシドを介してアンチセンスオリゴヌクレオチドに取り付けることにより、細胞中の内在性ヌクレアーゼを利用する。特定の実施形態では、クラスターがホスホジエステル連結部を介して切断可能なヌクレオシドに結合される。特定の実施形態では、切断可能なヌクレオシドが、ホスホジエステル連結部によってアンチセンスオリゴヌクレオチド(アンチセンス化合物)に取り付けられる。特定の実施形態では、共役基が、2つまたは3つの切断可能なヌクレオシドを含みうる。そのような実施形態では、上述の切断可能なヌクレオシドが、切断可能な結合(ホスホジエステル連結部のもの)によって、互いに、アンチセンス化合物に、かつ/またはクラスターに連結される。本明細書における特定の共役体は、切断可能なヌクレオシドを含まず、代わりに切断可能な結合を含む。オリゴヌクレオチドからの共役体の十分な切離は、細胞内で切断を受けやすい少なくとも1つの結合(切断可能な結合)によってもたらされることを示す。

10

20

30

40

50

【0385】

特定の実施形態では、共役アンチセンス化合物がプロドラッグである。そのようなプロドラッグは、動物に投与され、最終的には、より活性な形態に代謝される。例えば共役アンチセンス化合物は切断されることで、共役体の全部または一部を除去し、共役体の全部または一部を欠く活性な（またはより活性な）形態のアンチセンス化合物をもたらす。

【0386】

特定の実施形態では、共役体がオリゴヌクレオチドの5'端に取り付けられる。特定のそのような5'共役体は、同様の共役基が3'端に取り付けられている対応物よりも効率よく切断される。特定の実施形態では、活性の改良が切断の改良と相関しうる。特定の実施形態では、5'端に共役体を含むオリゴヌクレオチドの有効性が、3'端に共役体を含むオリゴヌクレオチドの有効性よりも高い（例えば実施例56、81、83、及び84を参照のこと）。さらに、5'への取り付けの方が、簡単なオリゴヌクレオチド合成が可能である。オリゴヌクレオチドは、典型的には、3' - 5'方向に固体支持体上で合成される。3'共役オリゴヌクレオチドを作製するには、典型的には、事前に共役基を結合しておいた3'ヌクレオチドを固体支持体に取り付けてから、オリゴヌクレオチドを通常どおりに構築する。しかし、その共役ヌクレオチドを固体支持体に取り付ける操作は、合成を複雑にする。さらに、このアプローチを使用した場合、共役体は、オリゴヌクレオチドの合成の間ずっと存在することになり、後続のステップ中に分解されてしまうか、使用できる反応と試薬の種類を制限することになりうる。5'共役オリゴヌクレオチドについて本明細書に記載する構造及び技法を用いることにより、標準的な自動化された技法を使ってオリゴヌクレオチドを合成し、最後（最も5'側）のヌクレオチドと共に共役体を導入するか、またはオリゴヌクレオチドを固体支持体から切り離してから共役体を導入することができる。

【0387】

当分野の技術水準及び本開示を考慮すれば、当業者は、本明細書の共役体及び共役オリゴヌクレオチドをどれでも容易に作製することができる。さらに、本明細書に開示する特定のそのような共役体及び共役オリゴヌクレオチドの合成は、これまでに開示されていた共役体の合成よりも容易であり、かつ/または必要とするステップ数が少なく、それゆえに安価に行うことができるので、それらは製造上の利点になる。例えば、特定の共役基の合成は、これまでに記載された共役基と比較して、より少ない合成ステップからなり、収率の増加をもたらす。実施例46のGalNAc3-10及び実施例48のGalNAc3-7などの共役基は、既述の共役体、例えば、より多くの化学中間体の組み立てを必要とするU.S. 8,106,022またはU.S. 7,262,177に記載されているものよりも、はるかに簡単である。したがって、本明細書に記載するこれらの共役体及び他の共役体には、一本鎖オリゴヌクレオチドや二本鎖オリゴヌクレオチド（例えばsiRNA）のどちらかの鎖などといった任意のオリゴヌクレオチドと一緒に使用する際に、既述の化合物に優る利点がある。

【0388】

同様に、GalNAcリガンドを1つまたは2つしか持たない共役基も、本明細書に開示する。ここに示すように、そのような共役基は、アンチセンス化合物の活性を改良する。そのような化合物は、3つのGalNAcリガンドを含む共役体よりも、調製がはるかに容易である。1つまたは2つのGalNAcリガンドを含む共役基は、一本鎖オリゴヌクレオチドや二本鎖オリゴヌクレオチド（例えばsiRNA）のどちらかの鎖などといった任意のアンチセンス化合物に取り付けることができる。

【0389】

特定の実施形態では、本明細書の共役体が、耐受性の特定尺度を、実質的に変化させない。例えば、共役アンチセンス化合物の免疫原性は非共役親化合物より高くないことを、本明細書において示す。力価が改良されるので、耐受性が同じままである実施形態は（あるいは実際には力価の増加分と比較して耐受性が少しだけ悪化したとしても）、治療に関して改良された性質を有する。

【0390】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、共役により、共役がなければ結果があまり思わしくないような方法で、アンチセンス化合物を改変することが可能になる。例えば、特定の実施形態では、全ホスホロチオエートアンチセンス化合物の1つ以上のホスホロチオエート連結部を、ホスホジエステル連結基で置き換えることにより、一部の耐容性尺度の改良が起こる。例えば、特定の事例では、1つ以上のホスホジエステルを有するそのようなアンチセンス化合物は、各連結部がホスホロチオエートである同じ化合物よりも、免疫原性が低い。しかし、特定の事例では、実施例26に示すように、1つ以上のホスホロチオエート連結部をホスホジエステル連結部で置き換えると、細胞取り込みの低減及び/または力価の損失も起こる。特定の実施形態において、本明細書に記載する共役アンチセンス化合物は、共役全ホスホロチオエート対応物と比較して、取り込み及び力価をほとんどまたは全く失うことなく、そのような連結部の改変を許容する。事実、特定の実施形態では、例えば実施例44、57、59、及び86では、共役体と少なくとも1つのホスホジエステルヌクレオシド間連結部とを含むオリゴヌクレオチドが、同様に同じ共役体を含む全ホスホロチオエート対応物と比較した場合でさえ、実際に、インピボで力価の増加を呈する。さらに、共役が取り込み/力価の実質的な増加をもたらすので、その実質的な増加分が少し失われても、耐容性の改良を達成するという目的には、許容できる。したがって、特定の実施形態では、共役アンチセンス化合物が、少なくとも1つのホスホジエステル連結部を含む。

10

【0391】

特定の実施形態では、本明細書におけるアンチセンス化合物の共役が、肝細胞における送達、取り込み、及び活性の増加をもたらす。したがって、より多くの化合物が肝臓組織に送達される。しかし、特定の実施形態では、そのような送達の増加だけでは、活性の増加全体を説明できない。特定のそのような実施形態では、より多くの化合物が肝細胞に進入する。特定の実施形態では、そのような肝細胞取り込みの増加でも、活性の増加全体を説明することができない。そのような実施形態では、共役化合物の生産的取り込みが増加する。例えば、実施例102に示すように、GalNAc含有共役体の特定実施形態は、非実質細胞との対比で肝細胞におけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃縮を増加させる。この濃縮は、肝細胞中で発現する遺伝子を標的とするオリゴヌクレオチドにとって有益である。

20

【0392】

特定の実施形態では、本明細書における共役アンチセンス化合物が、腎臓曝露の低減をもたらす。例えば、実施例20に示すように、GalNAc含有共役体の特定実施形態を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は、腎臓では、GalNAc含有共役体を欠くアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度より低い。これは、いくつかの有益な治療的意味を有する。腎臓における活性が求められていない治療的適応の場合、腎臓への曝露には、腎毒性のリスクがあり、それに見合う利益がない。さらに、腎臓における高濃度は、典型的には、尿への化合物の損失をもたらし、その結果、クリアランスが速くなる。したがって、標的が腎臓でない場合、腎臓内での蓄積は望ましくない。

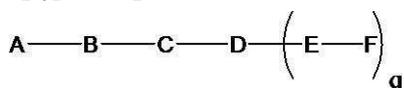
30

【0393】

特定の実施形態において、本開示は、式：

【0394】

【化26】



[式中、

Aは、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

Bは、切断可能部分であり、

Cは、共役リンカーであり、

Dは、分岐基であり、

各Eは、テザーであり、

40

50

各 F は、リガンドであり、かつ
 q は、1 ~ 5 の整数である]
 によって表される共役アンチセンス化合物を提供する。

【 0 3 9 5 】

本明細書における上記の図及び同様の図において、分岐基「D」は、「q」で示される数の (E - F) 基に対応するのに必要な数だけ分岐している。したがって、q = 1 の場合、前記の式は、

【 0 3 9 6 】

【 化 2 7 】

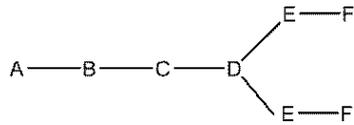


10

であり、q = 2 の場合、前記の式は、

【 0 3 9 7 】

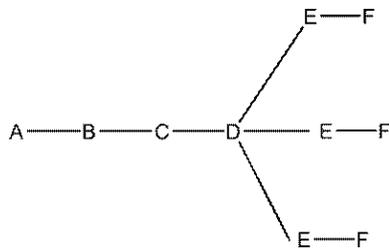
【 化 2 8 】



であり、q = 3 の場合、前記の式は

【 0 3 9 8 】

【 化 2 9 】

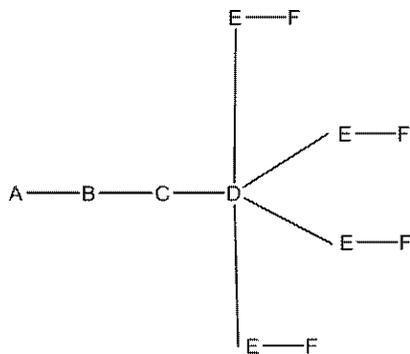


20

であり、q = 4 の場合、前記の式は

【 0 3 9 9 】

【 化 3 0 】



30

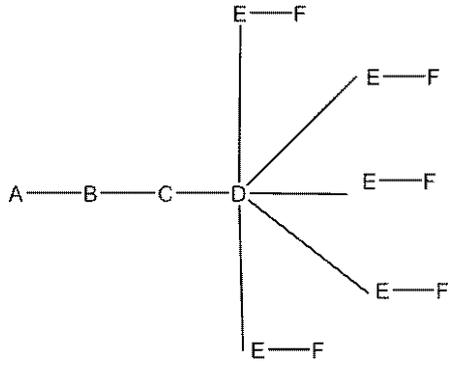
40

であり、q = 5 の場合、前記の式は

【 0 4 0 0 】

50

【化3 1】



10

である。

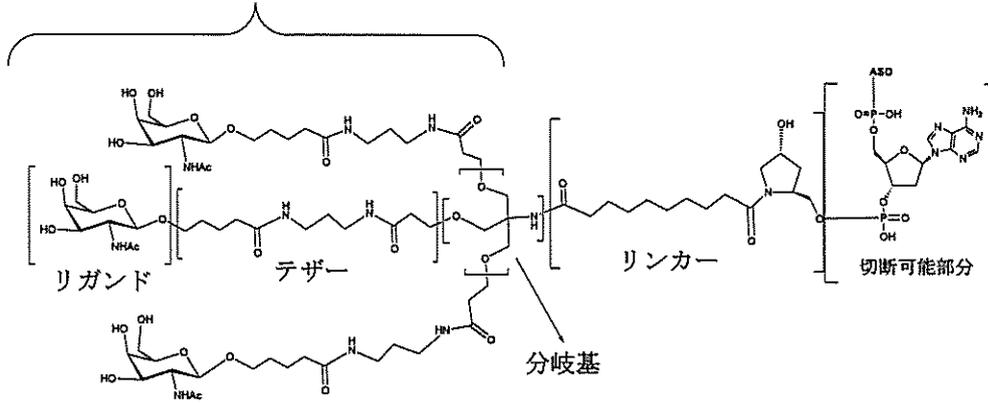
【0401】

特定の実施形態では、次の構造を有する共役アンチセンス化合物が提供される。

【0402】

【化3 2】

ターゲティング部分



20

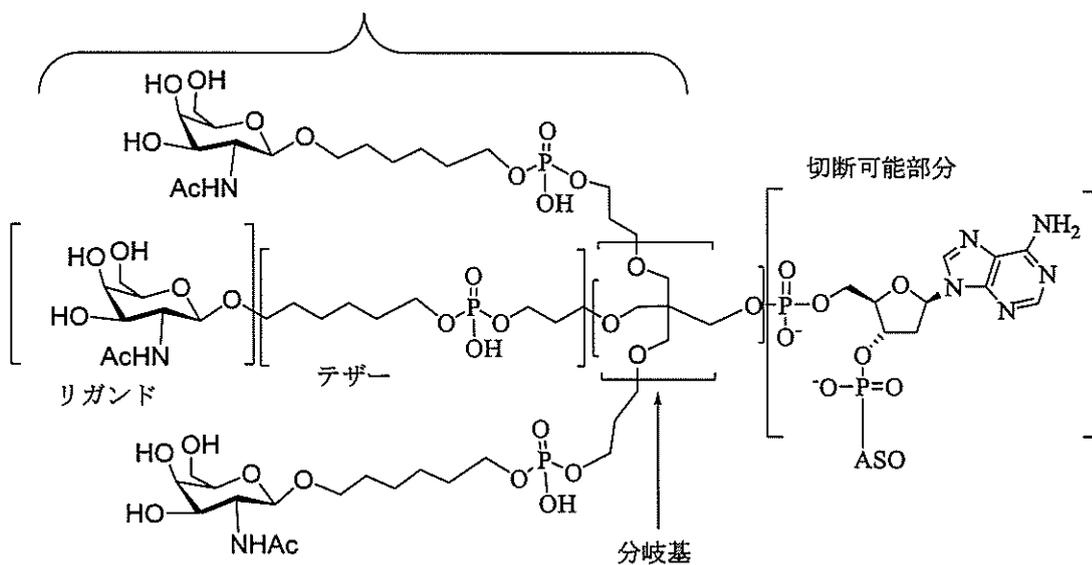
【0403】

特定の実施形態では、次の構造を有する共役アンチセンス化合物が提供される。

【0404】

【化3 3】

細胞ターゲティング部分



40

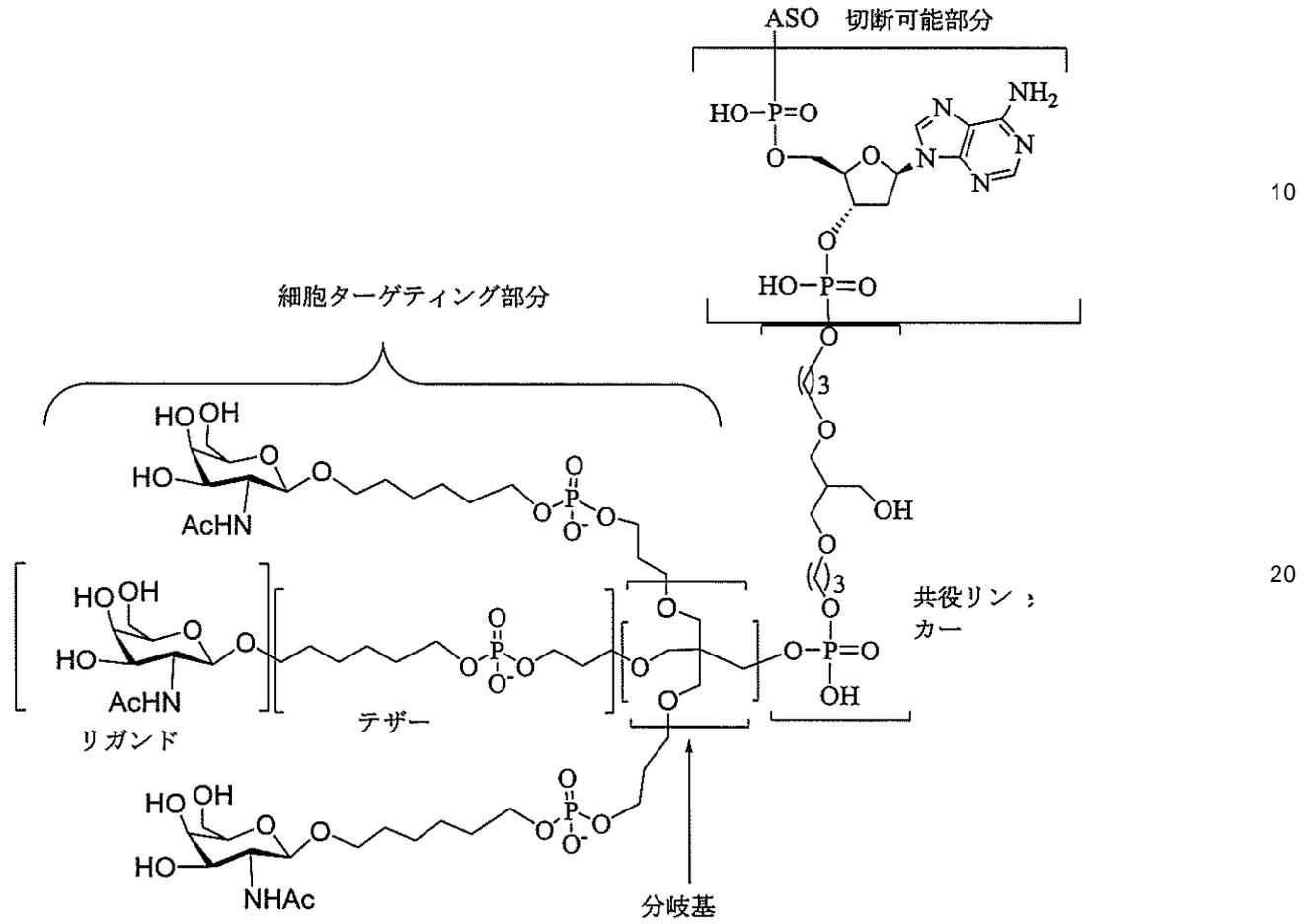
50

【0405】

特定の実施形態では、次の構造を有する共役アンチセンス化合物が提供される。

【0406】

【化34】

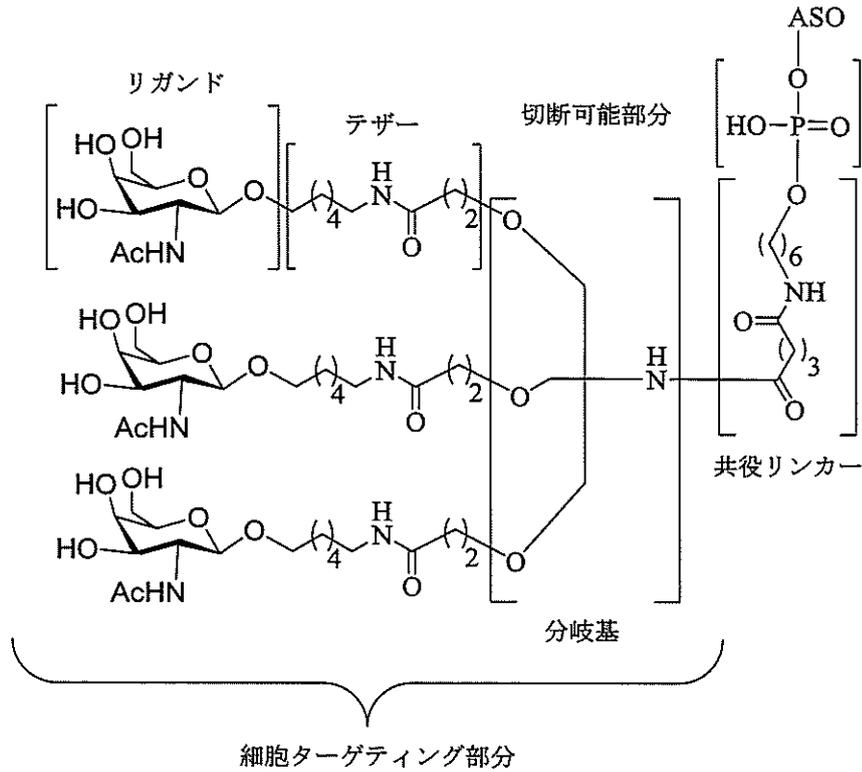


【0407】

特定の実施形態では、次の構造を有する共役アンチセンス化合物が提供される。

【0408】

【化35】



10

20

【0409】

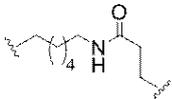
本開示は、非限定的な以下の番号付き実施形態を提供する。

【0410】

実施形態1．テザーが、

【0411】

【化36】

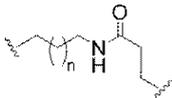


30

または

【0412】

【化37】



40

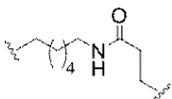
[式中、各nは、独立して、0、1、2、3、4、5、6、または7である]
から選択される構造を有する、実施形態1179～1182のいずれかの共役アンチセンス化合物。

【0413】

実施形態2．テザーが、構造：

【0414】

【化38】



50

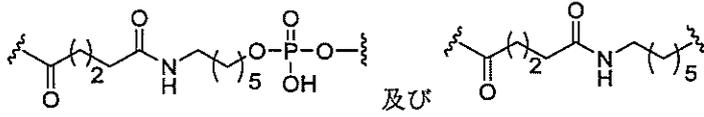
を有する、実施形態 1179 ~ 1182 のいずれかの共役アンチセンス化合物。

【0415】

実施形態 3 . リンカーが

【0416】

【化39】



10

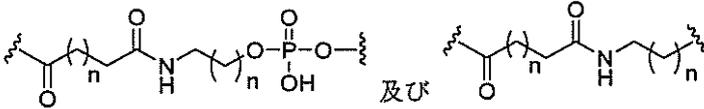
から選択される構造を有する、実施形態 1179 ~ 1182 または 1688 ~ 1689 のいずれかの共役アンチセンス化合物。

【0417】

実施形態 4 . リンカーが

【0418】

【化40】



20

[式中、各 n は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、または 7 である]

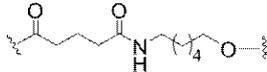
から選択される構造を有する、実施形態 1179 ~ 1182 または 1688 ~ 1689 のいずれかの共役アンチセンス化合物。

【0419】

実施例 5 . リンカーが構造 :

【0420】

【化41】



30

を有する、実施形態 1179 ~ 1182 または 1688 ~ 1689 のいずれかの共役アンチセンス化合物。

【0421】

ある特定変数を 2 つ以上 (例えば 2 つ以上の「m」または 2 つ以上の「n」を) 有する実施形態では、別段の表示がある場合を除き、そのような特定変数のそれぞれは、独立して選択される。したがって、2 つ以上の n を有する構造の場合、各 n は独立して選択されるため、それらは互いに同一である場合も、同一でない場合もありうる。

【0422】

i . 特定の切断可能部分

特定の実施形態において、切断可能部分は、切断可能な結合である。特定の実施形態において、切断可能部分は、切断可能な結合を含む。特定の実施形態において、共役基は、切断可能部分を含む。特定のそのような実施形態において、切断可能部分は、アンチセンスオリゴヌクレオチドに結合する。特定のそのような実施形態において、切断可能部分は、細胞ターゲティング部分に直接結合する。特定のそのような実施形態において、切断可能部分は、共役リンカーに結合する。特定の実施形態において、切断可能部分は、ホスフェートまたはホスホジエステルを含む。特定の実施形態において、切断可能部分は、切断可能なヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体である。特定の実施形態において、ヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体は、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場合によっては保護された複素環式塩基を含む。特定の実施形態において、切断可能部分は、ウラシル、チミン、シトシン、4-N-ベンゾイルシトシン、5

40

50

- 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 - イソブチリルグアニンから選択される、場合によっては保護された複素環式塩基を含むヌクレオシドである。特定の実施形態では、切断可能部分が、ホスホジエステル連結部によってアンチセンスオリゴヌクレオチドの3'位に取り付けられ、かつホスホジエステルまたはホスホロチオエート連結部によってリンカーに取り付けられた2'-デオキシヌクレオシドである。特定の実施形態では、切断可能部分が、ホスホジエステル連結部によってアンチセンスオリゴヌクレオチドの3'位に取り付けられ、かつホスホジエステルまたはホスホロチオエート連結部によってリンカーに取り付けられた2'-デオキシアデノシンである。特定の実施形態では、切断可能部分が、ホスホジエステル連結部によってアンチセンスオリゴヌクレオチドの3'位に取り付けられ、かつホスホジエステル連結部によってリンカーに取り付けられた2'-デオキシアデノシンである。

10

【0423】

特定の実施形態において、切断可能部分は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの3'位に取り付けられる。特定の実施形態において、切断可能部分は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'位に取り付けられる。特定の実施形態において、切断可能部分は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの2'位に取り付けられる。特定の実施形態において、切断可能部分は、ホスホジエステル連結部によってアンチセンスオリゴヌクレオチドに取り付けられる。特定の実施形態において、切断可能部分は、ホスホジエステル連結部またはホスホロチオエート連結部のいずれかによってリンカーに取り付けられる。特定の実施形態において、切断可能部分は、ホスホジエステル連結部によってリンカーに取り付けられる。特定の実施形態において、共役基は、切断可能部分を含まない。

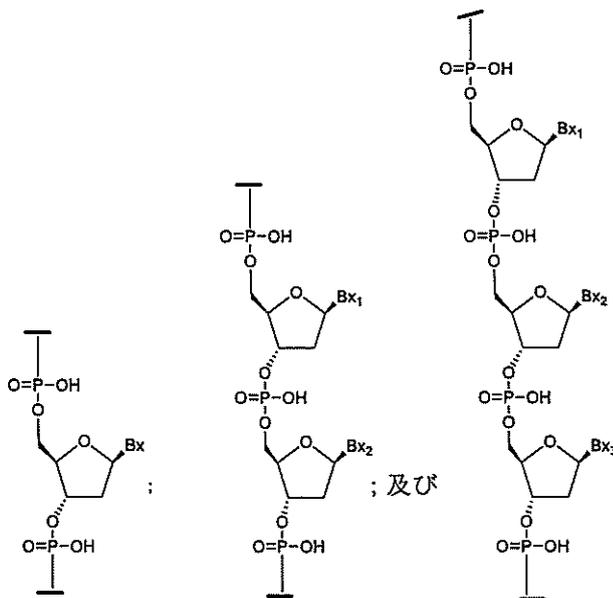
20

【0424】

特定の実施形態において、切断可能部分は、複合体が動物に投与された後に、標的細胞によって内部に取り込まれて初めて切断される。細胞内で切断可能部分が切断され、それによって活性アンチセンスオリゴヌクレオチドが放出される。理論に束縛されることは望まないが、切断可能部分は細胞内で1つ以上のヌクレアーゼによって切断されると考えられる。特定の実施形態では、1つ以上のヌクレアーゼが切断可能部分とリンカーとの間のホスホジエステル連結部を切断する。特定の実施形態において、切断可能部分は、以下

【0425】

【化42】



40

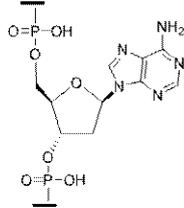
のなかから選択される構造を有し、

50

式中、 $B \times$ 、 $B \times 1$ 、 $B \times 2$ 、及び $B \times 3$ のそれぞれは、独立して複素環式塩基部分である。特定の実施形態において、切断可能部分は以下のなかから選択される構造を有する。

【0426】

【化43】



【0427】

ii. 特定のリンカー

特定の実施形態において、共役基は、リンカーを含む。特定のそのような実施形態において、リンカーは、切断可能部分に共有結合される。特定のそのような実施形態において、リンカーは、アンチセンスオリゴヌクレオチドに共有結合される。特定の実施形態において、リンカーは、細胞ターゲティング部分に共有結合される。特定の実施形態において、リンカーは、固体支持体への共有結合をさらに含む。特定の実施形態において、リンカーは、タンパク質結合部分への共有結合をさらに含む。特定の実施形態において、リンカーは、固体支持体への共有結合をさらに含み、タンパク質結合部分への共有結合もさらに含む。特定の実施形態において、リンカーは、係留される (tethered) リガンドを取り付けるための位置を複数含んでいる。特定の実施形態において、リンカーは、係留されるリガンドを取り付けるための位置を複数含み、分岐基には取り付けられない。特定の実施形態において、リンカーは、1つ以上の切断可能な結合をさらに含む。特定の実施形態において、共役基は、リンカーを含まない。

【0428】

特定の実施形態において、リンカーは、アルキル、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) -) 基から選択される基を含む線状基を少なくとも1つは含む。特定の実施形態において、前記線状基は、アルキル、アミド、及びエーテル基から選択される基を含む。特定の実施形態において、前記線状基は、アルキル及びエーテル基から選択される基を含む。特定の実施形態において、前記線状基は、少なくとも1つのリン連結基を含む。特定の実施形態において、前記線状基は、少なくとも1つのホスホジエステル基を含む。特定の実施形態において、前記線状基は、少なくとも1つの中性連結基を含む。特定の実施形態において、前記線状基は、細胞ターゲティング部分及び切断可能部分に共有結合される。特定の実施形態において、前記線状基は、細胞ターゲティング部分及びアンチセンスオリゴヌクレオチドに共有結合される。特定の実施形態において、前記線状基は、細胞ターゲティング部分、切断可能部分、及び固体支持体に共有結合される。特定の実施形態において、前記線状基は、細胞ターゲティング部分、切断可能部分、固体支持体、及びタンパク質結合部分に共有結合される。特定の実施形態において、前記線状基は、1つ以上の切断可能な結合を含む。

【0429】

特定の実施形態において、リンカーは、足場基に共有結合された線状基を含む。特定の実施形態において、前記足場は、アルキル、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状脂肪族基を含む。特定の実施形態において、前記足場は、アルキル、アミド、及びエーテル基から選択される基を含む分岐状脂肪族基を含む。特定の実施形態において、前記足場は、少なくとも1つの単環式または多環式環系を含む。特定の実施形態において、前記足場は、少なくとも2つの単環式または多環式環系を含む。特定の実施形態では、線状基が足場基に共有結合され、足場基は切断可能部分及びリンカーに共有結合される。特定の実施形態では、線状基が足場基に共有結合され、足場基は、切断可能部分、リンカー、及び

10

20

30

40

50

固体支持体に共有結合される。特定の実施形態では、線状基が足場基に共有結合され、足場基は、切断可能部分、リンカー、及びタンパク質結合部分に共有結合される。特定の実施形態では、線状基が足場基に共有結合され、足場基は、切断可能部分、リンカー、タンパク質結合部分、及び固体支持体に共有結合される。特定の実施形態において、前記足場基は1つ以上の切断可能な結合を含む。

【0430】

特定の実施形態において、リンカーは、タンパク質結合部分を含む。特定の実施形態において、タンパク質結合部分は脂質、例えば限定するわけではないが、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O(ヘキサデシル)グリセロール、グラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-(オレオイル)リトコール酸、O3-(オレオイル)コレン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン)、ビタミン(例えば葉酸塩、ビタミンA、ビタミンE、ピオチン、ピリドキサル)、ペプチド、炭水化物(例えば単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、多糖)、エンドソーム溶解成分、ステロイド(例えばウバオール、ヘシゲニン、ジオスゲニン)、テルペン(例えばトリテルペン、例えば、サルササポゲニン、フリーデリン、エピフリーデラノール誘導体化リトコール酸)、またはカチオン性脂質を含むが、これらに限定されない。特定の実施形態において、タンパク質結合部分は、C16~C22長鎖飽和もしくは不飽和脂肪酸、コレステロール、コール酸、ビタミンE、アダマンタン、または1-ペンタフルオロプロピルである。

10

20

【0431】

特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

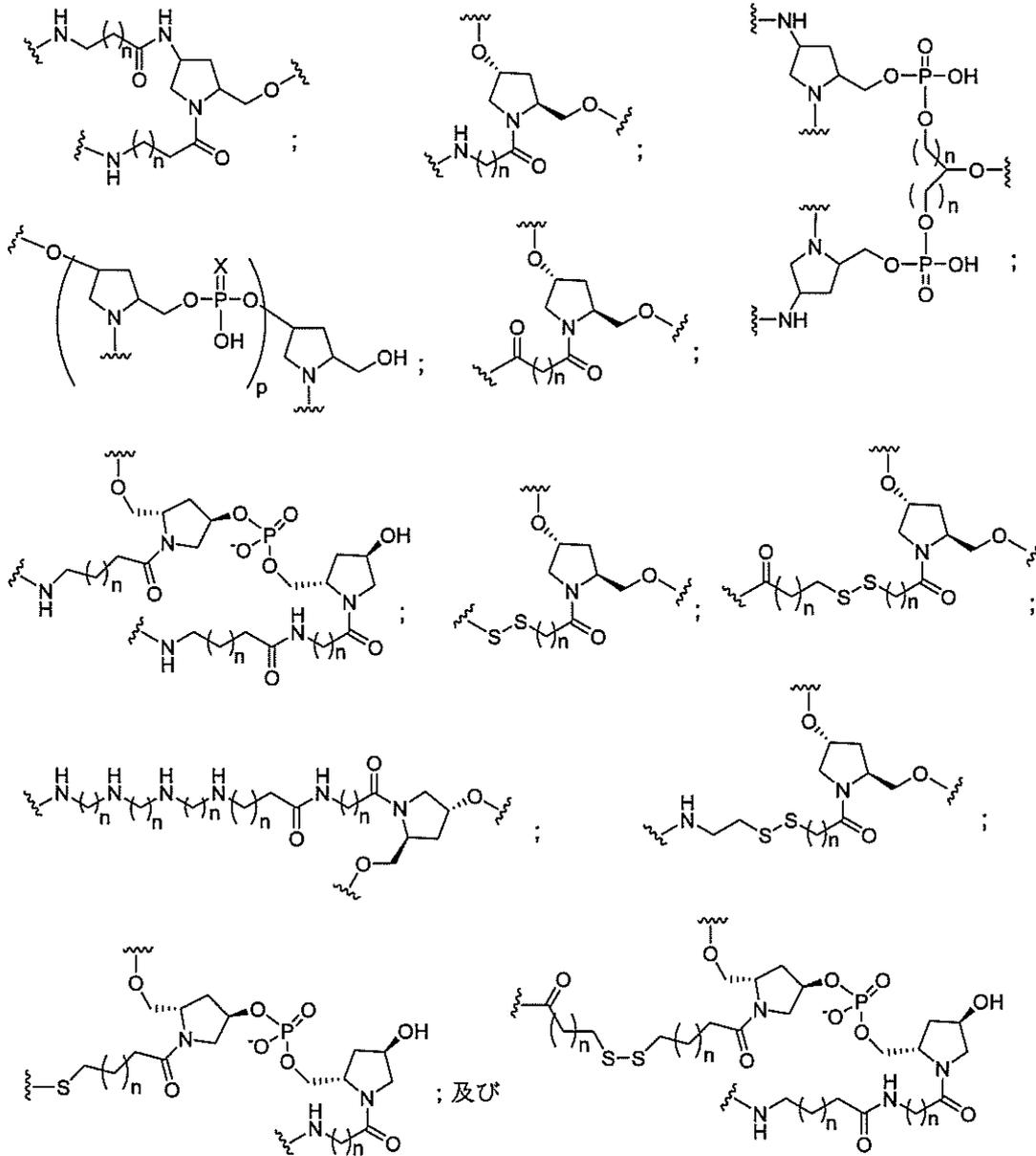
【0432】

30

40

50

【化 4 4】



10

20

30

式中、各 n は、独立して、1 ~ 20 であり、 p は、1 ~ 6 である。

【0 4 3 3】

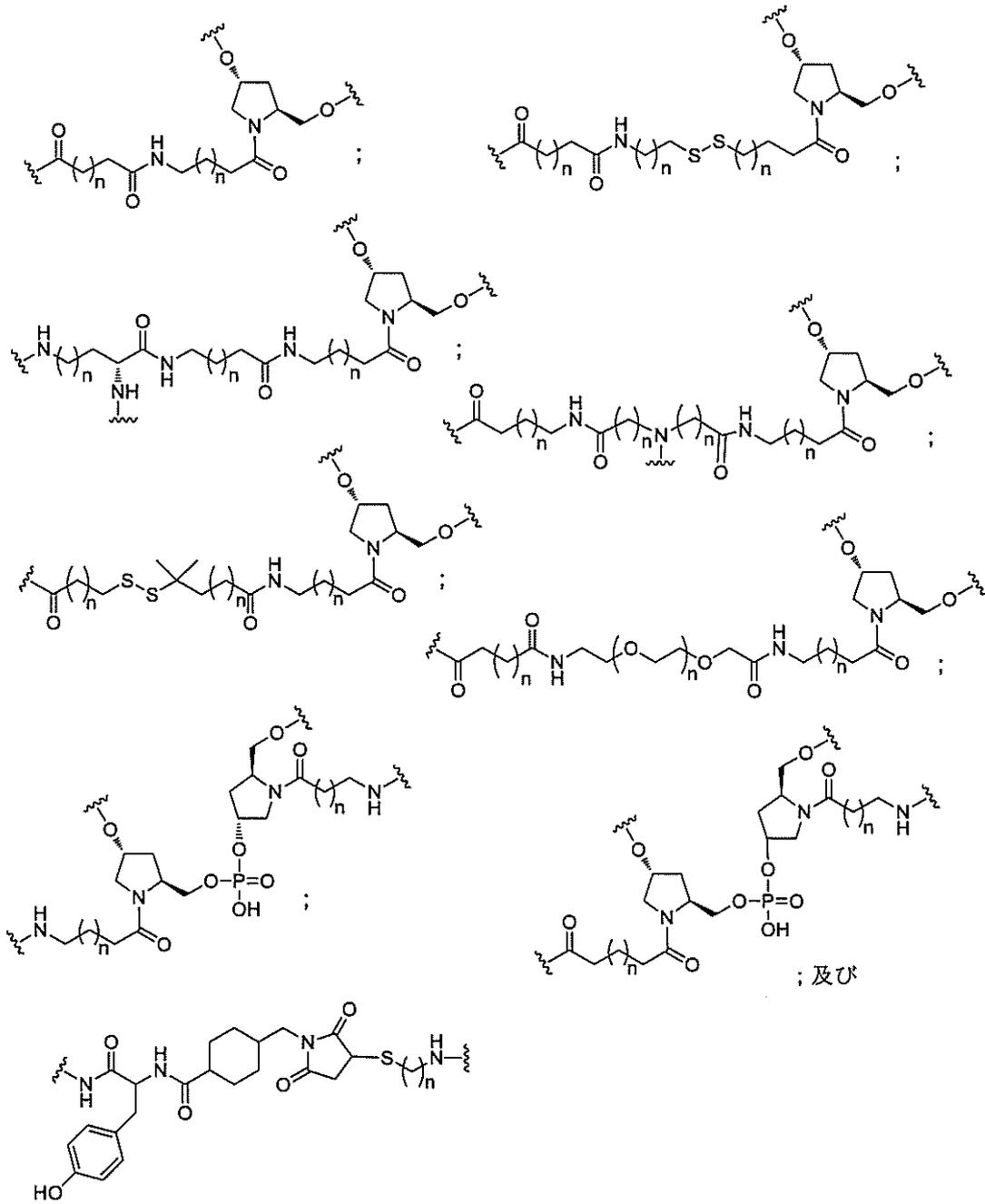
特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0 4 3 4】

40

50

【化 4 5】



10

20

30

式中、各nは、独立して、1～20である。

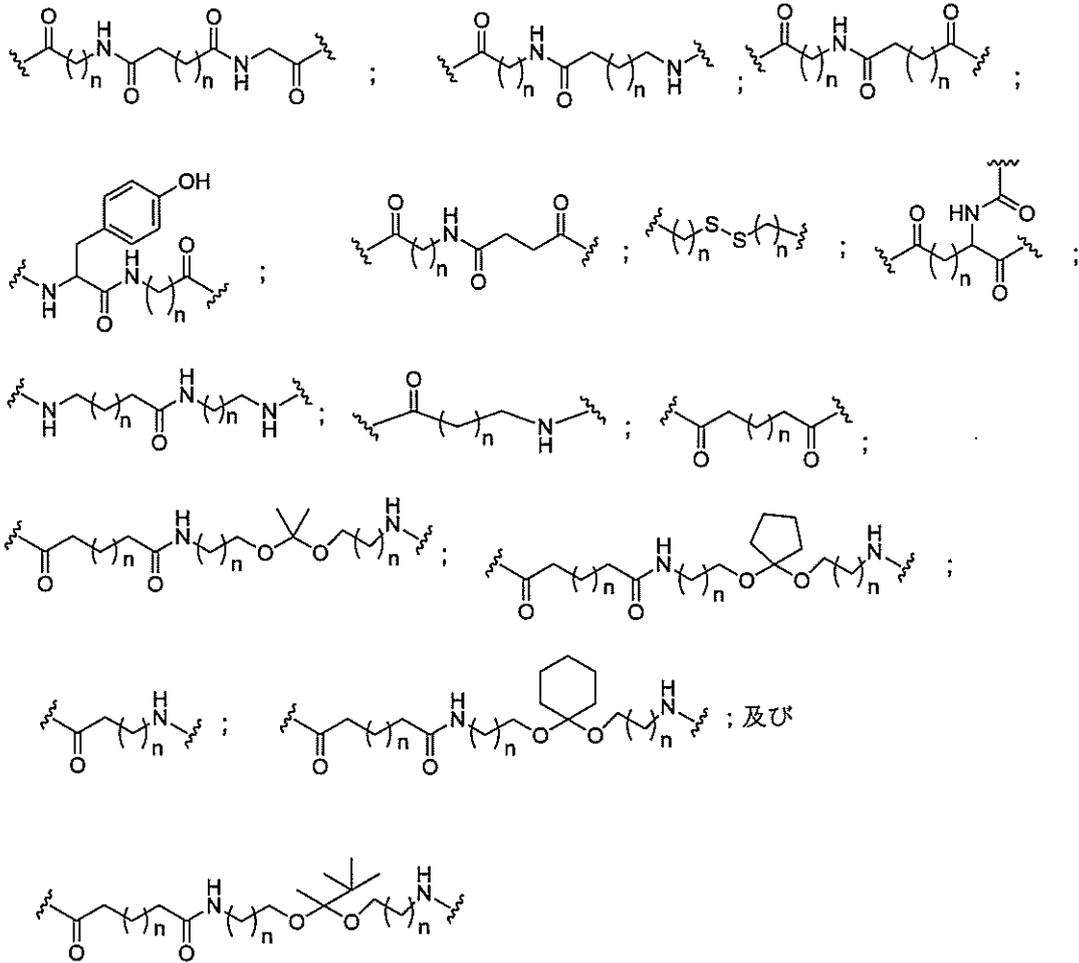
【0435】

特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0436】

40

【化 4 6】



10

20

式中、 n は、1～20である。

【0437】

特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

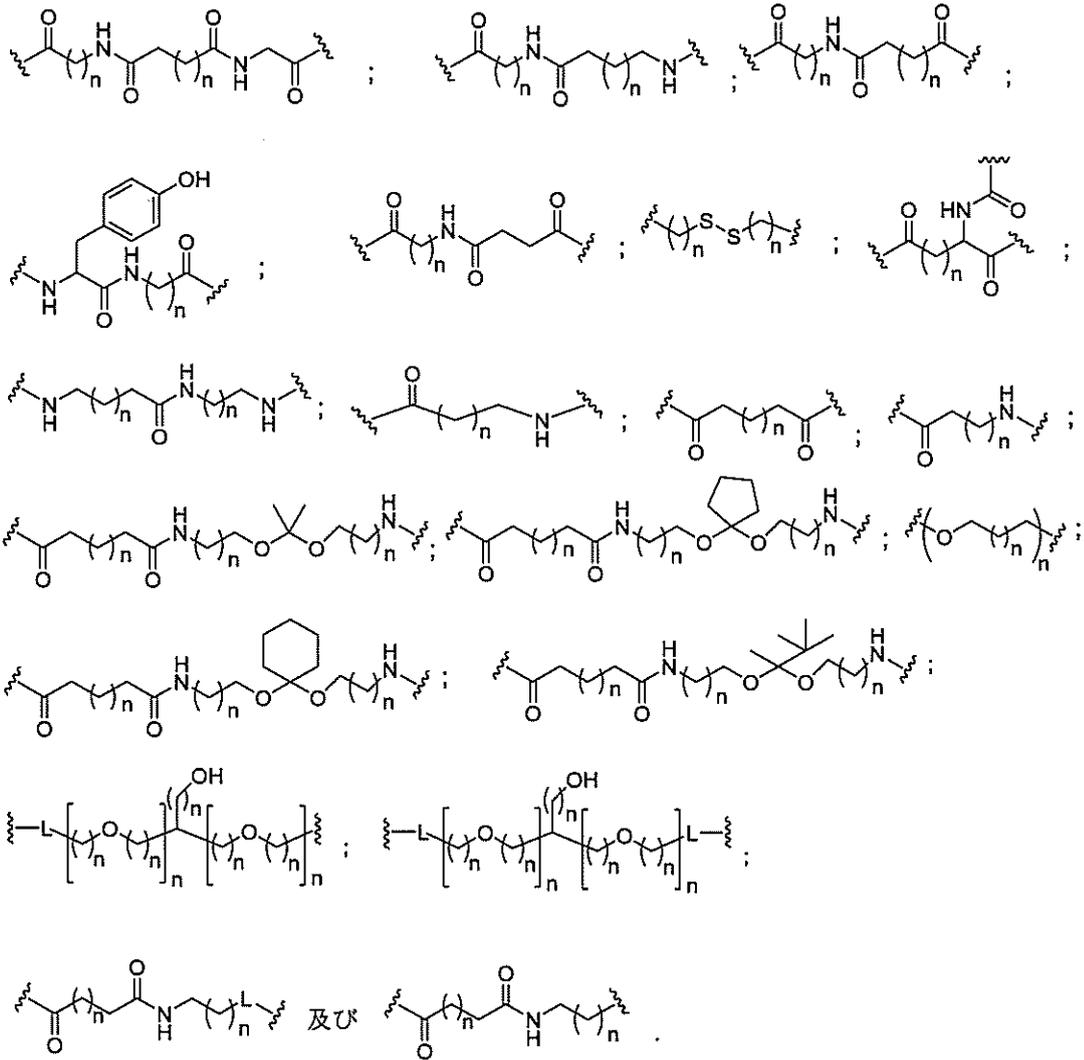
【0438】

30

40

50

【化 4 7】



10

20

30

式中、各Lは、独立して、リン連結基または中性連結基であり、各nは、独立して、1～20である。

【0439】

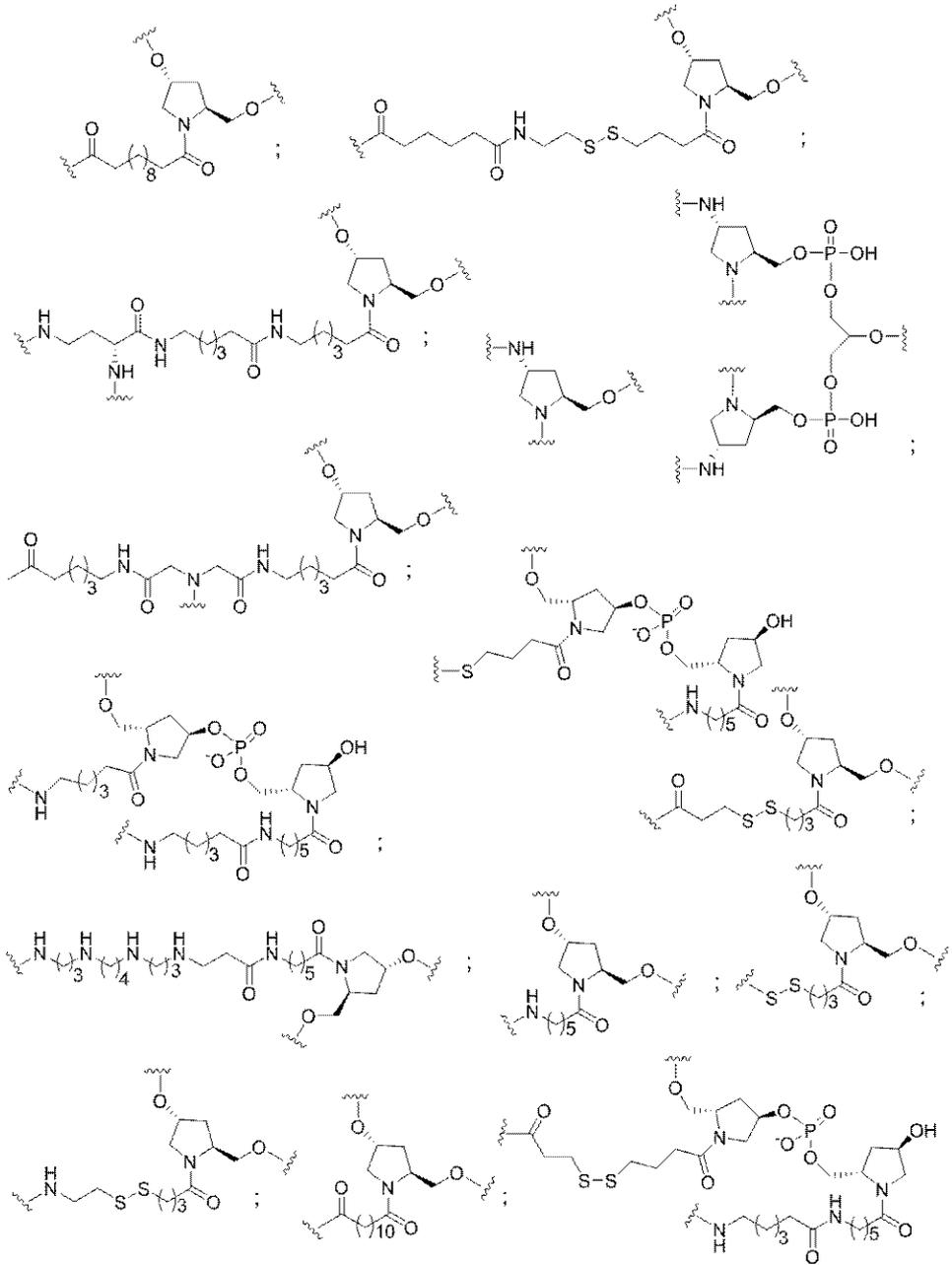
特定の実施形態において、リンカーは以下のなかから選択される構造を有する。

【0440】

40

50

【化48】



【0441】

10

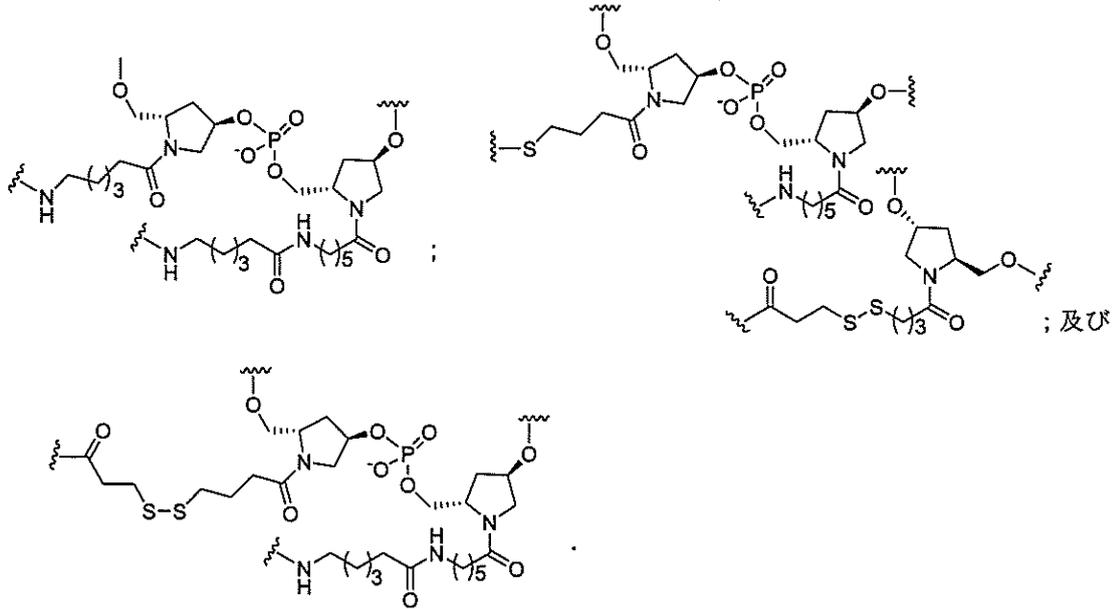
20

30

40

50

【化49】



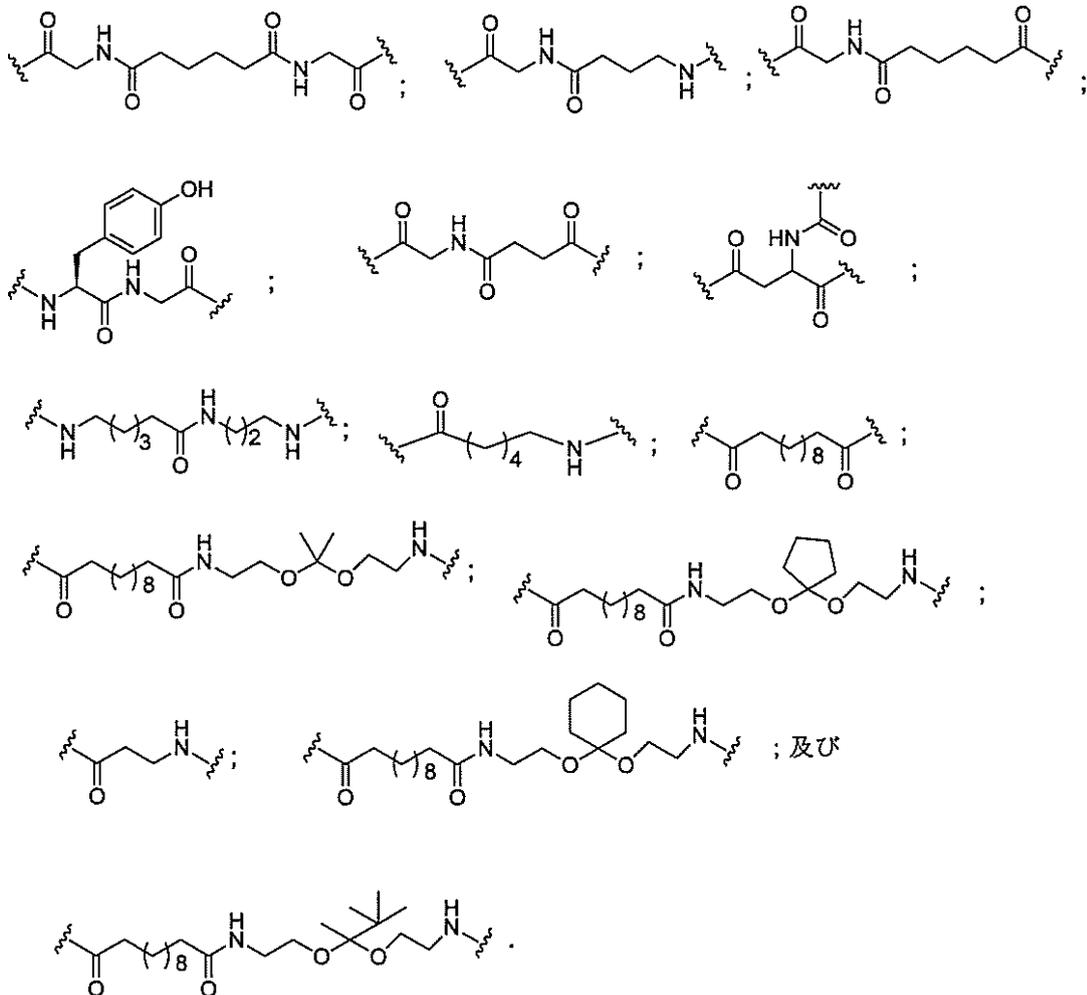
【0442】

特定の実施形態において、リンカーは以下のなかから選択される構造を有する。

20

【0443】

【化50】

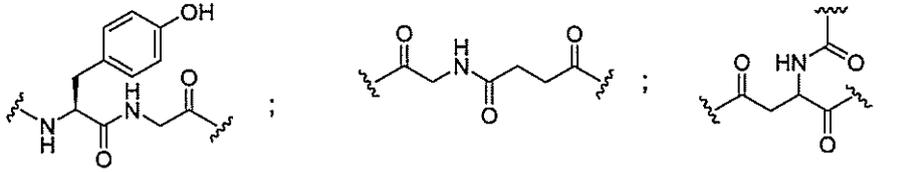
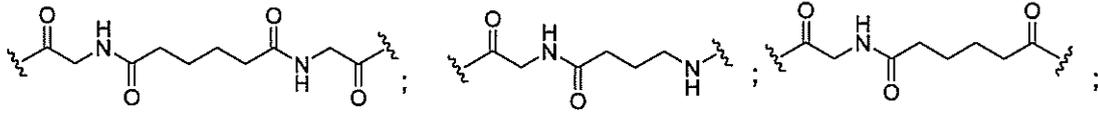


【0444】

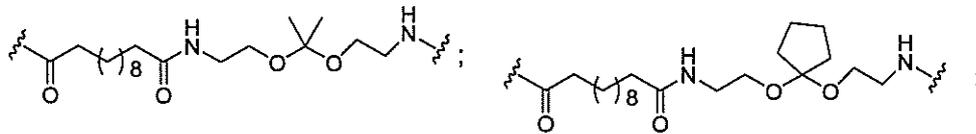
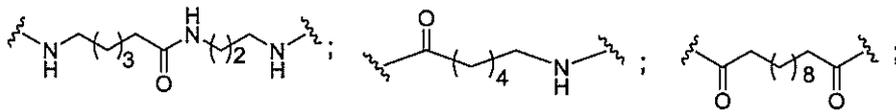
特定の実施形態において、リンカーは以下のなかから選択される構造を有する。

【0445】

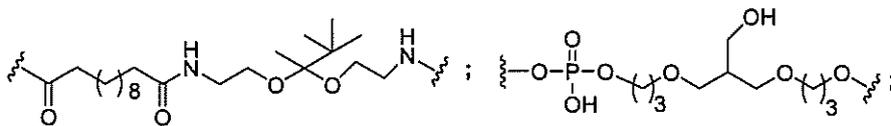
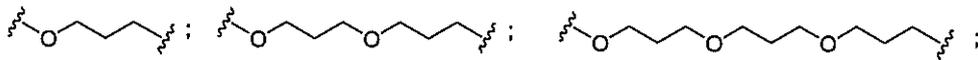
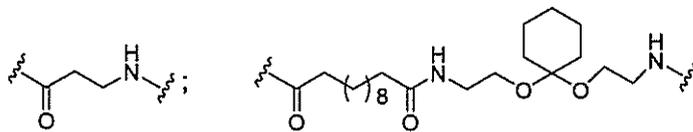
【化51】



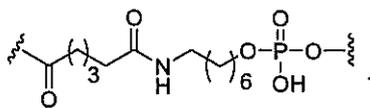
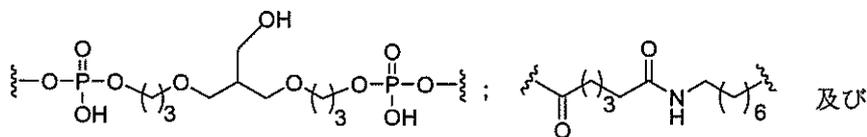
10



20



30



40

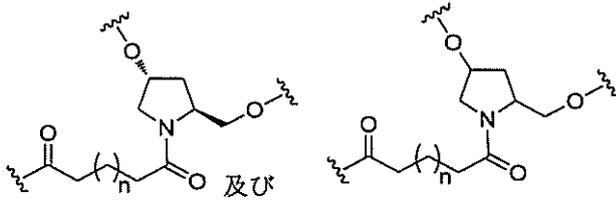
【0446】

特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0447】

50

【化52】



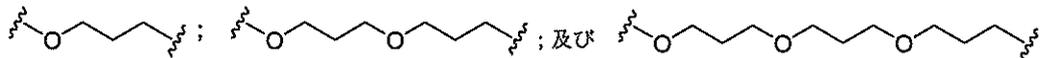
式中、nは、1～20である。

【0448】

特定の実施形態において、リンカーは以下のなかから選択される構造を有する。

【0449】

【化53】

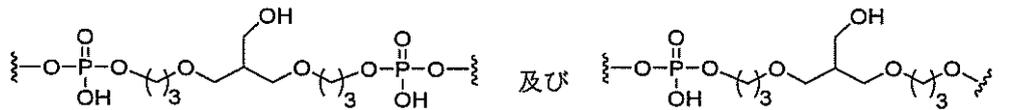


【0450】

特定の実施形態において、リンカーは以下のなかから選択される構造を有する。

【0451】

【化54】

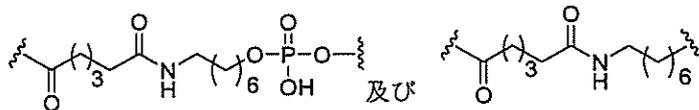


【0452】

特定の実施形態において、リンカーは以下のなかから選択される構造を有する。

【0453】

【化55】

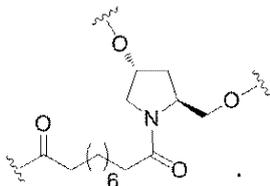


【0454】

特定の実施形態において、共役リンカーは以下の構造を有する。

【0455】

【化56】

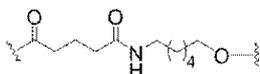


【0456】

特定の実施形態において、共役リンカーは以下の構造を有する。

【0457】

【化57】



【0458】

10

20

30

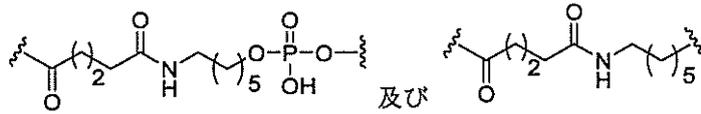
40

50

特定の実施形態において、リンカーは以下のなかから選択される構造を有する。

【0459】

【化58】

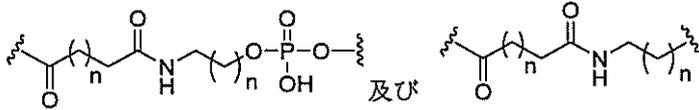


【0460】

特定の実施形態において、リンカーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0461】

【化59】



式中、各 n は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、または7である。

【0462】

i i i . 特定の細胞ターゲティング部分

特定の実施形態において、共役基は、細胞ターゲティング部分を含む。特定のそのような細胞ターゲティング部分は、アンチセンス化合物の細胞取り込みを増加させる。特定の実施形態において、細胞ターゲティング部分は、分岐基、1つ以上のテザー、及び1つ以上のリガンドを含む。特定の実施形態において、細胞ターゲティング部分は、分岐基、1つ以上のテザー、1つ以上のリガンド、及び1つ以上の切断可能な結合を含む。

1 . 特定の分岐基

【0463】

特定の実施形態において、共役基は、分岐基及び少なくとも2つのテザーリガンドを含むターゲティング部分を含む。特定の実施形態において、分岐基は、共役リンカーを結合する。特定の実施形態において、分岐基は、切断可能部分を結合する。特定の実施形態において、分岐基は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを結合する。特定の実施形態において、分岐基は、リンカー及びテザーリガンドのそれぞれに共有結合される。特定の実施形態において、分岐基は、アルキル、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状脂肪族基を含む。特定の実施形態において、分岐基は、アルキル、アミド、及びエーテル基から選択される基を含む。特定の実施形態において、分岐基は、アルキル及びエーテル基から選択される基を含む。特定の実施形態において、分岐基は、単環式または多環式環系を含む。特定の実施形態において、分岐基は、1つ以上の切断可能な結合を含む。特定の実施形態において、共役基は、分岐基を含まない。

【0464】

特定の実施形態において、分岐基は、以下のなかから選択される構造を有し、

【0465】

10

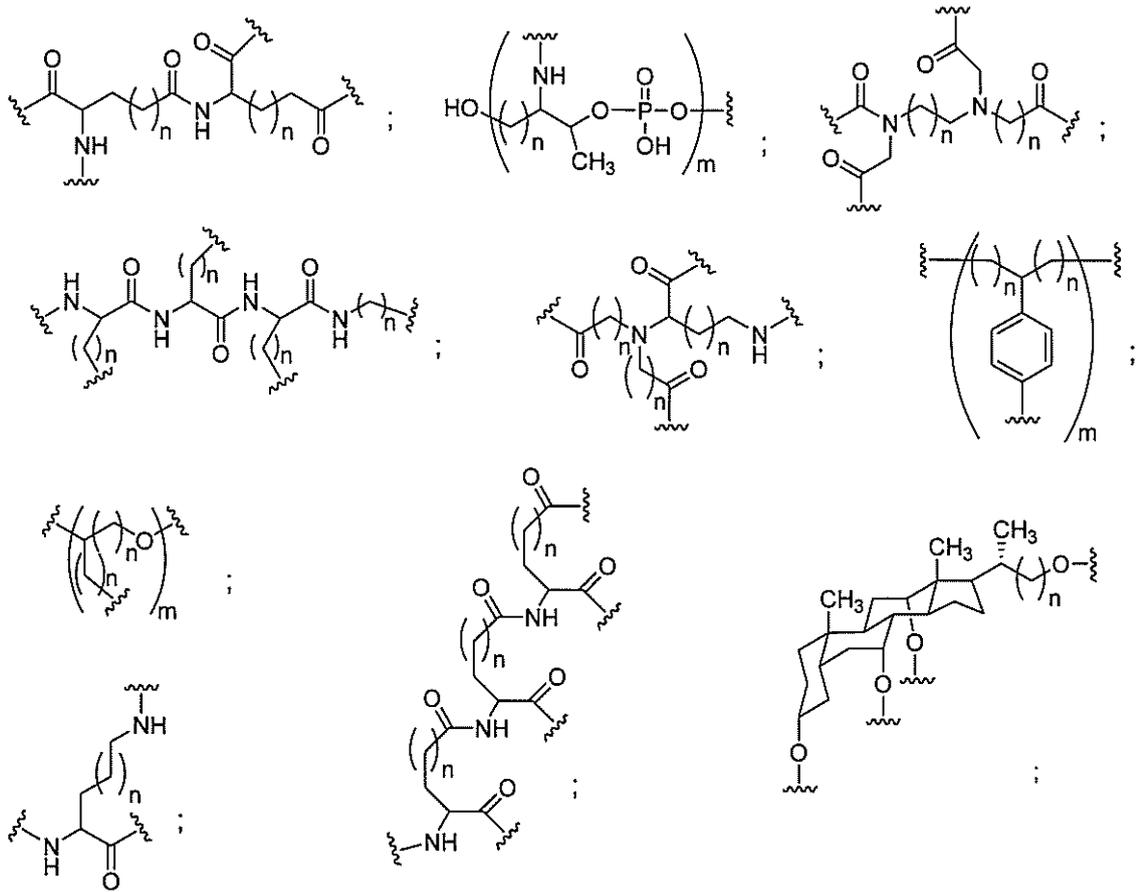
20

30

40

50

【化60】

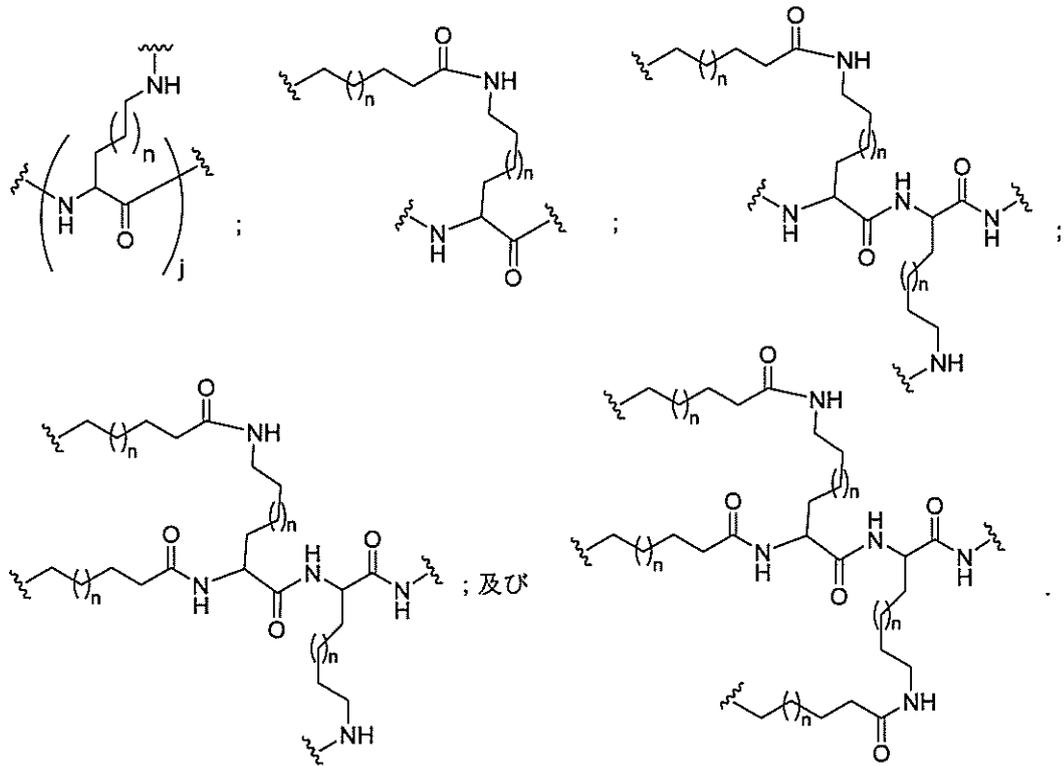


10

20

【0466】

【化61】



30

40

式中、各nは、独立して、1~20であり、

50

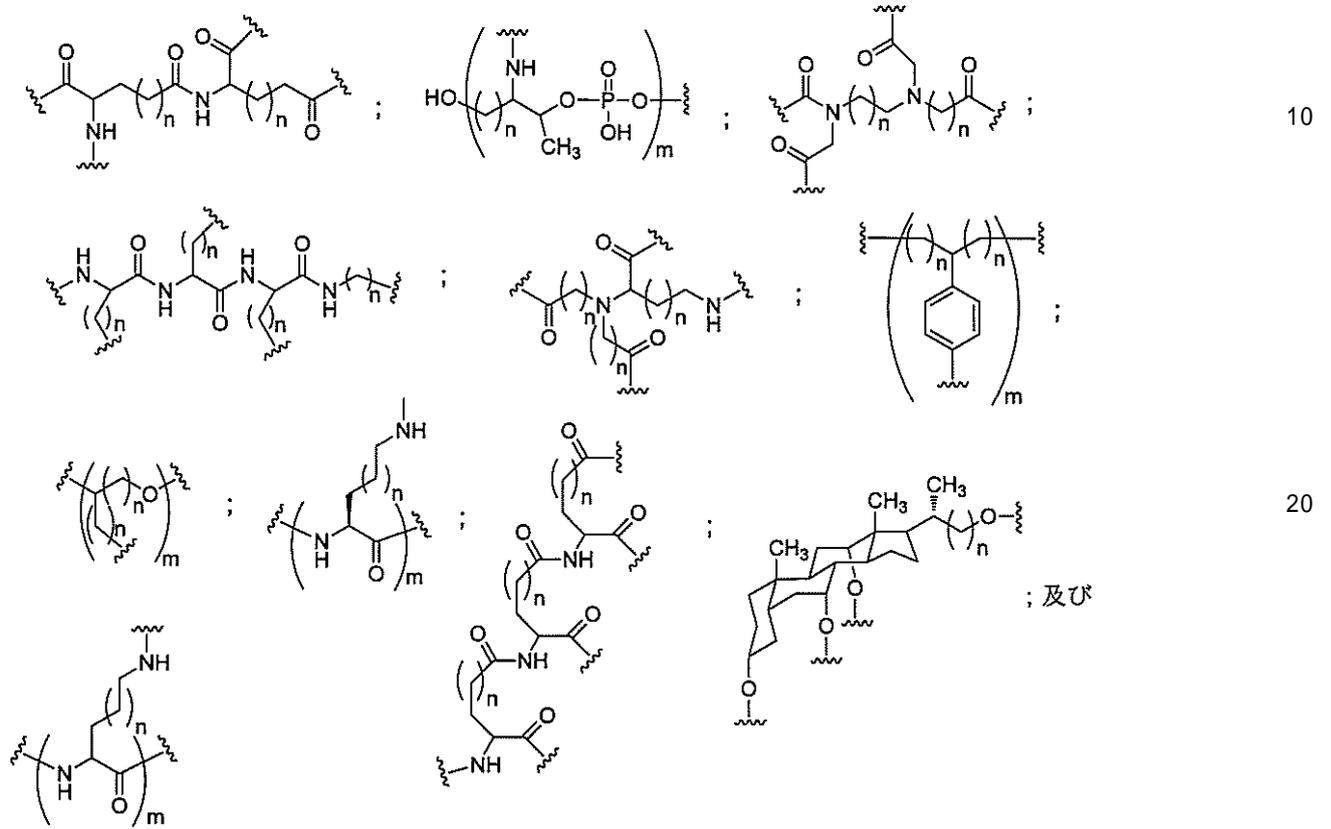
j は、 1 ~ 3 であり、
m は、 2 ~ 6 である。

【 0 4 6 7 】

特定の実施形態において、分岐基は、以下のなかから選択される構造を有し、

【 0 4 6 8 】

【 化 6 2 】



各 n は、独立して、 1 ~ 2 0 であり、
m は、 2 ~ 6 である。

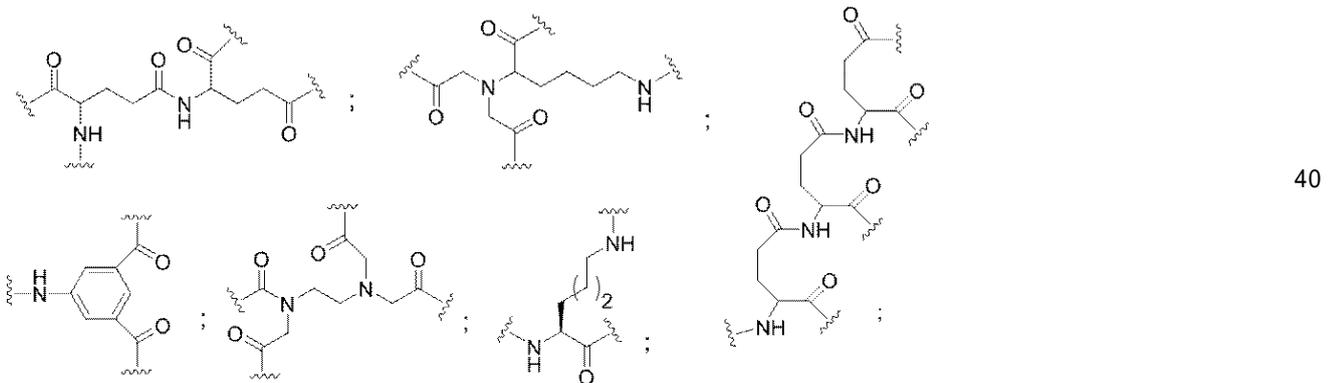
30

【 0 4 6 9 】

特定の実施形態において、分岐基は以下のなかから選択される構造を有する。

【 0 4 7 0 】

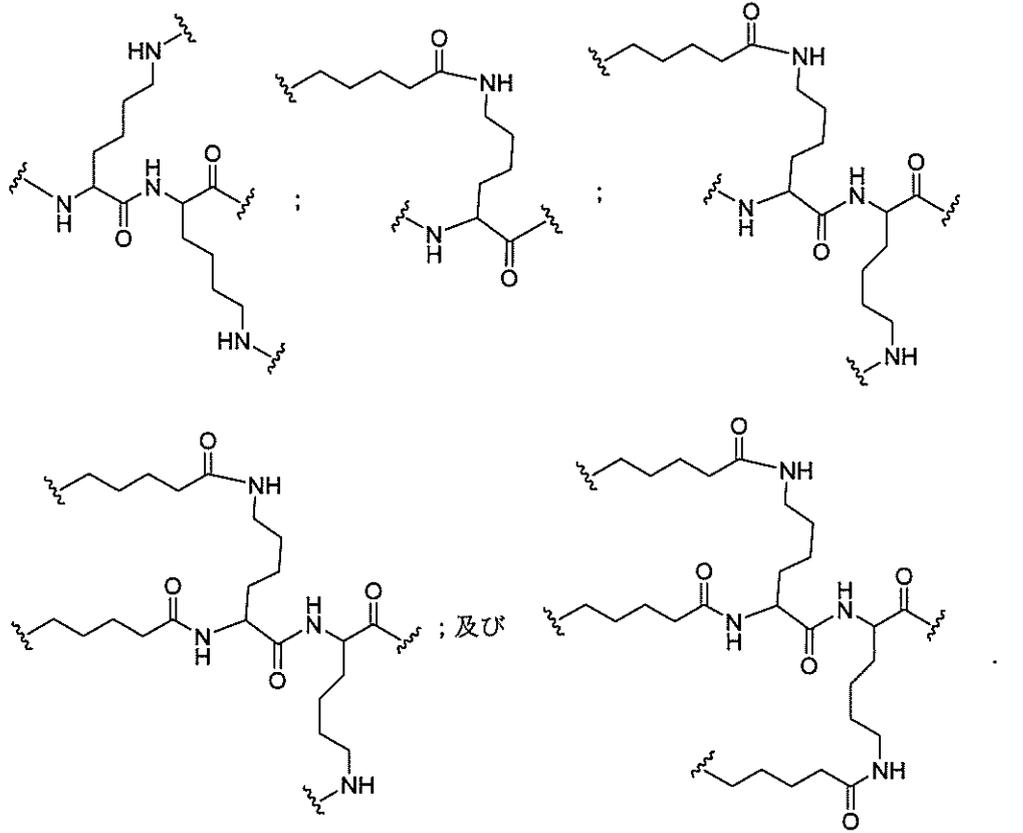
【 化 6 3 】



【 0 4 7 1 】

50

【化64】



10

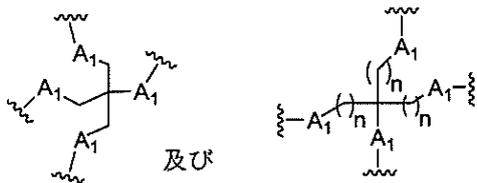
20

【0472】

特定の実施形態において、分岐基は、以下のなかから選択される構造を有し、

【0473】

【化65】



30

式中、各 A_1 は、独立して、O、S、C=O、またはNHであり、

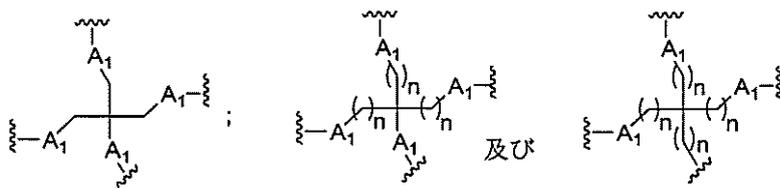
各 n は、独立して、1~20である。

【0474】

特定の実施形態において、分岐基は、以下のなかから選択される構造を有し、

【0475】

【化66】



40

式中、各 A_1 は、独立して、O、S、C=O、またはNHであり、

各 n は、独立して、1~20である。

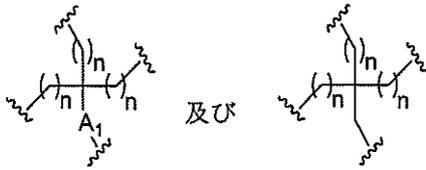
【0476】

50

特定の実施形態において、分岐基は、以下のなかから選択される構造を有し、

【0477】

【化67】



式中、A₁は、O、S、C=O、またはNHであり、

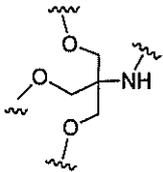
各nは、独立して、1~20である。

【0478】

特定の実施形態において、分岐基は以下のなかから選択される構造を有する。

【0479】

【化68】

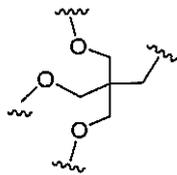


【0480】

特定の実施形態において、分岐基は以下のなかから選択される構造を有する。

【0481】

【化69】

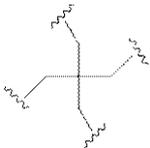


【0482】

特定の実施形態において、分岐基は以下のなかから選択される構造を有する。

【0483】

【化70】



2. 特定のテザー

【0484】

特定の実施形態において、共役基は、分岐基に共有結合される1つ以上のテザーを含む。

特定の実施形態において、共役基は、連結基に共有結合される1つ以上のテザーを含む。

特定の実施形態において、各テザーは、アルキル、エーテル、チオエーテル、ジスルフィド、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つ以上の基を任意の組み合わせで含む線状脂肪族基である。特定の実施形態において、各テザーは、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、アミド、ホスホジエステル及びポリエチレングリコール基から選択される1つ以上の基を任意の組み合わせで含む線状脂肪族基である。特定の実施形態において、各テザーは、アルキル、エーテル、及びアミド基が

10

20

30

40

50

ら選択される1つ以上の基を任意の組み合わせで含む線状脂肪族基である。特定の実施形態において、各テザーは、アルキル、置換アルキル、ホスホジエステル、エーテル、及びアミド基から選択される1つ以上の基を任意の組み合わせで含む線状脂肪族基である。特定の実施形態において、各テザーは、アルキル及びホスホジエステルから選択される1つ以上の基を任意の組み合わせで含む線状脂肪族基である。特定の実施形態において、各テザーは、少なくとも1つのリン連結基または中性連結基を含む。

【0485】

特定の実施形態において、テザーは、1つ以上の切断可能な結合を含む。特定の実施形態において、テザーは、アミド基またはエーテル基のいずれかを介して分岐基に結合される。特定の実施形態において、テザーは、ホスホジエステル基を介して分岐基に結合される。特定の実施形態において、テザーは、リン連結基または中性連結基を介して分岐基に結合される。特定の実施形態において、テザーは、エーテル基を介して分岐基に結合される。特定の実施形態において、テザーは、アミド基またはエーテル基のいずれかを介してリガンドに結合される。特定の実施形態において、テザーは、エーテル基を介してリガンドに結合される。特定の実施形態において、テザーは、アミド基またはエーテル基のいずれかを介してリガンドに結合される。特定の実施形態において、テザーは、エーテル基を介してリガンドに結合される。

10

【0486】

特定の実施形態において、各テザーは、リガンドと分岐基との間に約8～約20原子の鎖長を含む。特定の実施形態において、各テザー基は、リガンドと分岐基との間に約10～約18原子の鎖長を含む。特定の実施形態において、各テザー基は、約13原子の鎖長を含む。

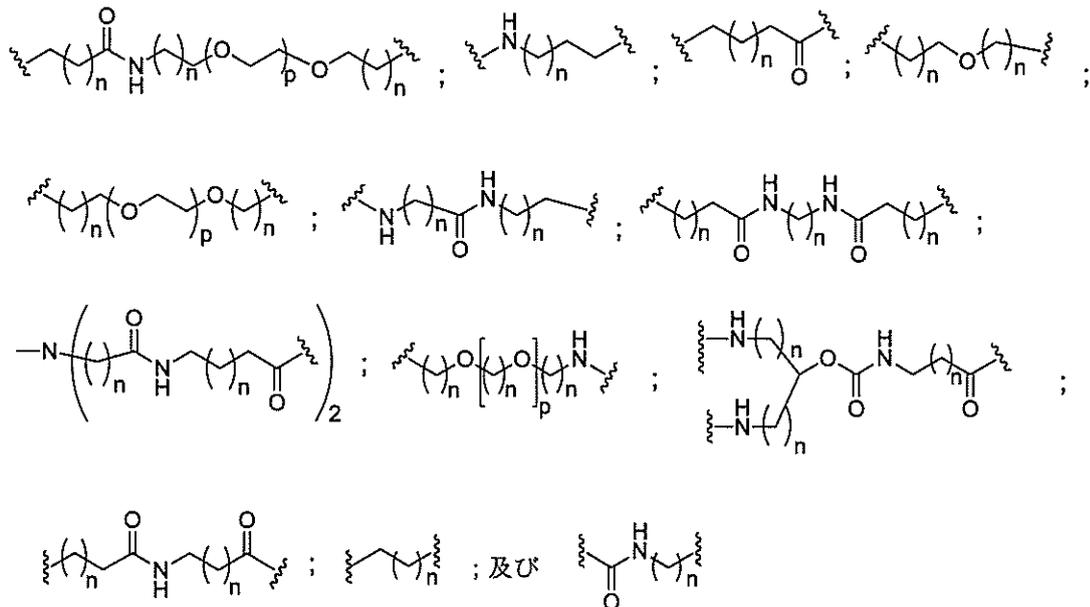
20

【0487】

特定の実施形態において、テザーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0488】

【化71】



30

40

各 n は、独立して、1～20であり、
各 p は、1～約6である。

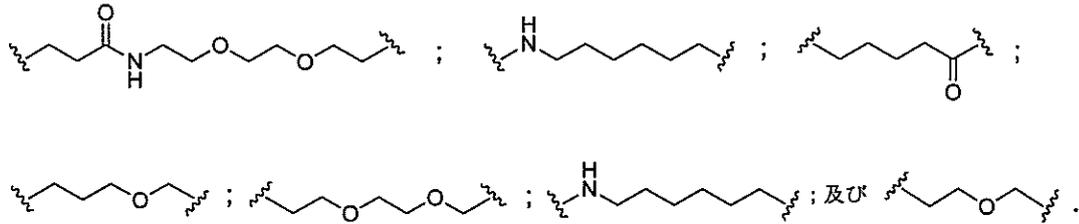
【0489】

特定の実施形態において、テザーは以下のなかから選択される構造を有する。

【0490】

50

【化 7 2】

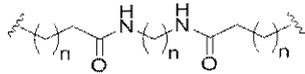


【0491】

特定の実施形態において、テザーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0492】

【化 7 3】



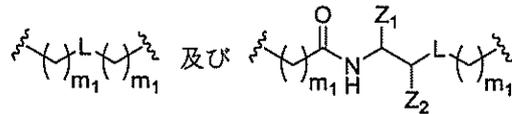
式中、各 n は、独立して、1 ~ 20 である。

【0493】

特定の実施形態において、テザーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0494】

【化 7 4】



式中、 L は、リン連結基または中性連結基のいずれかであり、

Z_1 は、 $C(=O)O-R_2$ であり、

Z_2 は、 H 、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、または置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

R_2 は、 H 、 $C_1 \sim C_6$ アルキルまたは置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

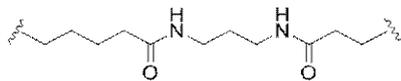
各 m_1 は、独立して、0 ~ 20 であり、各テザーにつき少なくとも1つの m_1 は0より大きい。

【0495】

特定の実施形態において、テザーは以下のなかから選択される構造を有する。

【0496】

【化 7 5】

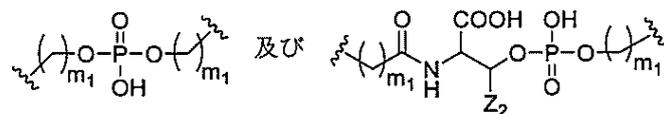


【0497】

特定の実施形態において、テザーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0498】

【化 7 6】



式中、 Z_2 は、 H または CH_3 であり、

各 m_1 は、独立して、0 ~ 20 であり、各テザーにつき少なくとも1つの m_1 は0より大きい

10

20

30

40

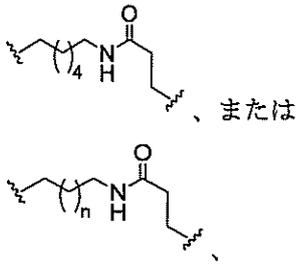
50

【0499】

特定の実施形態において、テザーは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0500】

【化77】



10

式中、各 n は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、または7である。

【0501】

特定の実施形態において、テザーは、リン連結基を含む。特定の実施形態において、テザーは、いかなるアミド結合も含まない。特定の実施形態において、テザーは、リン連結基を含み、いかなるアミド結合も含まない。

3. 特定のリガンド

【0502】

特定の実施形態において、本開示は、各リガンドがテザーに共有結合されるリガンドを提供する。特定の実施形態において、各リガンドは、標的細胞において少なくとも1種類の受容体に対する親和性を有するように選択される。特定の実施形態において、哺乳類肝臓細胞の表面において少なくとも1種類の受容体に対する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、肝アジア糖タンパク質受容体 (ASGP-R) に対する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。特定の実施形態において、各リガンドは、ガラクトース、N-アセチルガラクトースアミン、マンノース、グルコース、グルコサミン、及びフコースから独立して選択される。特定の実施形態において、各リガンドは、N-アセチルガラクトースアミン (GalNAc) である。特定の実施形態において、ターゲティング部分は2~6個のリガンドを含む。特定の実施形態において、ターゲティング部分は3個のリガンドを含む。特定の実施形態において、ターゲティング部分は3個のN-アセチルガラクトサミンリガンドを含む。

20

30

【0503】

特定の実施形態において、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。特定の実施形態において、リガンドは、アミノ糖またはチオ糖である。例えばアミノ糖は、当技術分野で知られている多くの化合物、例えばグルコサミン、シアル酸、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-N-ノイラミン酸から選択されうる。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、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-グルコ-ヘプトピラノシドからなる群から選択されうる。

40

【0504】

特定の実施形態において、「GalNAc」または「Gal-NAc」は、文献内で一般

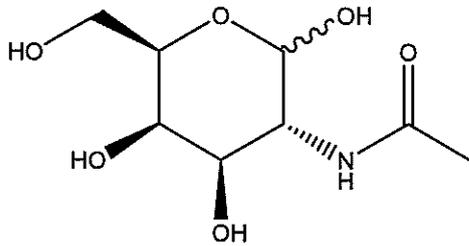
50

にN-アセチルガラクトサミンと称される2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースを指す。特定の実施形態において、「N-アセチルガラクトサミン」は、2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースを指す。特定の実施形態において、「GalNac」または「Gal-NAc」は、2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースを指す。特定の実施形態において、「GalNac」または「Gal-NAc」は、型：2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースと型：2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースの両方を含む、2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースを指す。特定の実施形態において、型：2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースと型：2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースはどちらも可換的に使用されうる。したがって一方の型が図示される構造において、これらの構造は、他方の型も同様に含むものとする。例えば型：2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースの構造が示される場合、この構造は他方の型も同様に含むものとする。特定の好ましい実施形態では、型：2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノースが好ましい実施形態である。

10

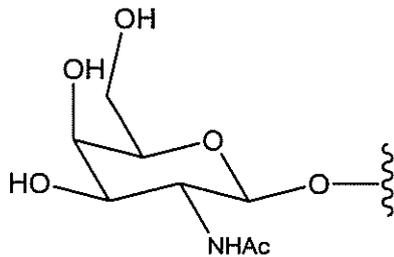
【0505】

【化78】



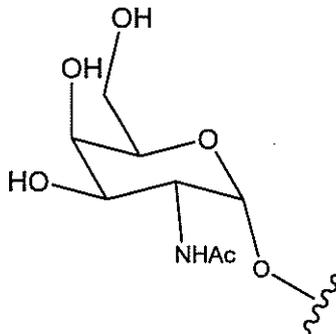
20

2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-D-ガラクトピラノース



30

2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-beta-D-ガラクトピラノース



40

2-(アセチルアミノ)-2-デオキシ-alpha-D-ガラクトピラノース

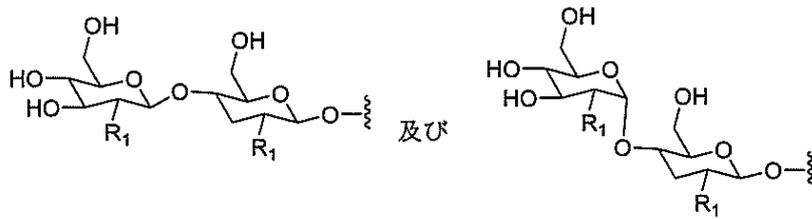
【0506】

特定の実施形態において、1つ以上のリガンドは、以下のなかから選択される構造を有し、

【0507】

50

【化79】



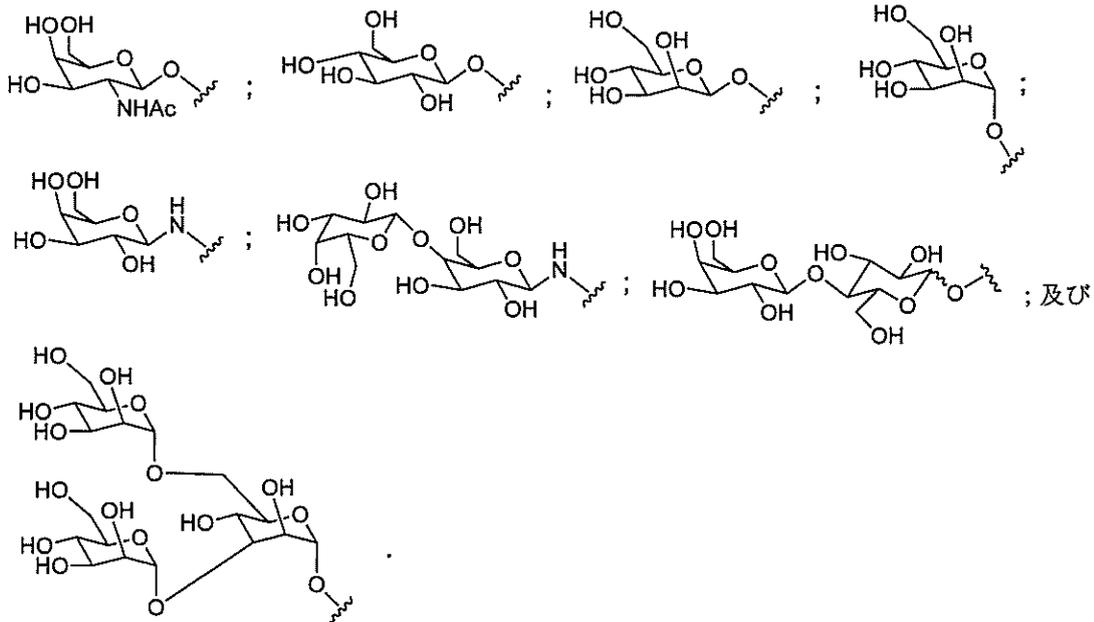
式中、各 R₁ は、OH 及び NHCOOH から選択される。

【0508】

特定の実施形態において、1つ以上のリガンドは以下のなかから選択される構造を有する。

【0509】

【化80】

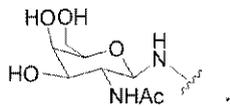


【0510】

特定の実施形態において、1つ以上のリガンドは以下のなかから選択される構造を有する。

【0511】

【化81】

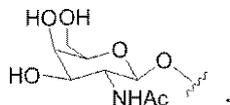


【0512】

特定の実施形態において、1つ以上のリガンドは以下のなかから選択される構造を有する。

【0513】

【化82】



i. 特定の共役体

【0514】

特定の実施形態において、共役基は、上述の構造的特徴を含む。特定のそのような実施形

10

20

30

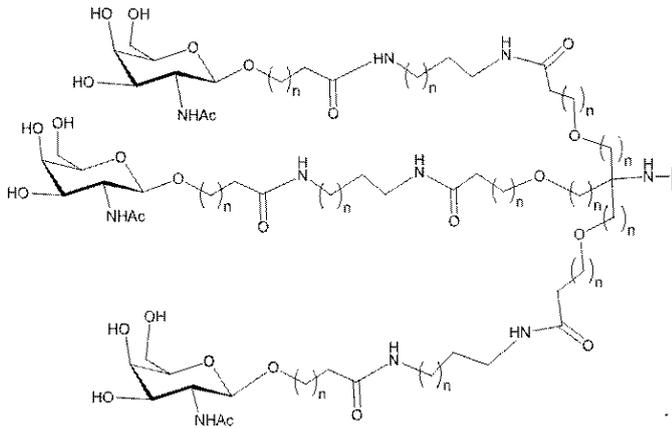
40

50

態において、共役基は以下の構造を有し、

【0515】

【化83】



10

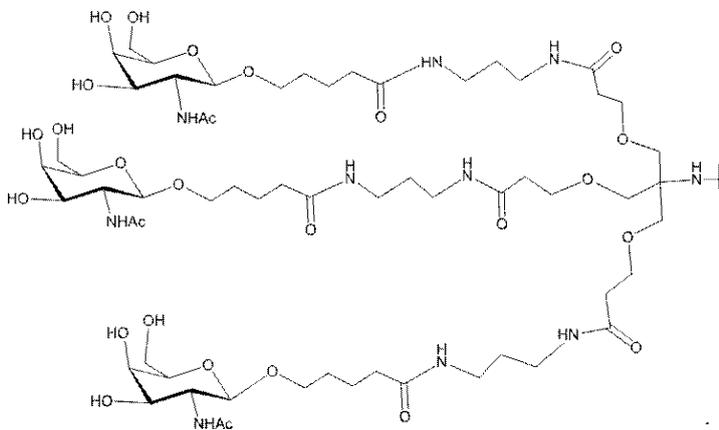
式中、各 n は、独立して、1 ~ 20 である。

【0516】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0517】

【化84】



20

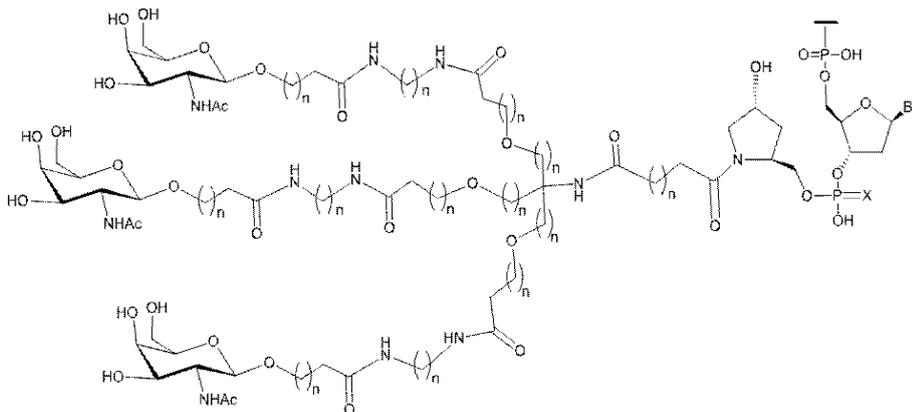
30

【0518】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有し、

【0519】

【化85】



40

式中、各 n は、独立して、1 ~ 20 であり、

Z は、H または 結合固体支持体であり、

50

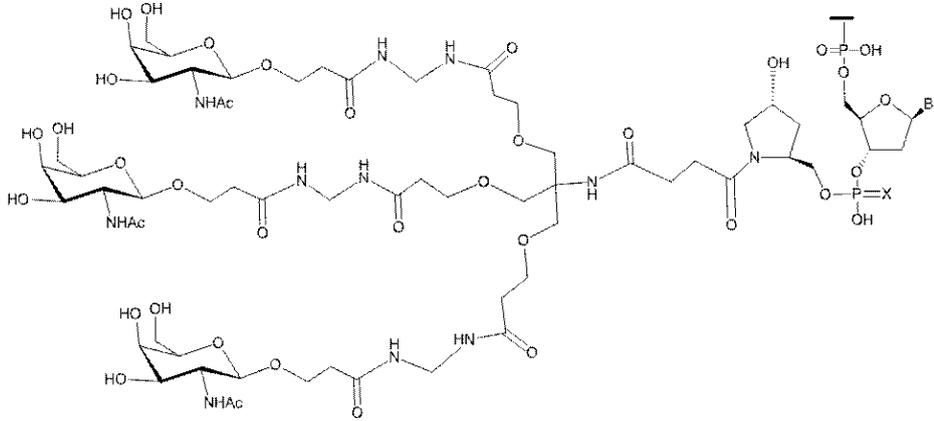
Qは、アンチセンス化合物であり、
 Xは、OまたはSであり、
 Bxは、複素環式塩基部分である。

【0520】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0521】

【化86】



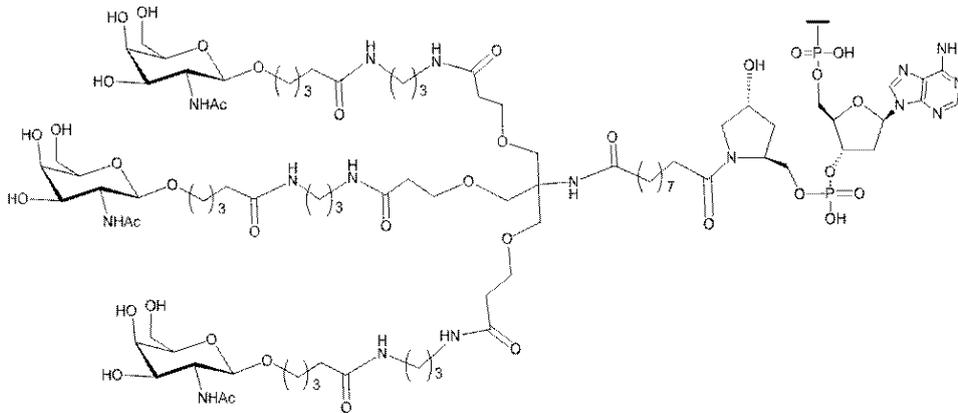
10

【0522】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0523】

【化87】



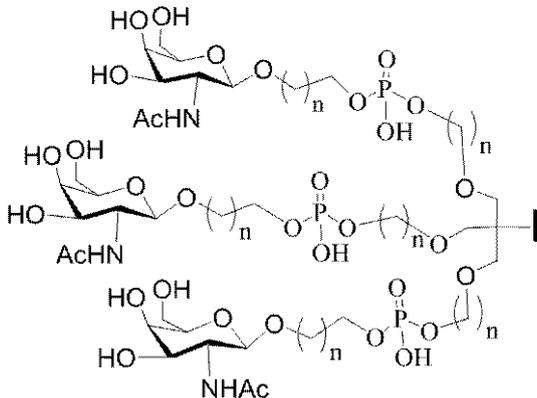
30

【0524】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0525】

【化88】



40

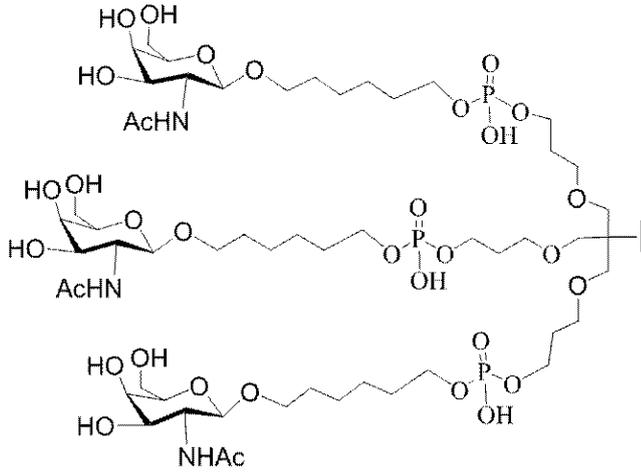
50

【0526】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0527】

【化89】



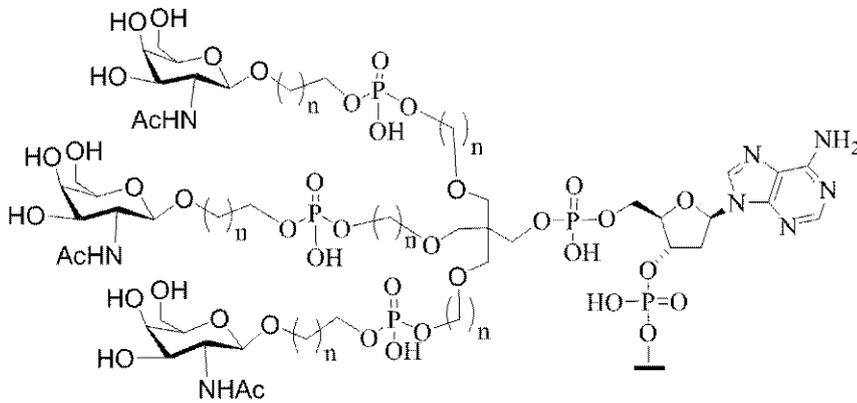
10

【0528】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0529】

【化90】



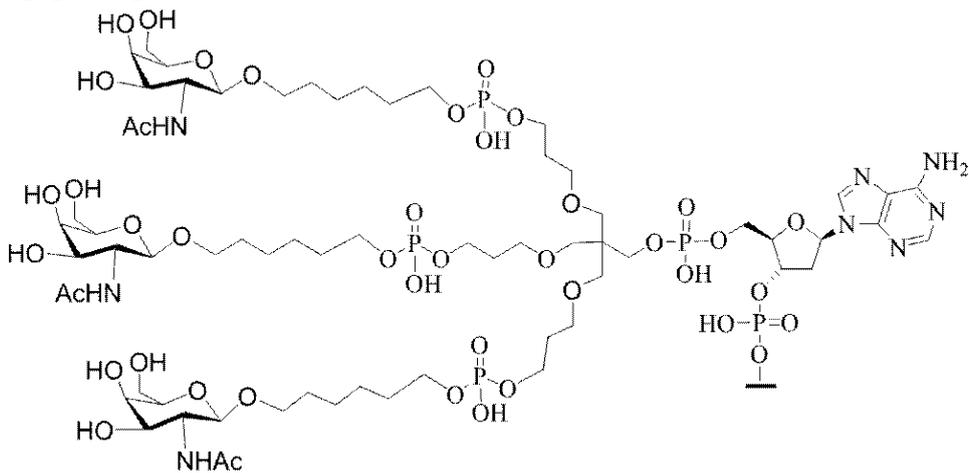
30

【0530】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0531】

【化91】



40

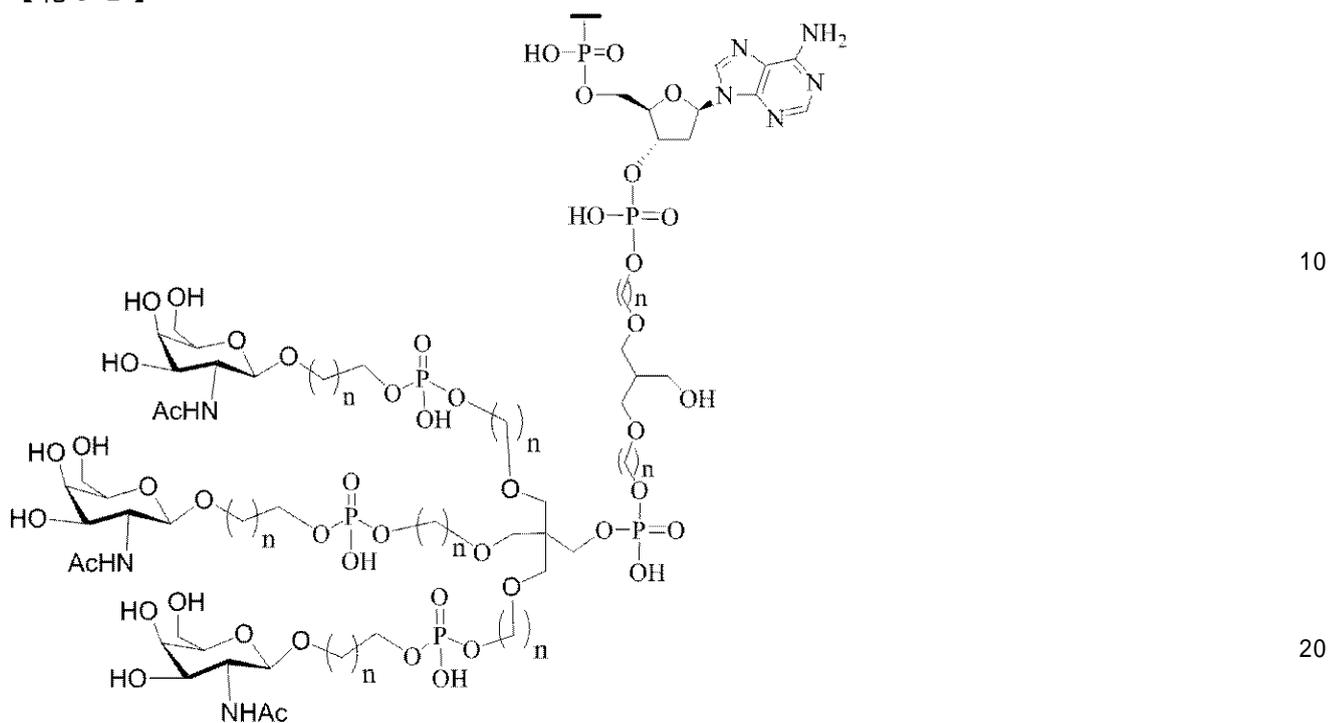
【0532】

50

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0533】

【化92】

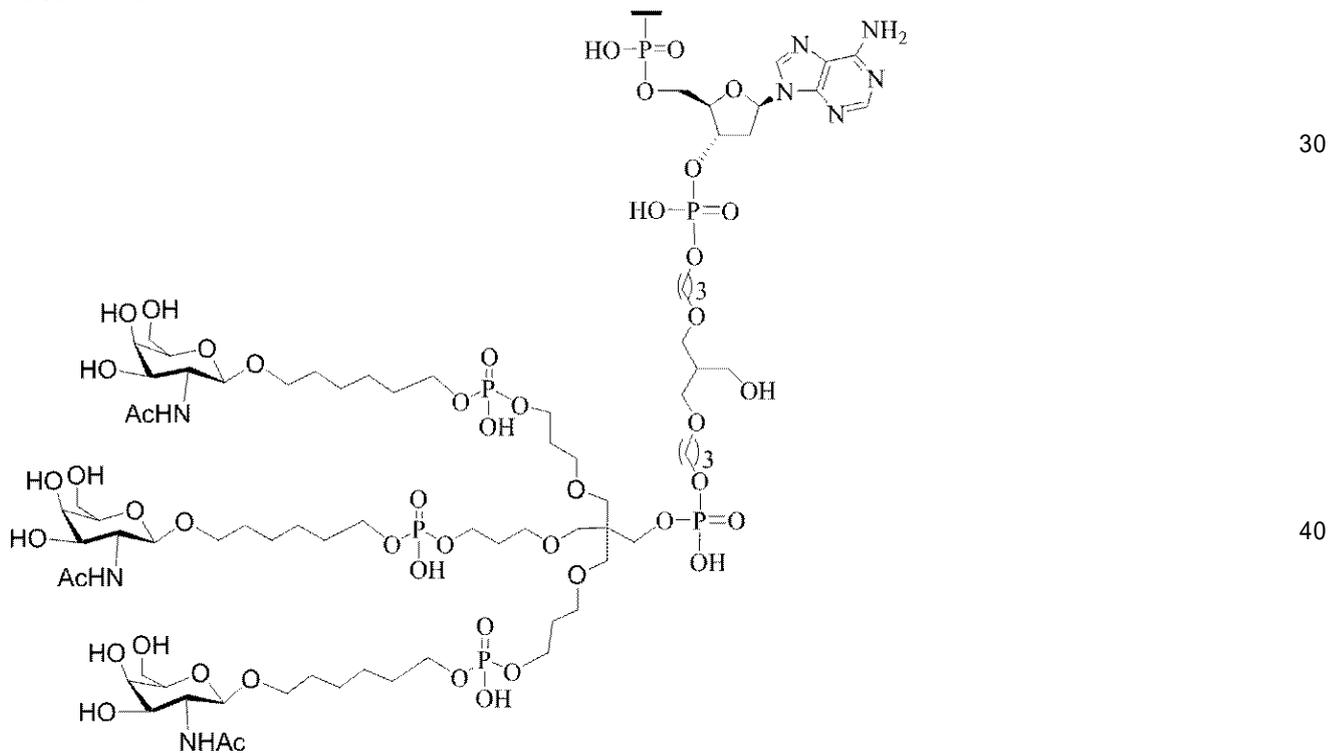


【0534】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【0535】

【化93】



【0536】

特定の実施形態において、共役体はピロリジンを含まない。

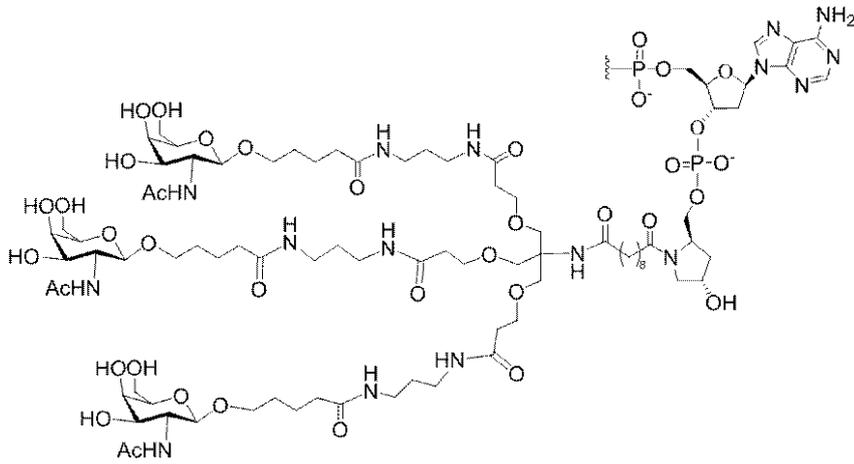
【0537】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

50

【 0 5 3 8 】

【 化 9 4 】



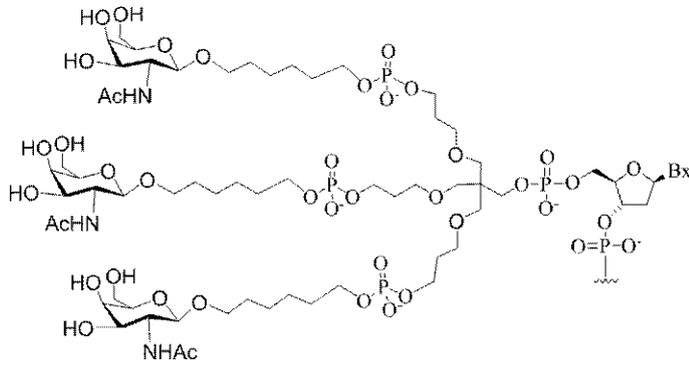
10

【 0 5 3 9 】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【 0 5 4 0 】

【 化 9 5 】



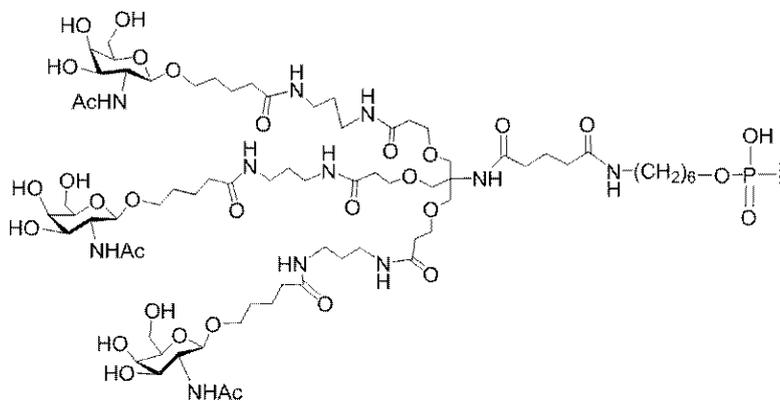
20

【 0 5 4 1 】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【 0 5 4 2 】

【 化 9 6 】



40

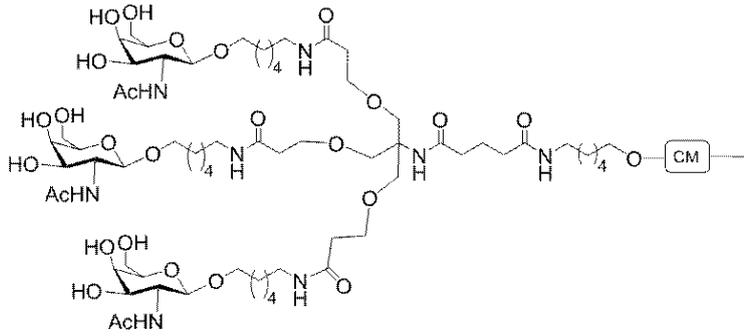
【 0 5 4 3 】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【 0 5 4 4 】

50

【化 9 7】



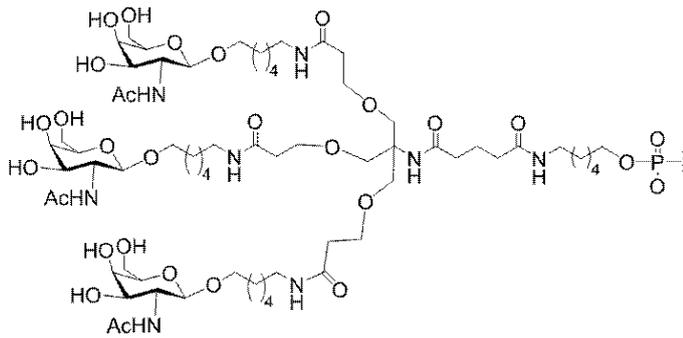
10

【 0 5 4 5】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【 0 5 4 6】

【化 9 8】



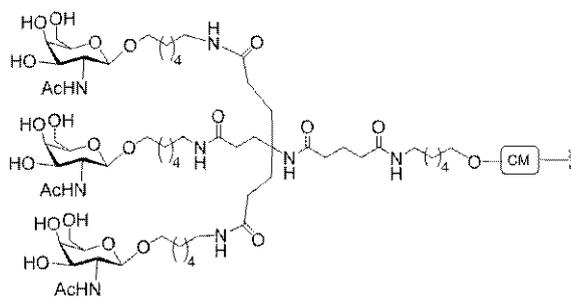
20

【 0 5 4 7】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【 0 5 4 8】

【化 9 9】



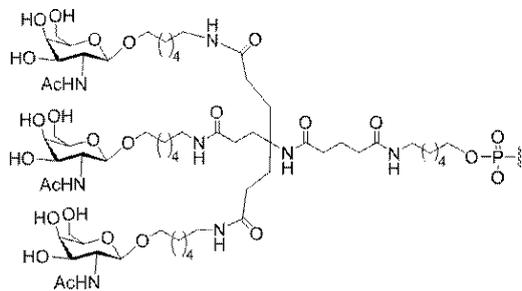
30

【 0 5 4 9】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【 0 5 5 0】

【化 1 0 0】



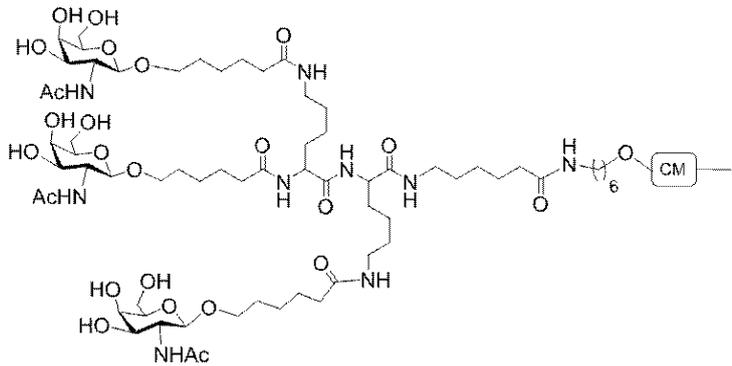
50

【 0 5 5 1 】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【 0 5 5 2 】

【 化 1 0 1 】



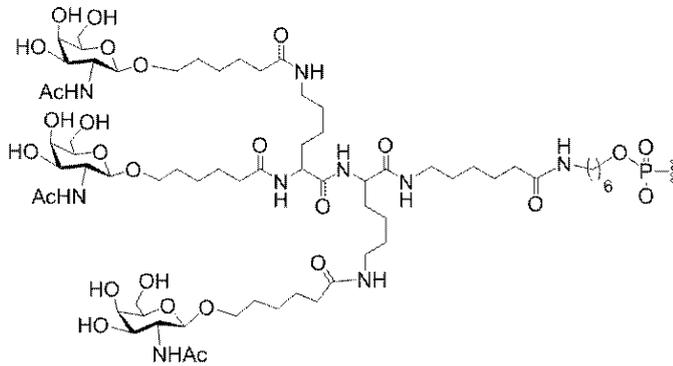
10

【 0 5 5 3 】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【 0 5 5 4 】

【 化 1 0 2 】



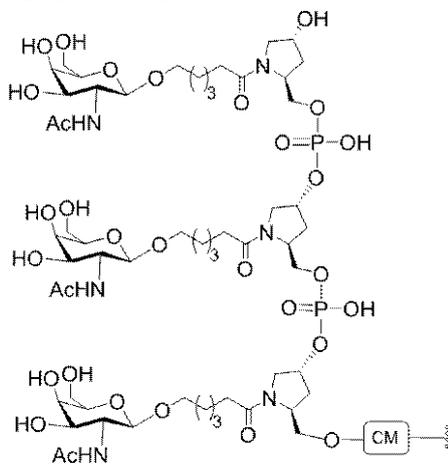
20

【 0 5 5 5 】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【 0 5 5 6 】

【 化 1 0 3 】



30

40

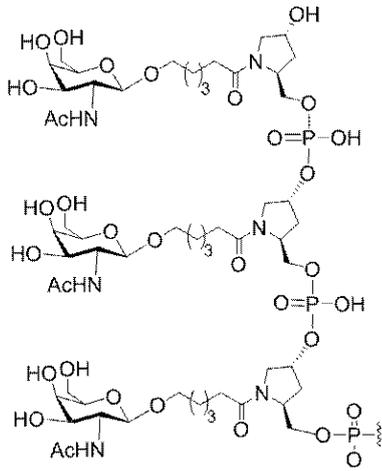
【 0 5 5 7 】

特定のそのような実施形態において、共役基は以下の構造を有する。

【 0 5 5 8 】

50

【化104】



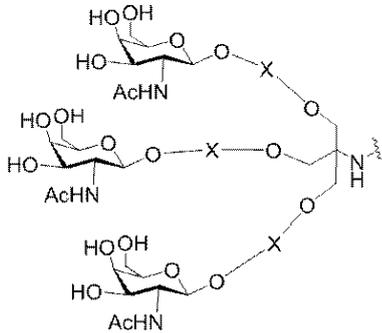
10

【0559】

特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0560】

【化105】



20

式中、Xは、6～11個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーである。

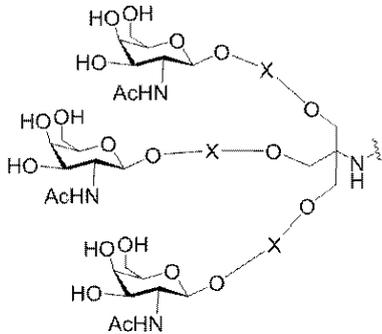
30

【0561】

特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0562】

【化106】



40

式中、Xは、10個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーである。

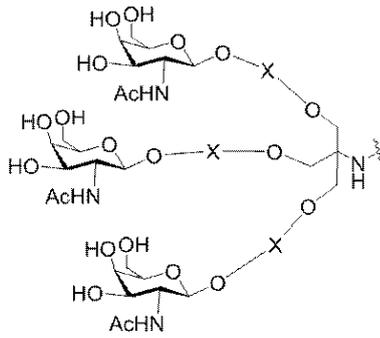
【0563】

特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0564】

50

【化 1 0 7】



10

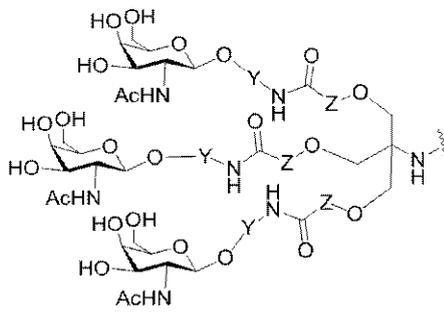
式中、Xは、4～11個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーであり、前記テザーは、厳密に1個のアミド結合を含む。

【0 5 6 5】

特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0 5 6 6】

【化 1 0 8】



20

式中、Y及びZは、C₁～C₁₂置換もしくは無置換アルキル、アルケニル、もしくはアルキニル基、またはエーテル、ケトン、アミド、エステル、カルバメート、アミン、ピペリジン、ホスフェート、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、トリアゾール、ピロリジン、ジスルフィド、もしくはチオエーテルを含む基から独立して選択される。

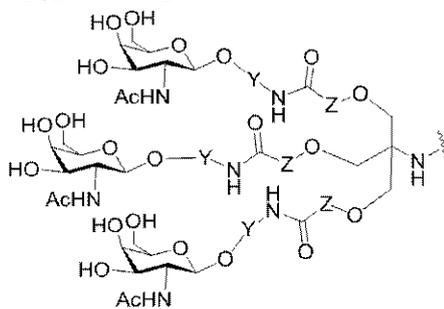
30

【0 5 6 7】

特定のそのような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0 5 6 8】

【化 1 0 9】



40

式中、Y及びZは、C₁～C₁₂置換もしくは無置換アルキル基、または厳密に1個のエーテルもしくは厳密に2個のエーテル、アミド、アミン、ピペリジン、ホスフェート、ホスホジエステル、またはホスホロチオエートを含む基から独立して選択される。

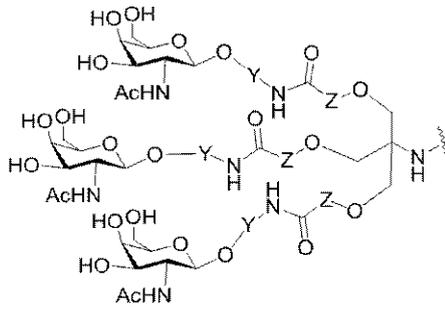
【0 5 6 9】

特定のそのような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

50

【 0 5 7 0 】

【 化 1 1 0 】



10

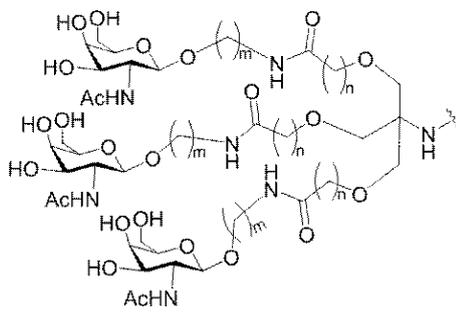
式中、Y及びZは、C₁～C₁₂置換または無置換アルキル基から独立して選択される。

【 0 5 7 1 】

特定のそのような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【 0 5 7 2 】

【 化 1 1 1 】



20

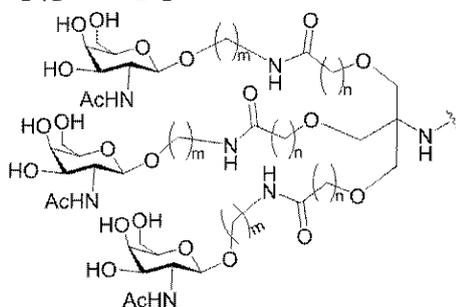
式中、m及びnは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、及び12から独立して選択される。

【 0 5 7 3 】

特定のそのような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【 0 5 7 4 】

【 化 1 1 2 】



40

式中、mは、4、5、6、7、または8であり、nは、1、2、3、または4である。

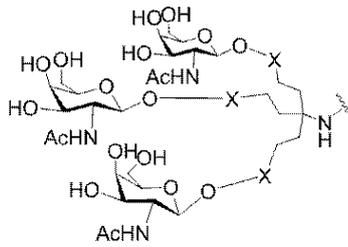
【 0 5 7 5 】

特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【 0 5 7 6 】

50

【化 1 1 3】



式中、Xは、4～13個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーであり、Xは、エーテル基を含まない。

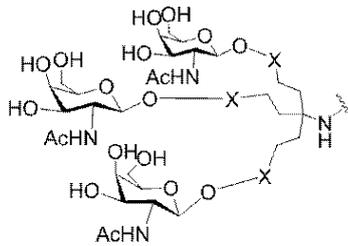
10

【0577】

特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0578】

【化 1 1 4】



20

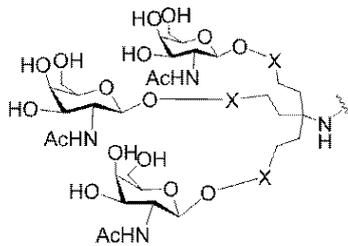
式中、Xは、8個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーであり、Xは、エーテル基を含まない。

【0579】

特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0580】

【化 1 1 5】



30

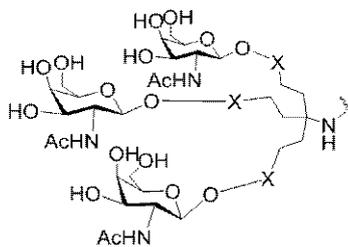
式中、Xは、4～13個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーであり、前記テザーは、厳密に1個のアミド結合を含み、Xはエーテル基を含まない。

【0581】

特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0582】

【化 1 1 6】



40

式中、Xは、4～13個の連続して結合された原子の置換テザーまたは無置換テザーであり、前記テザーは、アミド結合及び置換または無置換C₂～C₁₁アルキル基からなる。

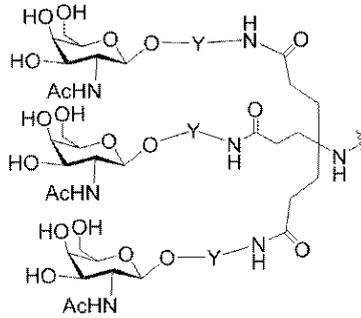
【0583】

50

特定の実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0584】

【化117】



10

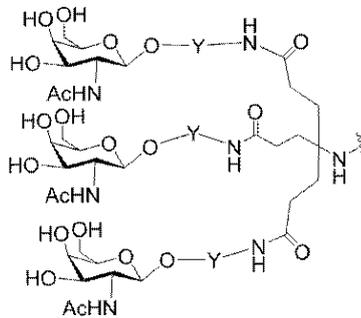
式中、Yは、C₁~C₁₂置換もしくは無置換アルキル、アルケニル、もしくはアルキニル基、またはエーテル、ケトン、アミド、エステル、カルバメート、アミン、ピペリジン、ホスフェート、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、トリアゾール、ピロリジン、ジスルフィド、もしくはチオエーテルを含む基から選択される。

【0585】

特定のような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0586】

【化118】



20

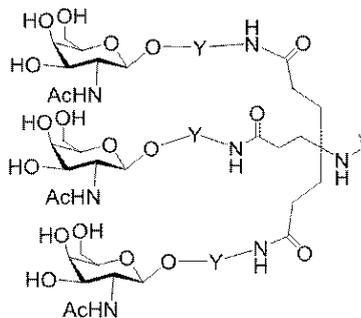
式中、Yは、C₁~C₁₂置換もしくは無置換アルキル基、またはエーテル、アミン、ピペリジン、ホスフェート、ホスホジエステル、もしくはホスホロチオエートを含む基から選択される。

【0587】

特定のような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0588】

【化119】



40

式中、Yは、C₁~C₁₂置換または無置換アルキル基から選択される。

【0589】

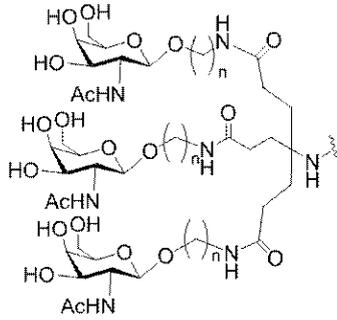
特定のような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有

50

し、

【0590】

【化120】



10

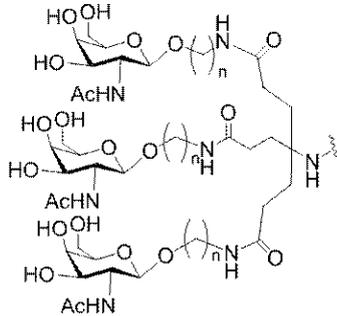
式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12である。

【0591】

特定のそのような実施形態において、共役基の細胞ターゲティング部分は以下の構造を有し、

【0592】

【化121】



20

式中、nは、4、5、6、7、または8である。

【0593】

特定の実施形態では、共役体はピロリジンを含まない。

30

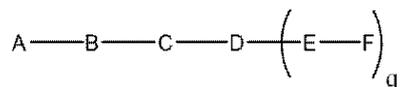
a 特定の共役アンチセンス化合物

【0594】

特定の実施形態において、共役体は、ヌクレオシドの2'、3'、または5'位でアンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドに結合される。特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下の構造を有し、

【0595】

【化122】



40

式中、

Aは、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

Bは、切断可能部分であり、

Cは、共役リンカーであり、

Dは、分岐基であり、

各Eは、テザーであり、

各Fは、リガンドであり、

qは、1～5の整数である。

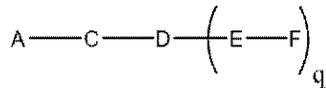
【0596】

特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下の構造を有し、

50

【0597】

【化123】



式中、

Aは、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

Cは、共役リンカーであり、

Dは、分岐基であり、

各Eは、テザーであり、

各Fは、リガンドであり、

qは、1～5の整数である。

10

【0598】

特定のそのような実施形態において、共役リンカーは、少なくとも1つの切断可能な結合を含む。

【0599】

特定のそのような実施形態において、分岐基は、少なくとも1つの切断可能な結合を含む。

【0600】

特定の実施形態において、各テザーは、少なくとも1つの切断可能な結合を含む。

【0601】

特定の実施形態において、共役体は、ヌクレオシドの2'、3'、または5'位でアンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドに結合される。

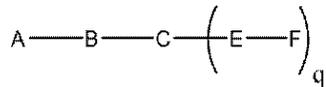
20

【0602】

特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下の構造を有し、

【0603】

【化124】



式中、

Aは、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

Bは、切断可能部分であり、

Cは、共役リンカーであり、

各Eは、テザーであり、

各Fは、リガンドであり、かつ

qは、1～5の整数である。

30

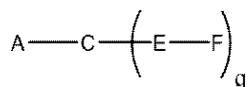
【0604】

特定の実施形態において、共役体は、ヌクレオシドの2'、3'、または5'位でアンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシドに結合される。特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下の構造を有し、

40

【0605】

【化125】



式中、

Aは、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

Cは、共役リンカーであり、

各Eは、テザーであり、

各Fは、リガンドであり、かつ

50

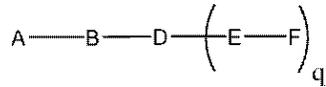
q は、1 ~ 5 の整数である。

【0606】

特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下の構造を有し、

【0607】

【化126】



式中、

A は、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

B は、切断可能部分であり、

D は、分岐基であり、

各 E は、テザーであり、

各 F は、リガンドであり、かつ

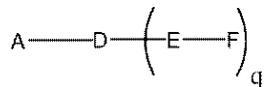
q は、1 ~ 5 の整数である。

【0608】

特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下の構造を有し、

【0609】

【化127】



式中、

A は、アンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

D は、分岐基であり、

各 E は、テザーであり、

各 F は、リガンドであり、かつ

q は、1 ~ 5 の整数である。

【0610】

特定のそのような実施形態において、共役リンカーは、少なくとも1つの切断可能な結合を含む。

【0611】

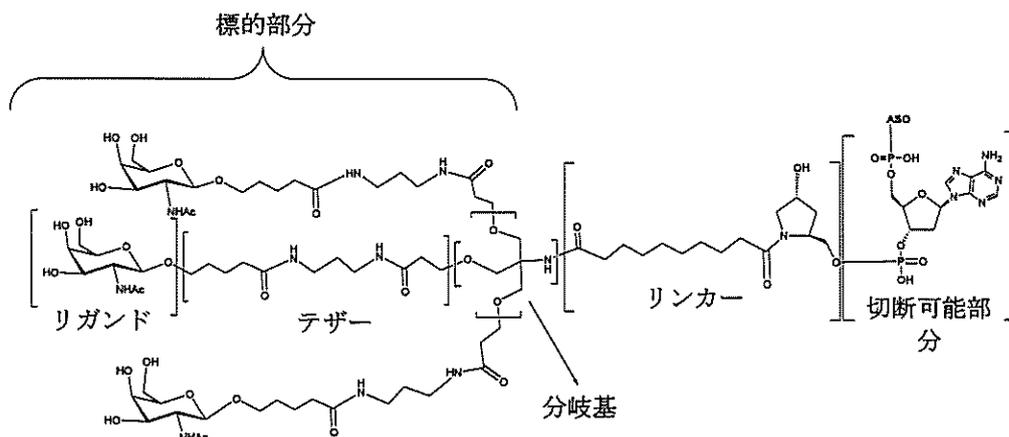
特定の実施形態において、各テザーは、少なくとも1つの切断可能な結合を含む。

【0612】

特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下のなかから選択される構造を有する。

【0613】

【化128】

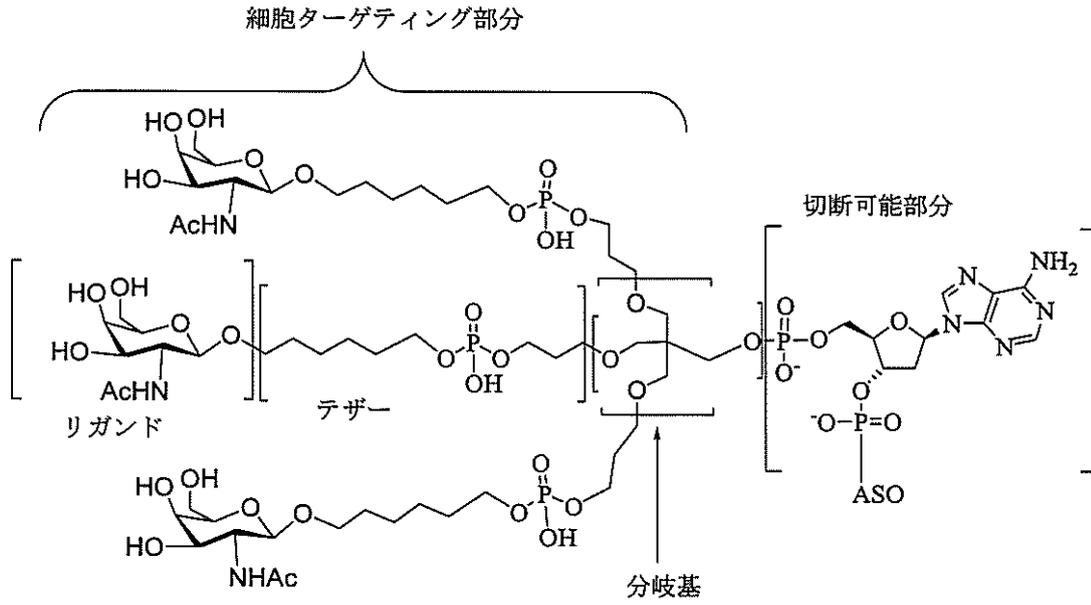


【0614】

特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下のなかから選択される構造を有する。

【0615】

【化129】



【0616】

特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は以下のなかから選択される構造を有する。

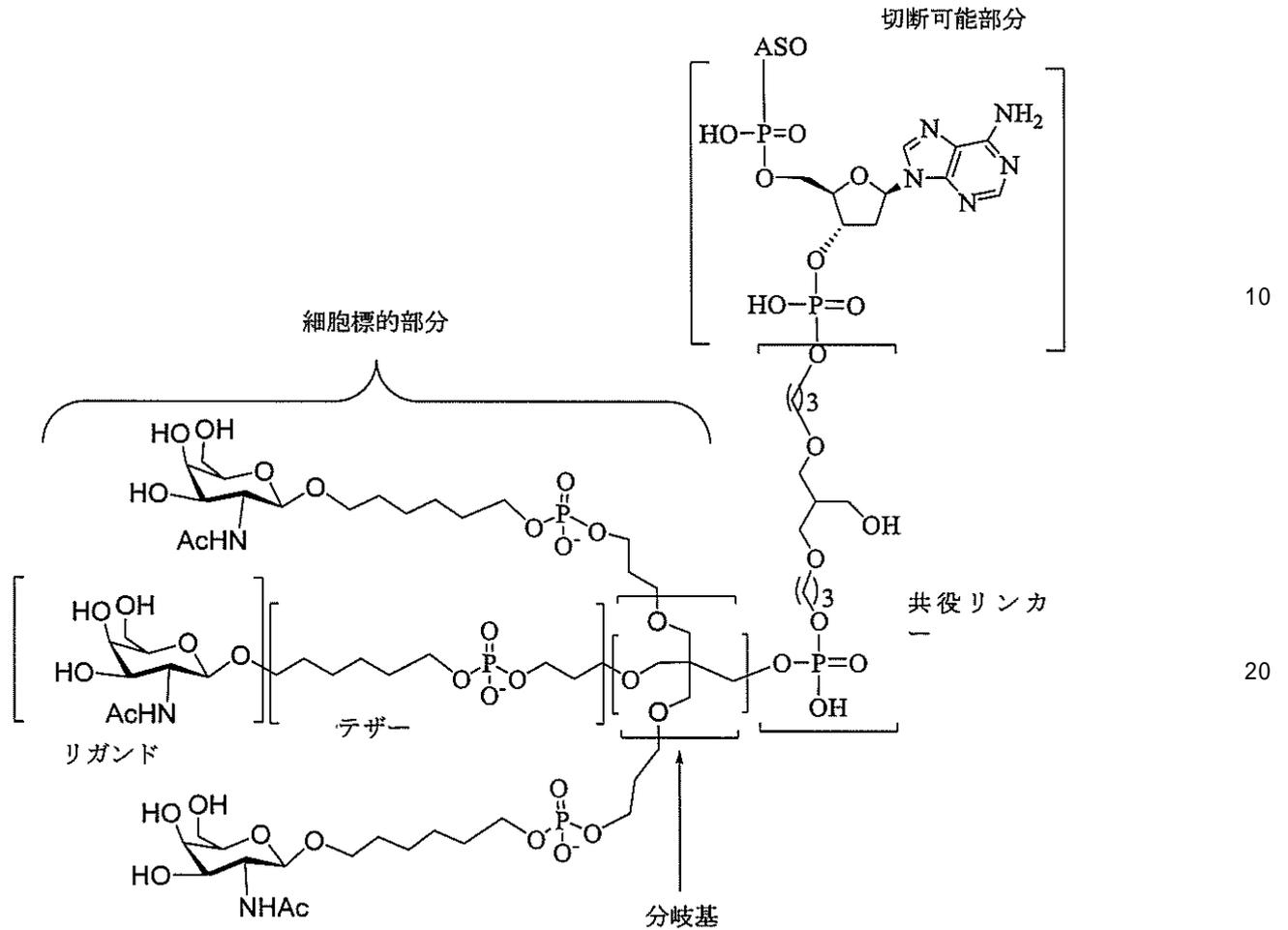
【0617】

30

40

50

【化 1 3 0】



【0618】

上述の共役体、共役アンチセンス化合物、テザー、リンカー、分岐基、リガンド、切断可能部分、ならびに他の修飾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には、US 5,994,517、US 6,300,319、US 6,660,720、US 6,906,182、US 7,262,177、US 7,491,805、US 8,106,022、US 7,723,509、US 2006/0148740、US 2011/0123520号、WO 2013/033230、及びWO 2012/037254が含まれるが、これらに限定されず、これらの文献のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0619】

上述の共役体、共役アンチセンス化合物、テザー、リンカー、分岐基、リガンド、切断可能部分、ならびに他の修飾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 Galactoside 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 asia

loglycoprotein receptor of mammalian hepatocytes」*Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2011) 19:2494-2500、RENSSEN et al. 「Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo」*J. Biol. Chem.* (2001) 276(40):37577-37584、RENSSEN 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、これらの文献のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0620】

特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は、RNase Hベースのオリゴヌクレオチド（ギャップマーなど）またはスプライス調節オリゴヌクレオチド（完全修飾オリゴヌクレオチドなど）、及び少なくとも1つ、2つ、または3つのGalNAc基を含む任意の共役基を含む。特定の実施形態において、共役アンチセンス化合物は、以下の参考文献：*Lee, Carbohydr Res, 1978, 67, 509-514*、*Connolly et al., J Biol Chem, 1982, 257, 939-945*、*Pavia et al., Int J Pep Protein Res, 1983, 22, 539-548*、*Lee et al., Biochem, 1984, 23, 4255-4261*、*Lee et al., Glycoconjugate J, 1987, 4, 317-328*、*Toyokuni et al., Tetrahedron Lett, 1990, 31, 2673-2676*、*Biessen et al., J Med Chem, 1995, 38, 1538-1546*、*Valentijn et al., Tetrahedron, 1997, 53, 759-770*、*Kim et al., Tetrahedron Lett, 1997, 38, 3487-3490*、*Lee et al., Bioconjug Chem, 1997, 8, 762-765*、*Kato et al., Glycobiol, 2001, 11, 821-829*、*Rensen et al., J Biol Chem, 2001, 276, 37577-37584*、*Lee et al., Methods Enzymol, 2003, 362, 38-43*、*Westrlind et al., Glycoconj J, 2004, 21, 227-241*、*Lee et al., Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(19), 5132-5135*、*Maierhofer et al., Bioorg Med Chem, 2007, 15, 7661-7676*、*Khorev et al., Bioorg Med Chem, 2008, 16, 5216-5231*、*Lee et al., Bioorg Med Chem, 2011, 19, 2494-2500*、*Kornilova et al., Analyt Biochem, 2012, 425, 43-46*、*Pujol et al., Angew Chemie Int Ed Engl, 2012, 51, 7445-7448*、*Biessen et al., J Med Chem, 19*

10

20

30

40

50

95, 38, 1846 - 1852
 、Sliedregt et al., J Med Chem, 1999, 42, 609 -
 618、Rensen et al., J Med Chem, 2004, 47, 5798
 - 5808、Rensen et al., Arterioscler Thromb V
 asc Biol, 2006, 26, 169 - 175、van Rossenberg e
 t al., Gene Ther, 2004, 11, 457 - 464、Sato
 et al., J Am Chem Soc, 2004, 126, 14013 - 14022
 、Lee et al., J Org Chem, 2012, 77, 7564 - 7571、
 Biessen et al., FASEB J, 2000, 14, 1784 - 1792、
 Rajur et al., Bioconjug Chem, 1997, 8, 935 - 94
 0、Duff et al., Methods Enzymol, 2000, 313, 29
 7 - 321、Maier et al., Bioconjug Chem, 2003, 14
 , 18 - 29、Jayaprakash et al., Org Lett, 2010, 1
 2, 5410 - 5413、Manoharan, Antisense Nucleic A
 cid Drug Dev, 2002, 12, 103 - 128、Merwin et al
 ., Bioconjug Chem, 1994, 5, 612 - 620、Tomiya et
 al., Bioorg Med Chem, 2013, 21, 5275 - 5281、国際出
 願WO1998/013381; WO2011/038356; WO1997/0460
 98; WO2008/098788; WO2004/101619; WO2012/03
 7254; WO2011/120053; WO2011/100131; WO2011/
 163121; WO2012/177947; WO2013/033230; WO201
 3/075035; WO2012/083185; WO2012/083046; WO2
 009/082607; WO2009/134487; WO2010/144740; W
 O2010/148013; WO1997/020563; WO2010/088537
 ; WO2002/043771; WO2010/129709; WO2012/0681
 87; WO2009/126933; WO2004/024757; WO2010/05
 4406; WO2012/089352; WO2012/089602; WO2013/
 166121; WO2013/165816; 米国特許4, 751, 219; 8, 552
 , 163; 6, 908, 903; 7, 262, 177; 5, 994, 517; 6, 300
 , 319; 8, 106, 022; 7, 491, 805; 7, 491, 805; 7, 582
 , 744; 8, 137, 695; 6, 383, 812; 6, 525, 031; 6, 660
 , 720; 7, 723, 509; 8, 541, 548; 8, 344, 125; 8, 313
 , 772; 8, 349, 308; 8, 450, 467; 8, 501, 930; 8, 158
 , 601; 7, 262, 177; 6, 906, 182; 6, 620, 916; 8, 435
 , 491; 8, 404, 862; 7, 851, 615; 米国特許出願公開US2011/
 0097264; US2011/0097265; US2013/0004427; US
 2005/0164235; US2006/0148740; US2008/02810
 44; US2010/0240730; US2003/0119724; US2006/
 0183886; US2008/0206869; US2011/0269814; US
 2009/0286973; US2011/0207799; US2012/01360
 42; US2012/0165393; US2008/0281041; US2009/
 0203135; US2012/0035115; US2012/0095075; US
 2012/0101148; US2012/0128760; US2012/01575
 09; US2012/0230938; US2013/0109817; US2013/
 0121954; US2013/0178512; US2013/0236968; US
 2011/0123520; US2003/0077829; US2008/01088
 01; 及びUS2009/0203132のうちいずれかにおいて見いだされる任意の
 共役基を含み、これらの文献のそれぞれは参照によりその全体が組み込まれる。

【0621】

アンチセンスオリゴヌクレオチドのインビトロ試験

本明細書には、細胞をアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置するための方法を記載する。この方法には、他のアンチセンス化合物による処置のために、適宜変更を加えることができる。

【0622】

細胞は、細胞が培養中で約60～80%コンフルエントに達した時に、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理することができる。

【0623】

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一つに、カチオン性脂質トランスフェクション試薬LIPOFECTIN (Invitrogen, カリフォルニア州カールズバッド)がある。アンチセンスオリゴヌクレオチドをOPTI-MEM1 (Invitrogen, カリフォルニア州カールズバッド)中でLIPOFECTINと混合することで、所望の最終アンチセンスオリゴヌクレオチド濃度と、100nMアンチセンスオリゴヌクレオチドあたり2～12μg/mLの範囲に及びうるLIPOFECTIN濃度にする。

10

【0624】

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もう一つの試薬は、LIPOFECTAMINE (Invitrogen, カリフォルニア州カールズバッド)である。アンチセンスオリゴヌクレオチドをOPTI-MEM1還元血清培地 (Invitrogen, カリフォルニア州カールズバッド)中でLIPOFECTAMINEと混合することで、所望のアンチセンスオリゴヌクレオチド濃度と、100nMアンチセンスオリゴヌクレオチドあたり2～12μg/mLの範囲に及びうるLIPOFECTAMINE濃度にする。

20

【0625】

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もう一つの技法に、エレクトロポレーションがある。

【0626】

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さらにもう一つの技法に、細胞によるオリゴヌクレオチド自由取り込みがある。

【0627】

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。細胞はアンチセンスオリゴヌクレオチド処理の16～24時間後に収集することができ、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かつ本明細書に記載する方法によって測定される。一般に、複数の複製試料で処理を行う場合は、複製試料処理の平均としてデータを表す。

30

【0628】

使用す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。ある特定細胞株に関して最適なアンチセンスオリゴヌクレオチド濃度を決定するための方法は、当技術分野では周知である。LIPOFECTAMINEによるトランスフェクションの場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には、1nM～300nMの範囲の濃度で使用される。

40

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625nMから20,000nMまでの範囲の濃度で、アンチセンスオリゴヌクレオチドが使用される。

【0629】

RNA単離

RNA分析は、全細胞RNAまたはポリ(A)+mRNAに関して行うことができる。RNA単離の方法は当技術分野ではよく知られている。RNAは当技術分野において周知の方法を使って、例えばTRIZOL試薬 (Invitrogen, カリフォルニア州カールズバッド)を製造者が推奨するプロトコルに従って使用することによって、調製される。

【0630】

50

特定の適応

ここに提供する特定の実施形態は、対象における補体代替経路の調節異常に関連する疾患を、CFBを標的とするアンチセンス化合物などのCFB特異的阻害剤の投与によって処置し、防止し、または改善する方法に関する。

【0631】

ここに提供する方法で処置し、防止し、かつ/または改善することが可能な、補体代替経路の調節異常に関連する腎疾患の例として、C3系球体症、非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)、デンスデポジット病(DDD; II型MPGNまたはC3Nephとも呼ばれている)、及びCFHR5ネフロパシーが挙げられる。

【0632】

ここに提供する方法で処置し、防止し、かつ/または改善することが可能な、補体代替経路の調節異常に関連する他の腎疾患には、IgAネフロパシー;メサンギウム毛細管性(膜性増殖性)系球体腎炎(MPGN);ループス腎炎及び全身性エリテマトーデス(SLE)を含む自己免疫障害;感染誘発性系球体腎炎(感染後系球体腎炎とも呼ばれている);及び腎虚血再灌流傷害、例えば移植後腎虚血再灌流傷害がある。

【0633】

ここに提供する方法で処置しかつ/または防止することが可能な、補体代替経路の調節異常に関連する非腎臓障害の例として、黄斑変性、例えば加齢黄斑変性(AMD)(滲出型AMD及び地図状萎縮などの乾性AMDを含む);視神経脊髄炎;角膜疾患、例えば角膜炎;自己免疫性ぶどう膜炎;及び糖尿病性網膜症などの眼疾患が挙げられる。眼疾患には補体系が関与すると報告されている。Jha P, et al., Mol Immunol (2007) 44(16): 3901 - 3908。ここに提供する方法で処置しかつ/または防止することが可能な、補体代替経路の調節異常に関連する非腎臓障害の他の例には、ANCA関連血管炎、抗リン脂質症候群(抗リン脂質抗体症候群(APS)とも呼ばれている)、喘息、関節リウマチ、重症筋無力症、及び多発性硬化症がある。

【0634】

ここに提供する特定の実施形態は、対象における補体代替経路の調節異常に関連する腎疾患を、CFBを標的とするアンチセンス化合物などのCFB特異的阻害剤の投与によって、処置し、防止し、または改善する方法に関する。特定の態様では、腎疾患がループス腎炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、デンスデポジット病(DDD)、C3系球体腎炎(C3GN)、CFHR5ネフロパシー、もしくは非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)、またはそれらの任意の組み合わせである。

【0635】

ここに提供する特定の実施形態は、対象における加齢黄斑変性(AMD)などの黄斑変性を、CFBを標的とするアンチセンス化合物などのCFB特異的阻害剤の投与によって処置し、防止し、または改善する方法に関する。特定の態様では、AMDが滲出型AMDまたは乾性AMDである。特定の態様では、乾性AMDが地図状萎縮でありうる。補体代替経路の調節異常とAMDとの関連は研究によって実証されている。補体成分は、AMD患者の黄斑に蓄積する細胞外物質である眼ドルーゼの一般的構成要素である。さらにまた、CFH及びCFB変異体は、北欧及び北米におけるAMD症例の75%近くを占めると報告されている。特殊なCFB多型がAMDからの防御を付与することも見いだされている。Patel, N. et al., Eye (2008) 22(6): 768 - 76。加えて、CFBホモ接合ヌルマウスは補体経路活性が低く、レーザー光凝固後に小さな眼病変及び脈絡膜血管新生(CNV)を呈する。Rohrer, B. et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. (2009) 50(7): 3056 - 64。さらにまた、CFB siRNA処置は、レーザー誘発性CNVからマウスを防御する。Bora, NS et al., J Immunol. (2006) 177(3): 1872 - 8。腎臓と眼が共通の発生経路及び構造上の特徴(基底膜コラーゲンIVプロモーター組成及び血管分布を含む)を有することも研究によって示されている。Savige et al., J Am Soc Nephrol. (2011) 22(8):

10

20

30

40

50

1403-15。腎臓疾患と眼疾患に補体経路が関与することの証拠がある。例えば、遺伝性補体調節タンパク質欠損は、非典型溶血性尿毒症症候群及びAMDに対する素因の原因になる。Richards A et al., *Adv Immunol.* (2007) 96:141-77。加えて、慢性腎臓疾患はAMDに関連付けられている。Nitschh, D. et al., *Ophthalmic Epidemiol.* (2009) 16(3):181-6; Choi, J. et al., *Ophthalmic Epidemiol.* (2011) 18(6):259-63。補体代替経路の調節異常に関連する腎臓疾患であるデンスデポジット病(DDD)は、急性腎炎症候群と眼ドルーゼを特徴とする。Cruz and Smith, *GeneReviews* (2007) Jul 20。さらに、補体代替経路の構成要素の遺伝子欠失を保因するマウスでは、腎疾患表現型と眼疾患表現型が共存する。CFHホモ接合ヌルマウスはDDDを発症し、網膜異常及び視覚機能障害を呈すると報告されている。Pickering et al., *Nat Genet.* (2002) 31(4):424-8。補体代替経路の調節異常に関連する腎疾患のマウスモデルは、AMDのモデルとしても受け入れられている。Pennesi ME et al., *Mol Aspects Med* (2012) 33:487-509。例えばCFHヌルマウスはDDDなどの腎疾患とAMDのモデルとして受け入れられている。さらにまた、AMDが補体因子の全身性供給源に関連することも報告されており、これらの補体因子が眼に局所的に蓄積することで代替経路補体活性化を駆動する。Loy et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2012) 53(10):6628-37。

10

20

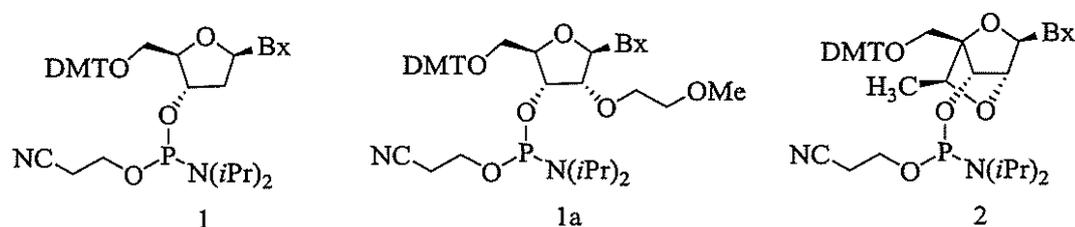
【実施例】

【0636】

以下の実施例は、本開示の特定の実施形態を例証するものであり、限定するものではない。さらに、具体的実施形態を記載する場合、本発明者らは、それらの具体的実施形態の一般的応用を企図している。例えば、ある特定モチーフを有するオリゴヌクレオチドの開示は、そのモチーフまたは同様のモチーフを有する他のオリゴヌクレオチドの合理的裏付けになる。同様に、例えば、ある特定高親和性修飾がある特定位置に見られる場合は、別段の表示がある場合を除き、同じ位置での他の高親和性修飾も好適であるとみなされる。実施例1：ホスホラミダイト(化合物1、1a、及び2)の調製のための一般的方法

【0637】

【化131】



Bxは複素環式塩基である

30

【0638】

化合物1、1a、及び2を、本明細書に記載する当技術分野で周知の手順どおりに調製した(Seth et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, 21(4), 1122-1125, *J. Org. Chem.*, 2010, 75(5), 1569-1581, *Nucleic Acids Symposium Series*, 2008, 52(1), 553-554)、ならびに公開されたPCT国際出願(国際公開第WO2011/115818号、同第WO2010/077578号、同第WO2010/036698号、同第WO2009/143369号、同第WO2009/006478、及び同第WO2007/090071号)、ならびに米国特許第7,569,686号も参照のこと)。

40

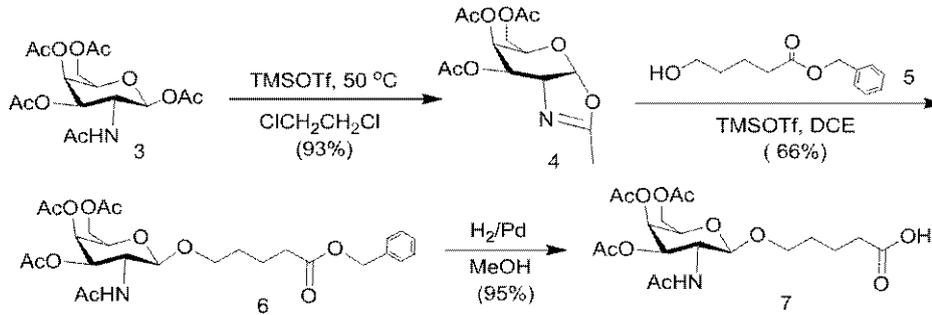
【0639】

50

実施例 2 : 化合物 7 の調製

【 0 6 4 0 】

【 化 1 3 2 】



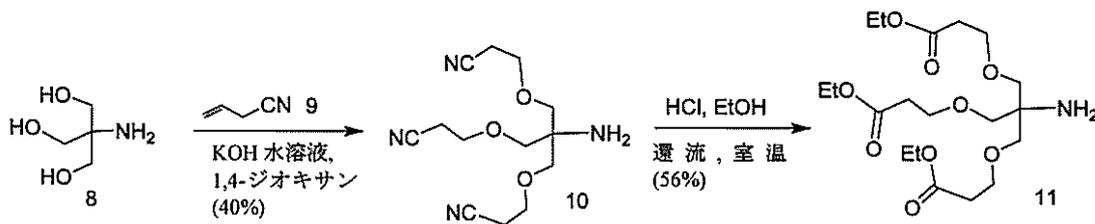
10

化合物 3 (2 - アセトアミド - 1 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - アセチル - 2 - デオキシ - D ガラクトピラノースまたはガラクトサミンペンタアセテート) は、市販のものである。化合物 5 を公開された手順 (Weber et al . , J . Med . Chem . , 1991 , 34 , 2692) に従って調製した。

実施例 3 : 化合物 11 の調製

【 0 6 4 1 】

【 化 1 3 3 】



20

【 0 6 4 2 】

化合物 8 及び 9 は、市販のものである。

実施例 4 : 化合物 18 の調製

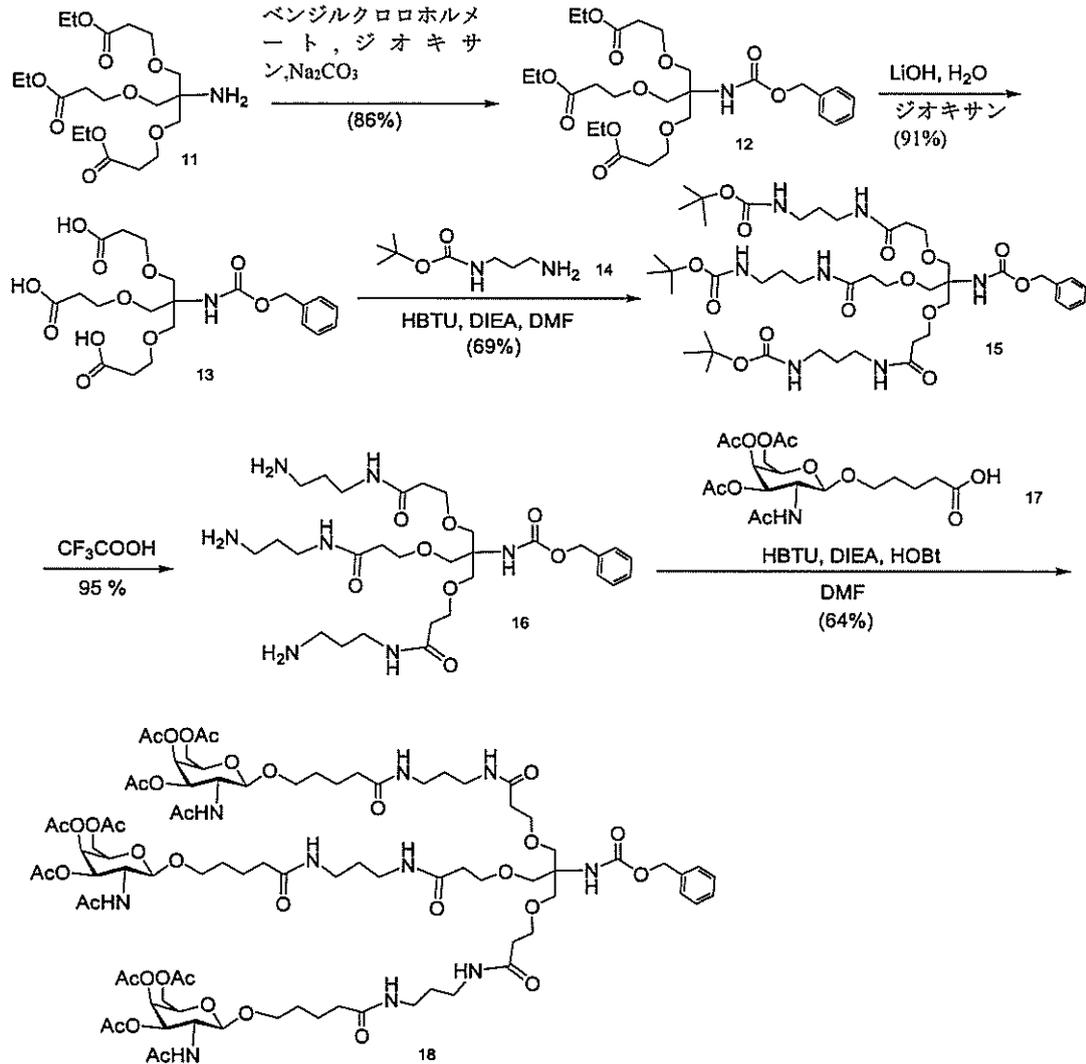
【 0 6 4 3 】

30

40

50

【化134】



10

20

30

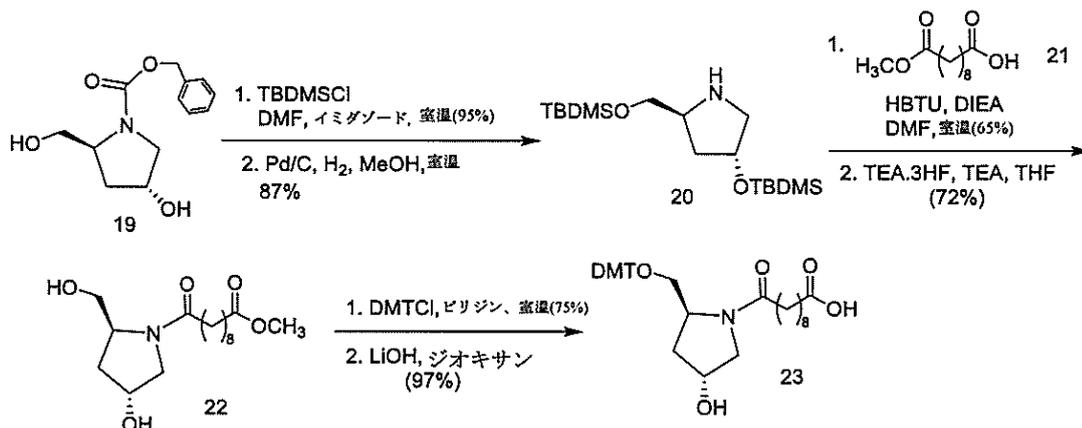
【0644】

化合物11を実施例3に例証される手順どおりに調製した。化合物14は、市販のものである。化合物17を、Rensen et al. (J. Med. Chem., 2004, 47, 5798-5808) によって報告された同様の手順を用いて調製した。

実施例5：化合物23の調製

【0645】

【化135】



40

50

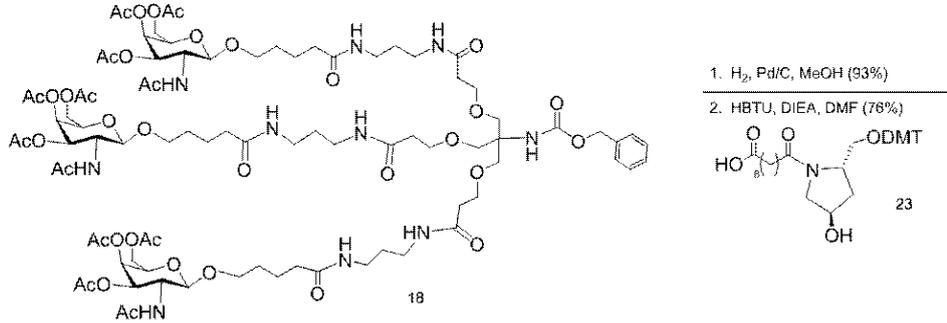
【 0 6 4 6 】

化合物 1 9 及び 2 1 は、市販のものである。

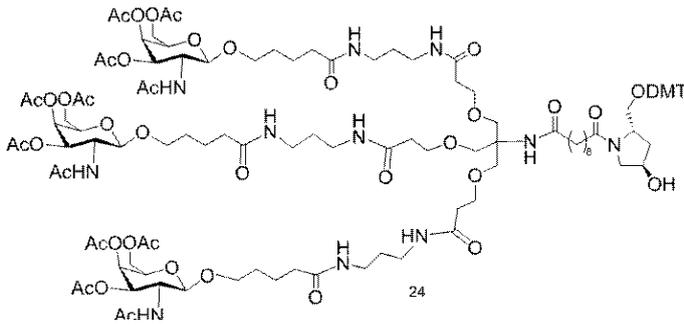
実施例 6：化合物 2 4 の調製

【 0 6 4 7 】

【 化 1 3 6 】



10



20

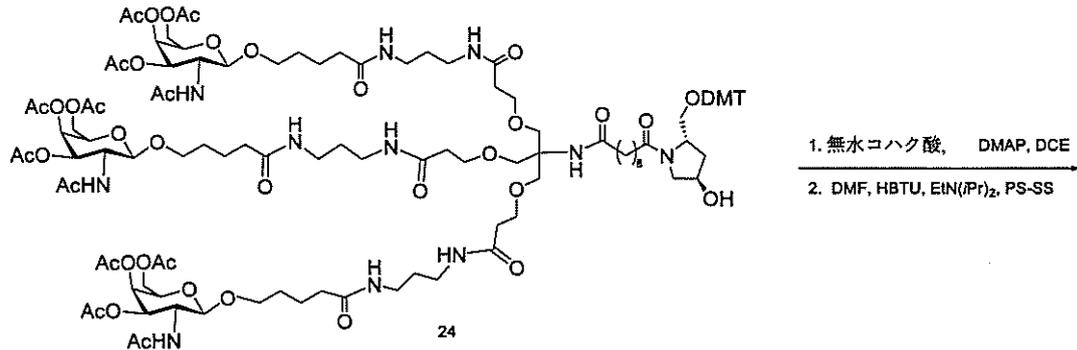
【 0 6 4 8 】

化合物 1 8 及び 2 3 を実施例 4 及び 5 に例証される手順どおりに調製した。

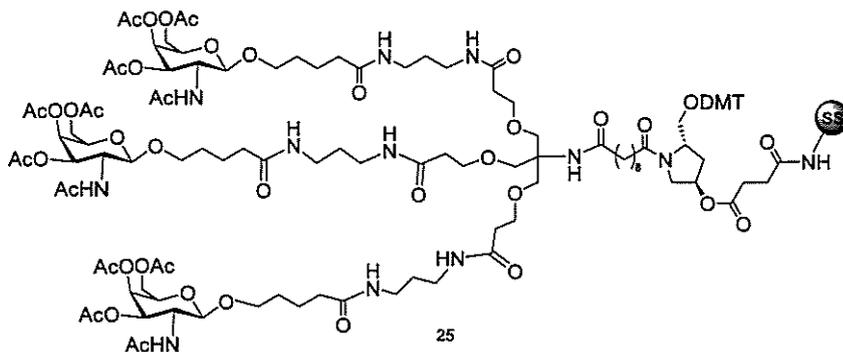
実施例 7：化合物 2 5 の調製

【 0 6 4 9 】

【 化 1 3 7 】



30



40

【 0 6 5 0 】

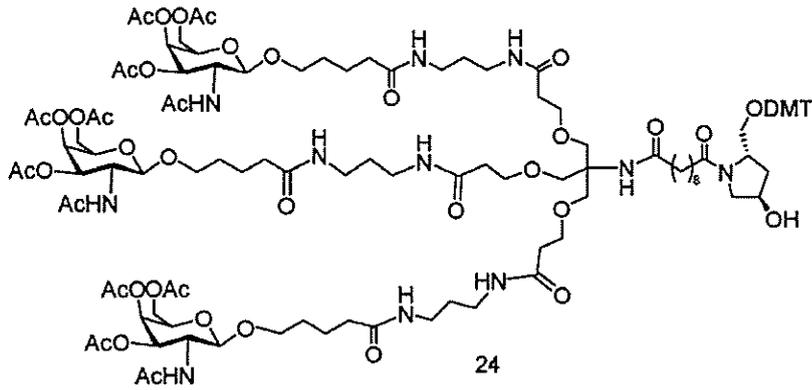
50

化合物 24 を実施例 6 に例証される手順どおりに調製した。

実施例 8 : 化合物 26 の調製

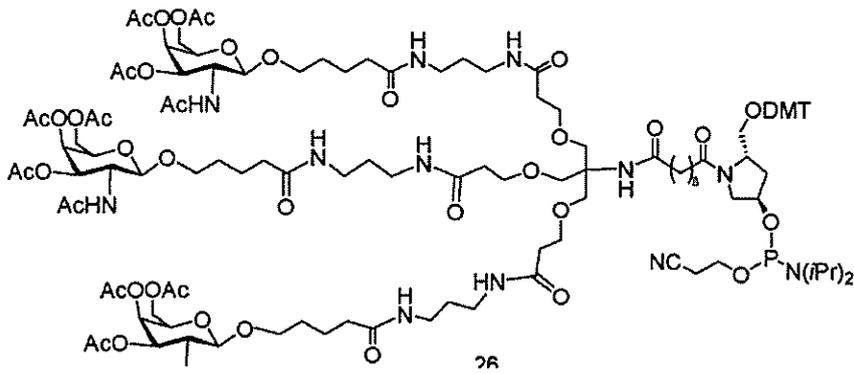
【 0 6 5 1 】

【 化 1 3 8 】



ホスフィチル化

10



20

【 0 6 5 2 】

化合物 24 を実施例 6 に例証される手順どおりに調製する。

実施例 9 : 3' 末端に GalNAc₃-1 を含む共役 ASO (化合物 29) の一般的調製

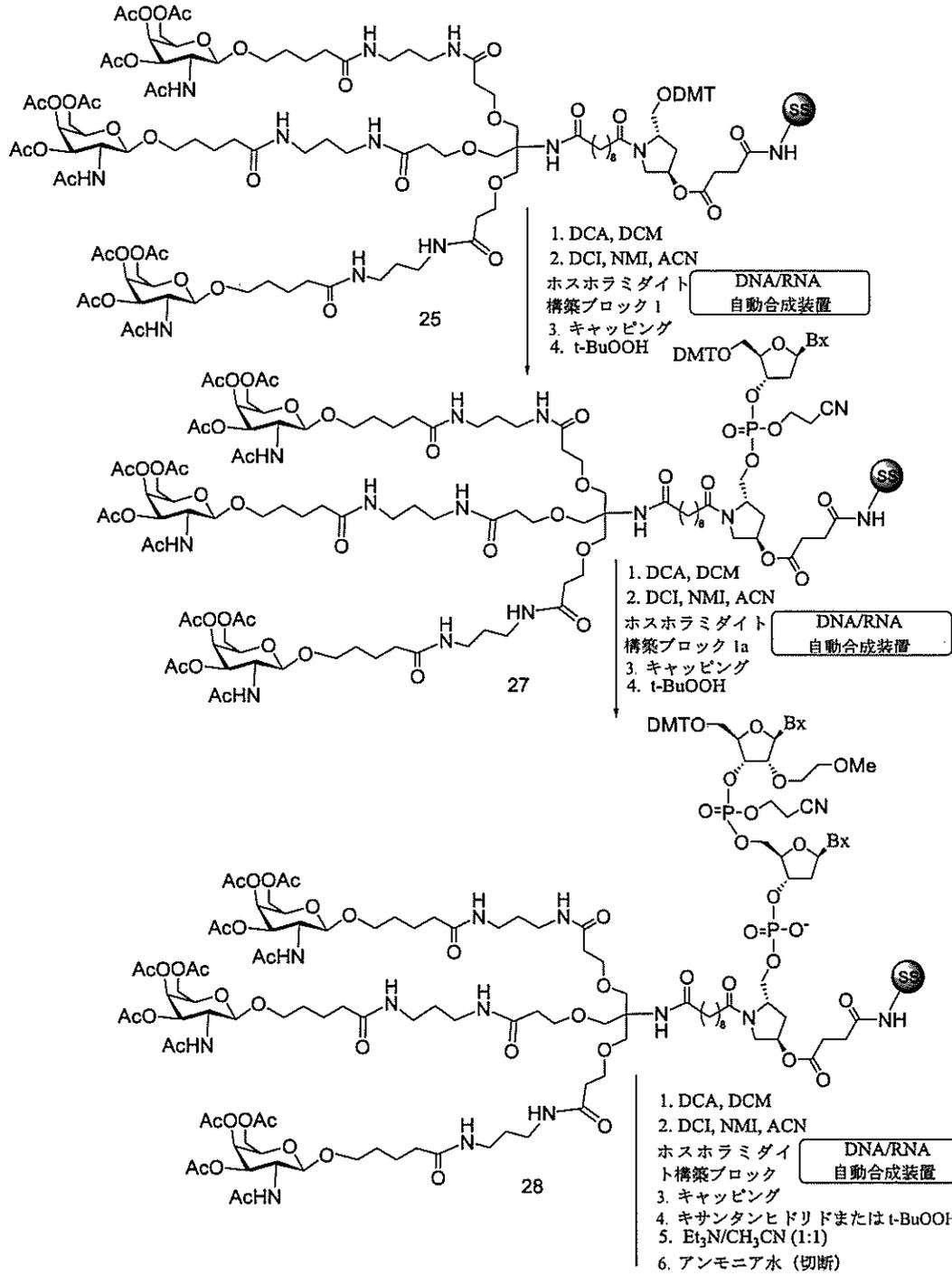
30

【 0 6 5 3 】

40

50

【化 1 3 9】



10

20

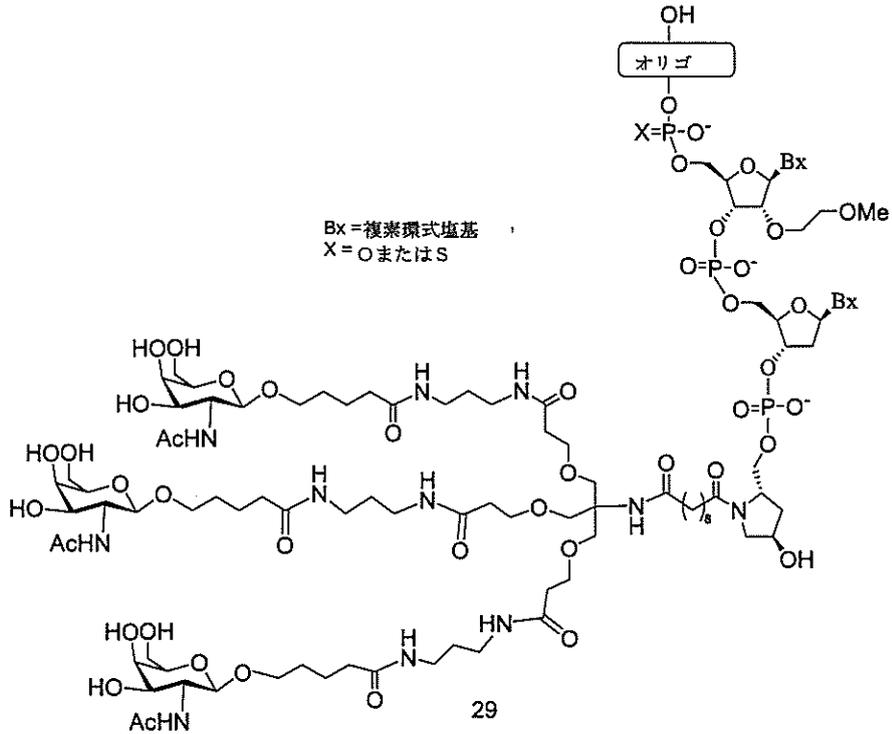
30

40

【 0 6 5 4】

50

【化140】



10

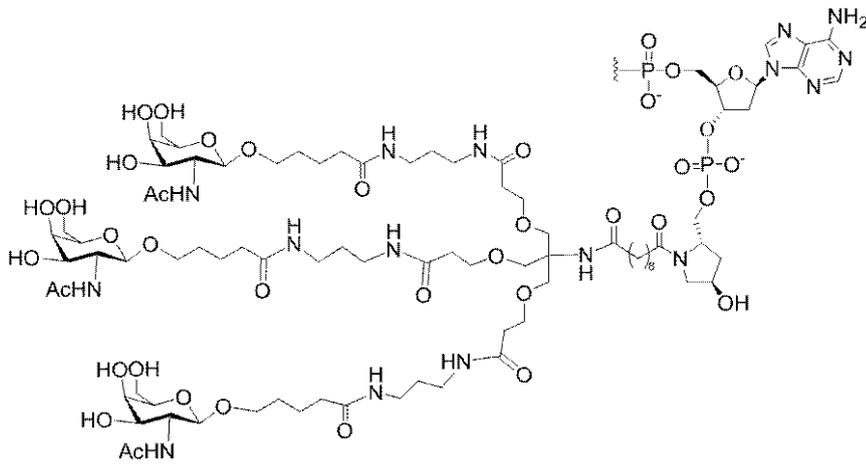
20

【0655】

保護されたGalNAc₃-1は以下の構造を有する。

【0656】

【化141】



30

【0657】

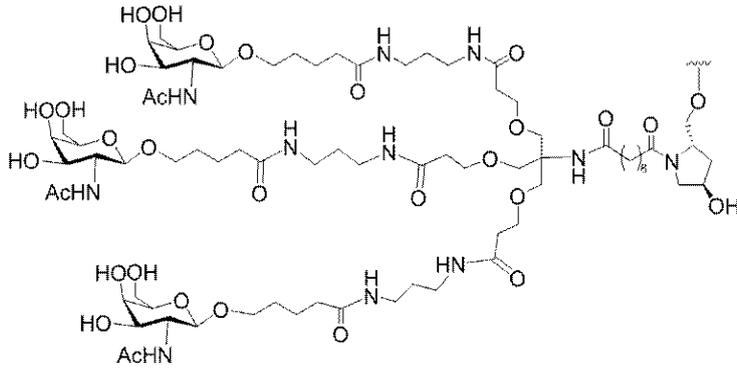
共役基GalNAc₃-1 (GalNAc₃-1_a)のGalNAc₃クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。GalNAc₃-1_aは、以下の式を有する。

【0658】

40

50

【化 1 4 2】



10

【 0 6 5 9】

固体支持体に結合された保護GalNAc₃-1(化合物25)を実施例7に例証される手順どおりに調製した。3'末端にGalNAc₃-1を含むオリゴマー化合物29を、自動DNA/RNA合成における標準的手順を用いて調製した(Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627を参照のこと)。ホスホラミダイト構築ブロック(化合物1及び1a)を実施例1に例証される手順どおりに調製した。他のホスホラミダイト構築ブロックを用いて既定の配列及び組成を有するオリゴマー化合物を調製することができるため、例証されるホスホラミダイトは、代表的なものであり、限定する意図はない。固体支持体に添加されるホスホラミダイトの順序及び量を調整して、本明細書に記載するギャプトオリゴマー化合物を調製することができる。そのようなギャプトオリゴマー化合物は、任意の所与の標的によって指示される既定の組成及び塩基配列を有しうる。

20

実施例10: 5'末端にGalNAc₃-1を含む共役ASO(化合物34)の一般的調製

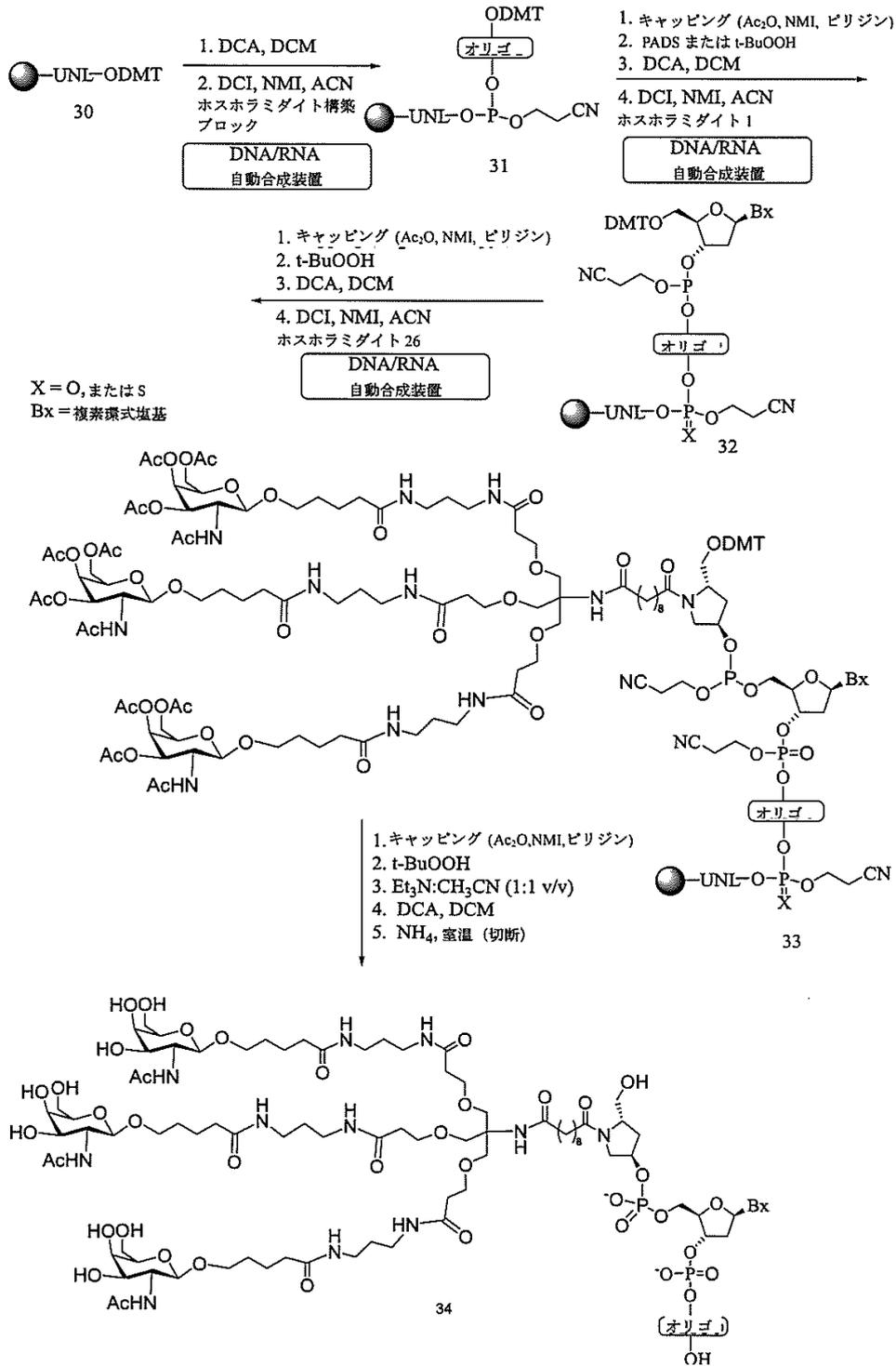
【 0 6 6 0】

30

40

50

【化 1 4 3】



10

20

30

40

【 0 6 6 1】

Uny linker (商標) 30は、市販のものである。5'末端にGalNAc₃-1クラスターを含むオリゴマー化合物34を、自動DNA/RNA合成における標準の手順を用いて調製する(Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627を参照のこと)。ホスホラミダイト構築ブロック(化合物1及び1a)を実施例1に例証される手順どおりに調製した。他のホスホラミダイト構築ブロックを用いて既定の配列及び組成を有するオリゴマー化合物を調製することができるため、例証されるホスホラミダイトは、代表的なものであり、限定する意図はない。固体支持体に添加されるホスホラミダイトの順序及び量を調整して、本明細書に

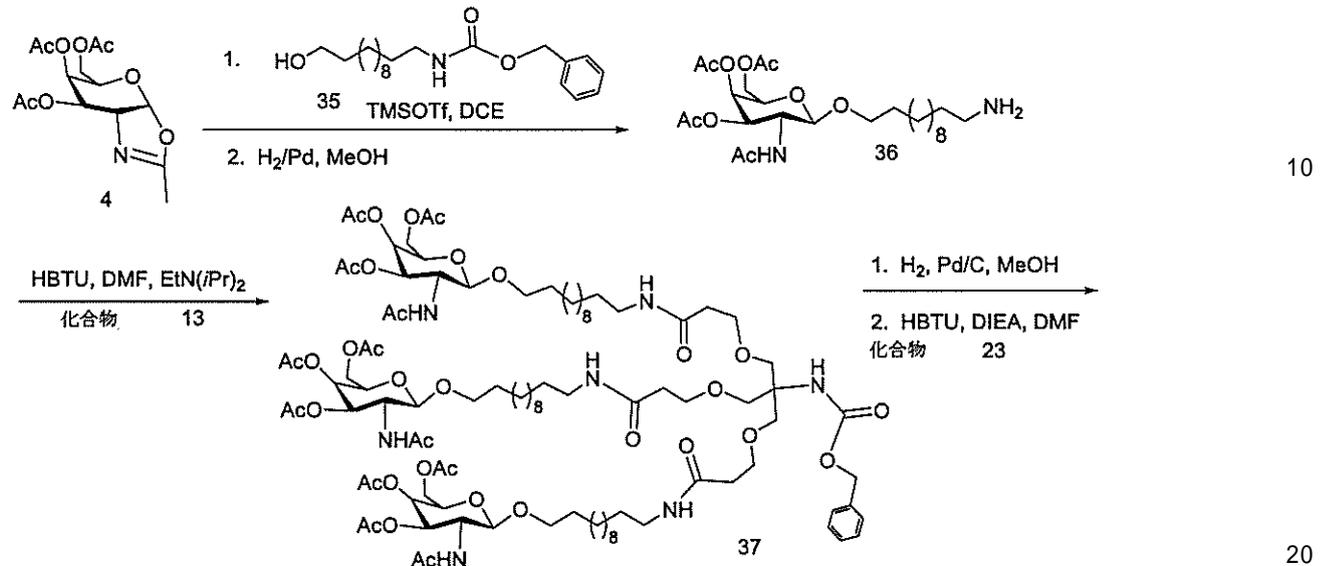
50

記載するギャプトオリゴマー化合物を調製することができる。そのようなギャプトオリゴマー化合物は、任意の所与の標的によって決まる既定の組成及び塩基配列を有する。

実施例 11：化合物 39 の調製

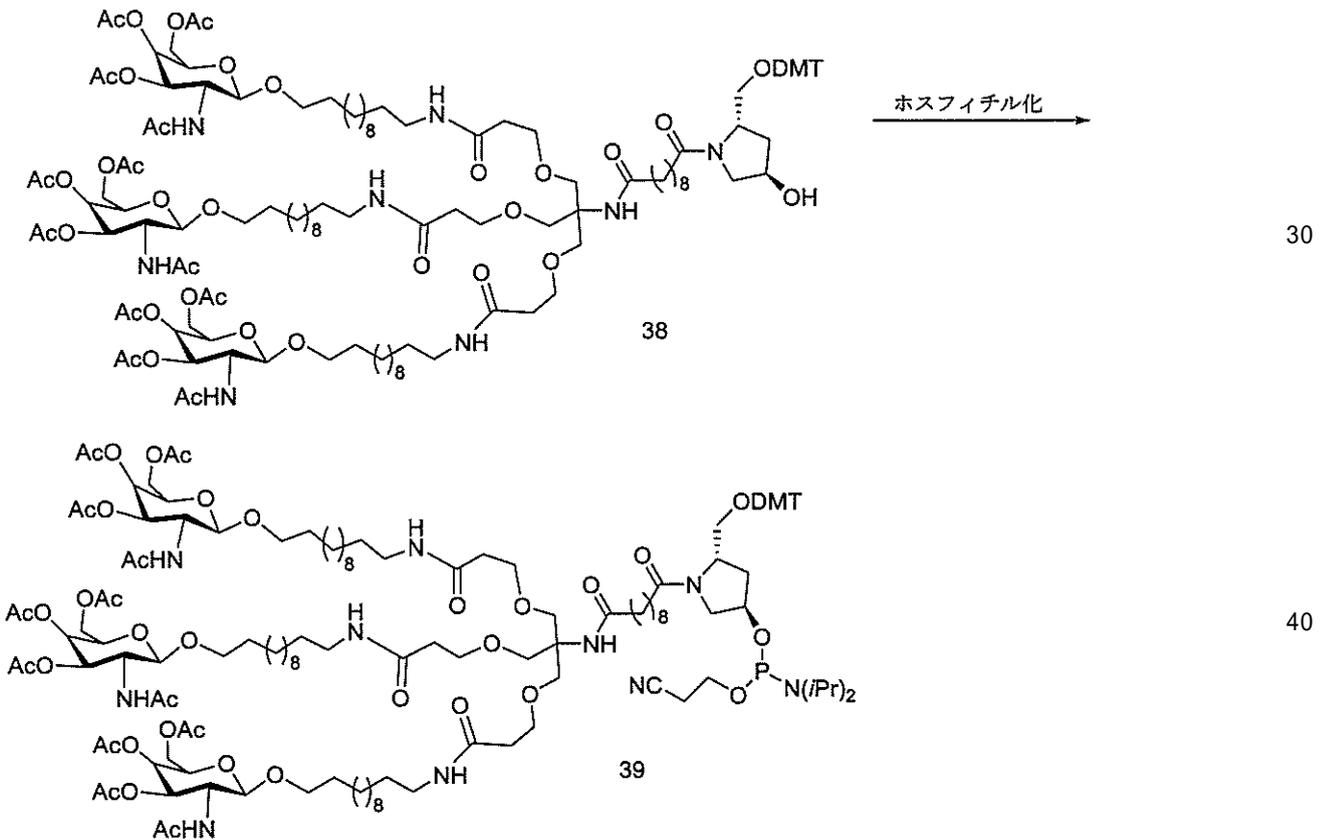
【 0 6 6 2 】

【 化 1 4 4 】



【 0 6 6 3 】

【 化 1 4 5 】



【 0 6 6 4 】

化合物 4、13、及び 23 を実施例 2、4、及び 5 に例証される手順どおりに調製した。

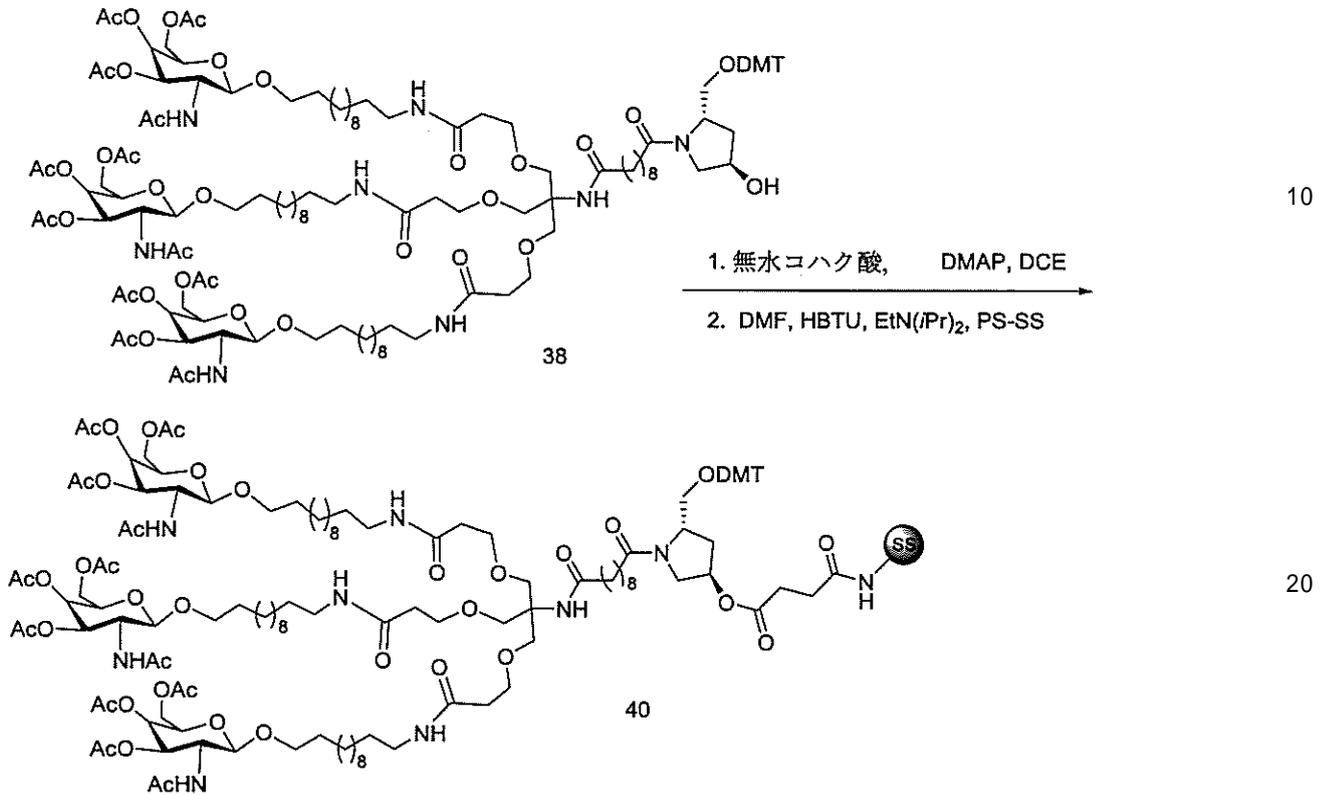
化合物 35 を Rouchaud et al., Eur. J. Org. Chem., 201

1, 12, 2346 - 2353 に公開された同様の手順を用いて調製する。

実施例 12 : 化合物 40 の調製

【 0 6 6 5 】

【 化 1 4 6 】



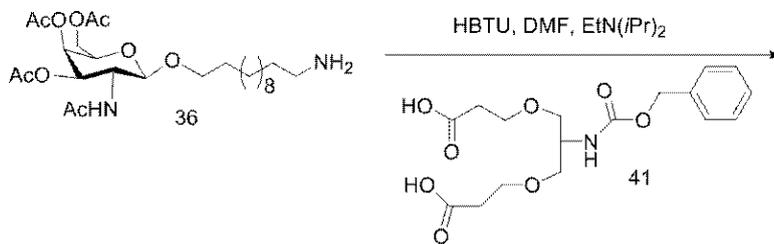
【 0 6 6 6 】

化合物 38 を実施例 11 に例証される手順どおりに調製する。

実施例 13 : 化合物 44 の調製

【 0 6 6 7 】

【 化 1 4 7 】



【 0 6 6 8 】

10

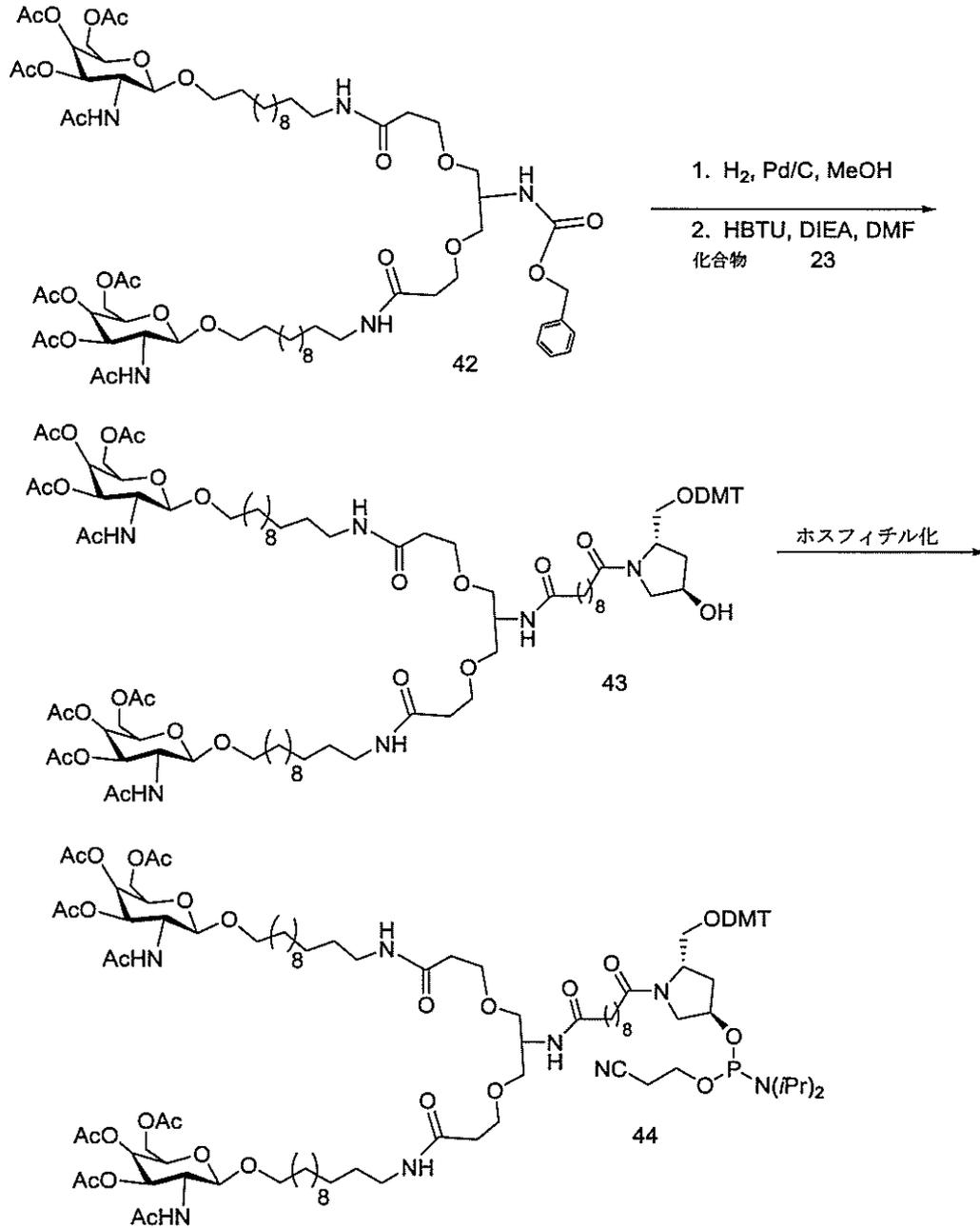
20

30

40

50

【化 1 4 8】



10

20

30

【 0 6 6 9】

化合物 2 3 及び 3 6 を実施例 5 及び 1 1 に例証される手順どおりに調製する。化合物 4 1 を、国際公開第 WO 2 0 0 9 0 8 2 6 0 7 号に公開された同様の手順を用いて調製する。

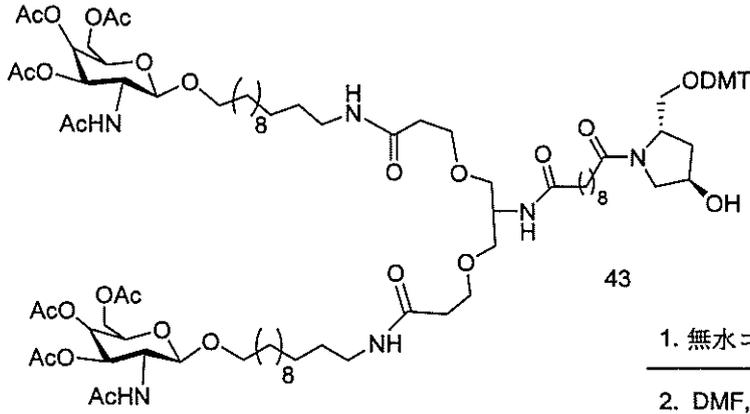
実施例 1 4 : 化合物 4 5 の調製

【 0 6 7 0】

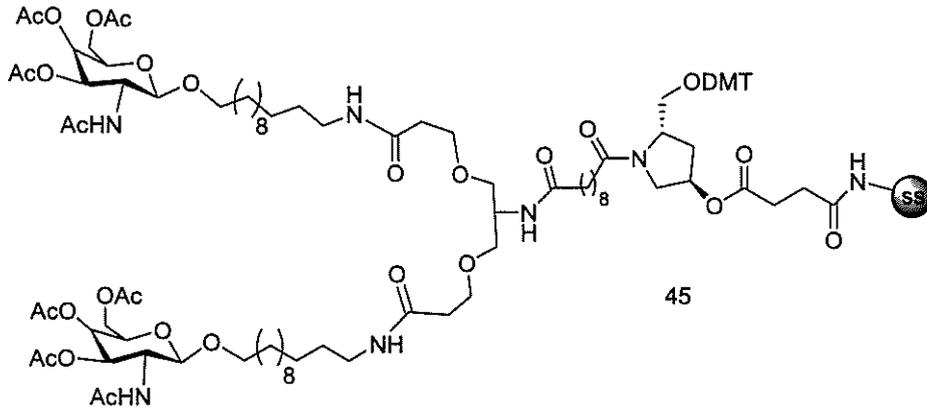
40

50

【化 1 4 9】



10



20

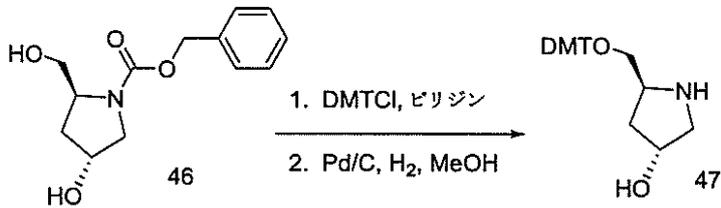
【 0 6 7 1】

化合物 4 3 を実施例 1 3 に例証される手順どおりに調製する。

実施例 1 5 : 化合物 4 7 の調製

【 0 6 7 2】

【化 1 5 0】



30

【 0 6 7 3】

化合物 4 6 は、市販のものである。

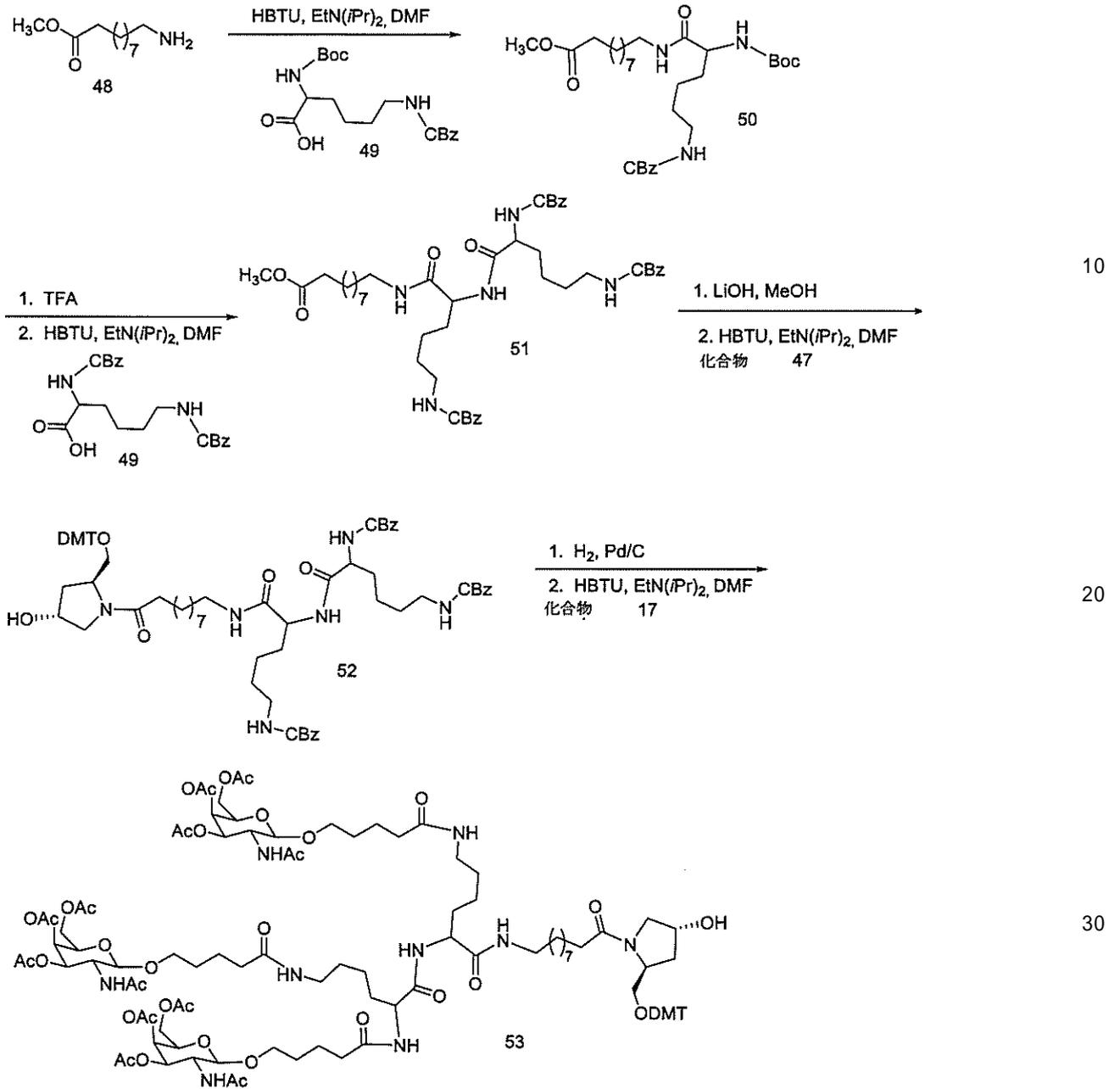
実施例 1 6 : 化合物 5 3 の調製

【 0 6 7 4】

40

50

【化 1 5 1】



【 0 6 7 5 】

化合物 4 8 及び 4 9 は、市販のものである。化合物 1 7 及び 4 7 を実施例 4 及び 1 5 に例証される手順どおりに調製する。

実施例 1 7 : 化合物 5 4 の調製

【 0 6 7 6 】

10

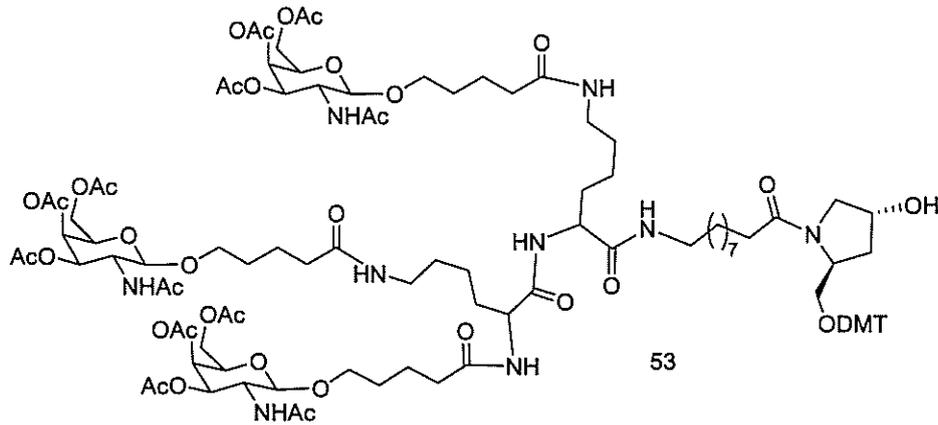
20

30

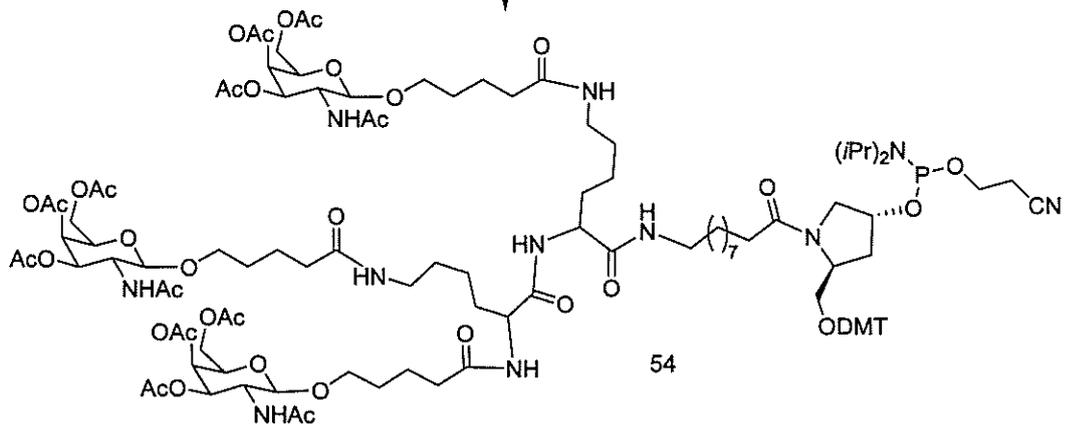
40

50

【化 1 5 2】



ホスフィチル化



【 0 6 7 7 】

化合物 5 3 を実施例 1 6 に例証される手順どおりに調製する。

実施例 1 8 : 化合物 5 5 の調製

【 0 6 7 8 】

10

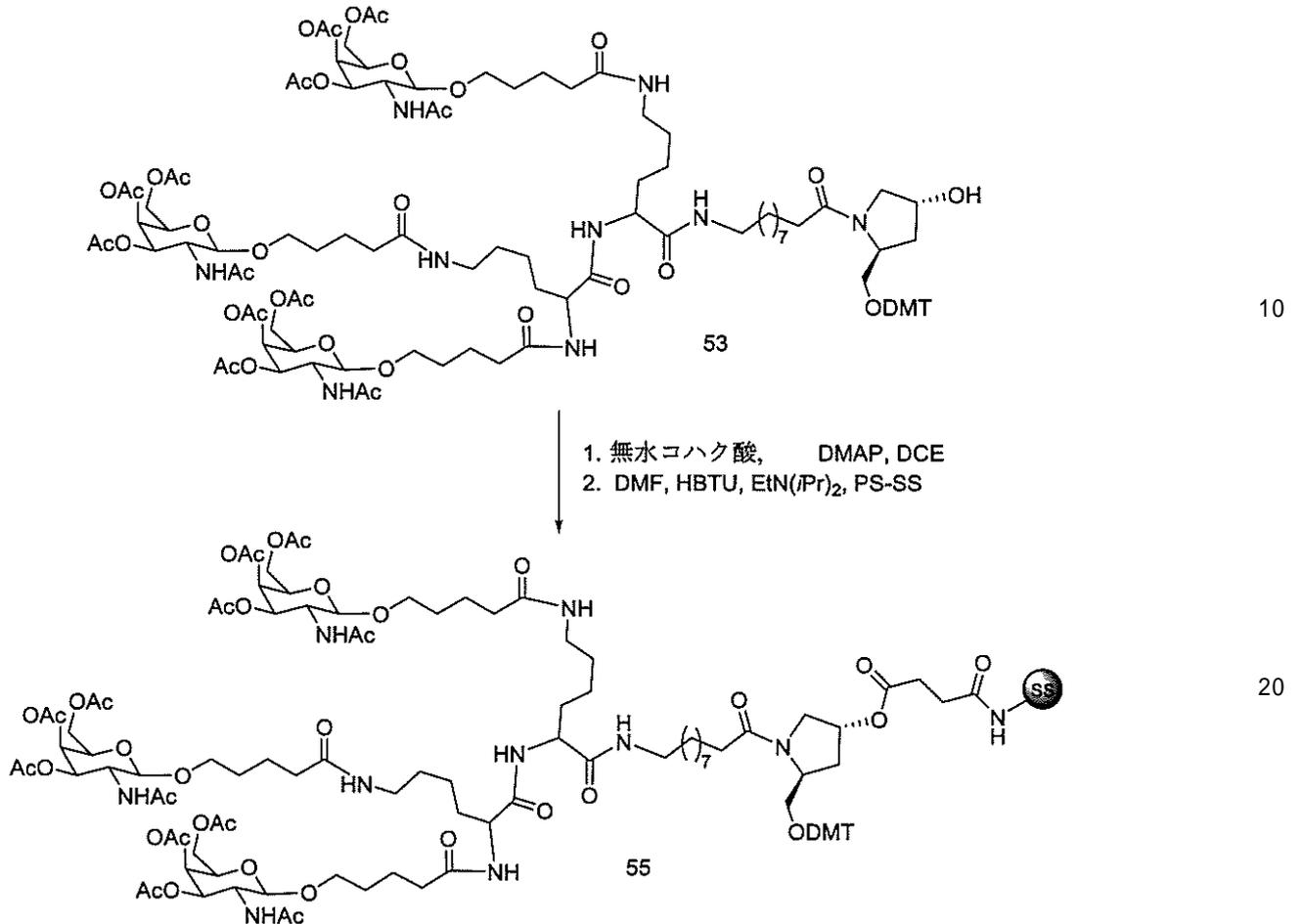
20

30

40

50

【化 1 5 3】



【 0 6 7 9】

化合物 5 3 を実施例 1 6 に例証される手順どおりに調製する。

実施例 1 9 : 固相技法による 3' 位に GalNAc₃-1 を含む共役 ASO の調製のための一般的な方法 (ISIS 6 4 7 5 3 5、6 4 7 5 3 6、及び 6 5 1 9 0 0 の調製)

【 0 6 8 0】

別段の明示がある場合を除き、オリゴマー化合物の合成に用いるすべての試薬及び溶液を商業的供給源から購入する。標準のホスホラミダイト構築ブロック及び固体支持体を、例えば、T、A、G、及び mC 残基を含む、ヌクレオシド残基の組み込みのために用いる。無水アセトニトリル中のホスホラミダイトの 0.1 M 溶液を b-D-2'-デオキシリボヌクレオシド及び 2'-MOE に用いた。

【 0 6 8 1】

カラムに充填した GalNAc₃-1 負荷 VIMAD 固体支持体 (110 μmol/g、Guzaeve et al., 2003) でのホスホラミダイトカップリング法により、ASO 合成を、ABI 394 合成装置 (1~2 μmol の規模) または GE Healthcare Bioscience AeKTA オリゴパイロット合成装置 (40~200 μmol の規模) で実行した。このカップリングステップでは、固体支持体の負荷量に対して 4 倍量のホスホラミダイトを送達し、ホスホラミダイト縮合を 10 分間行った。他のすべてのステップは、製造業者から提供された標準のプロトコルに従った。トルエン中の 6% ジクロロ酢酸溶液を用いて、ヌクレオチドの 5'-ヒドロキシル基からジメチルトリチル (DMT) 基を除去した。カップリングステップ中、無水 CH₃CN 中の 4,5-ジシアノイミダゾール (0.7 M) を活性化剤として用いた。ホスホロチオエート連結部を、3 分間の接触時間で、1:1 のピリジン/CH₃CN 中のキサンタンヒドリドの 0.1 M 溶液による硫化によって導入した。6% の水を含む CH₃CN 中の 20% の tert-

10

20

30

40

50

ブチルヒドロペルオキシドの溶液を酸化剤として用いて、12分間の接触時間で、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部を得た。

【0682】

所望の配列が構築された後、シアノエチルホスフェート保護基を、45分間の接触時間で、トリエチルアミンとアセトニトリルの1:1(v/v)の混合物を用いて脱保護した。固体支持体に結合されたASOをアンモニア水(28~30重量%)中に懸濁し、55で6時間加熱した。

【0683】

その後、非結合型ASOを濾過し、アンモニアを沸去した。残渣を強アニオン交換カラムでの高圧液体クロマトグラフィーによって精製した(GE Healthcare Bioscience, Source 30Q、30 μ m、2.54 \times 8cm、A=30%CH₃CN水溶液中100mM酢酸アンモニウム、B=A中1.5M NaBr、6分後0~40%のB、流量14mL/分-1、 λ =260nm)。残渣を逆相カラムでのHPLCにより脱塩して、固体支持体への初期負荷量に基づいて15~30%の単離収率で所望のASOを得た。ASOを、Agilent 1100 MSDシステムを用いたイオン対HPLC/MS分析によって特徴付けた。

10

【0684】

当技術分野で周知の標準のオリゴヌクレオチド合成手順を用いて共役体を含まないアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成した。

【0685】

これらの方法を用いて、ApoC IIIを標的とする3個の別個のアンチセンス化合物を調製した。以下の表17に要約されるように、ApoC IIIを標的とする3個のアンチセンス化合物のそれぞれは、同一の核酸塩基配列を有し、ISIS 304801は、すべてがホスホロチオエート連結部である5-10-5MOEギャップマーであり、ISIS 647535は、GalNAc₃-1をその3'末端で共役させたことを除いて、ISIS 304801と同一であり、ISIS 647536は、その化合物の特定のヌクレオシド間連結部がホスホジエステル連結部であることを除いて、ISIS 647535と同一であった。表17にさらに要約されるように、SRB-1を標的とする2つの別個のアンチセンス化合物を合成した。ISIS 440762は、すべてがホスホロチオエートヌクレオシド間連結部である2-10-2 cEtギャップマーであり、ISIS 651900は、その3'末端にGalNAc₃-1を含めたことを除いて、ISIS 440762と同一であった。

20

【0686】

30

40

50

【表 2】

表 1 7

ApoC III及びSRB-1を標的とする修飾ASO

ASO	配列(5'から3')	標的	計算された質量	観察された質量	配列番号
ISIS 30480 1	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	7165.4	7164.4	821
ISIS 64753 5	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	ApoC III	9239.5	9237.8	822
ISIS 64753 6	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	ApoC III	9142.9	9140.8	822
ISIS 44076 2	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	SRB-1	4647.0	4646.4	823
ISIS 65190 0	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	SRB-1	6721.1	6719.4	824

10

20

【0687】

下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「k」は、6'-(S)-CH₂二環式ヌクレオシド(例えば、cet)を示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部(PS)を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部(PO)を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。上付き文字「m」は、5-メチルシトシンを示す。「GalNAc₃-1」は、先の実施例9に示された構造を有する共役基を示す。GalNAc₃-1が、ASOを共役体の残りの部分に連結させる切断可能なアデノシンを含み、「GalNAc₃-1_a」と指定されることに留意されたい。上述の表ではこの命名法を用いて、共役体の一部であるアデノシンを含む全核酸塩基配列を示す。したがって、上述の表において、「Ado」を省略して「GalNAc₃-1」で終了する配列を列記することもできる。下付き文字「a」を用いて切断可能なヌクレオシドまたは切断可能部分を欠く共役基の部分を示すこの慣例をこれらの実施形態の全体を通して用いる。切断可能部分を欠く共役基のこの部分は、本明細書において「クラスター」または「共役クラスター」または「GalNAc₃クラスター」と称される。特定の事例において、これは、そのクラスター及びその切断可能部分を別々に提供することによって共役基を説明するのに好都合である。

30

実施例20: huApoC IIIトランスジェニックマウスにおけるヒトApoC IIIの用量依存的アンチセンス阻害

40

【0688】

それぞれヒトApoC IIIを標的とし、かつ上に記載されるISIS 304801及びISIS 647535を別々に試験し、用量依存的試験において、ヒトApoC IIIトランスジェニックマウスにおけるヒトApoC IIIを阻害するそれらの能力について評価した。

処理

【0689】

ヒトApoC IIIトランスジェニックマウスを12時間の明暗周期で維持し、Teklad実験食餌を不断給餌した。実験開始前に動物を研究施設で少なくとも7日間順化させ

50

た。ASOをPBS中に調製し、0.2ミクロンのフィルターを通して濾過して滅菌した。注入のためにASOを0.9%PBS中に溶解した。

【0690】

ヒトApoC IIIトランスジェニックマウスに、ISIS 304801もしくは647535を、0.08、0.25、0.75、2.25、もしくは6.75 μmol/kgで、または対照としてPBSを、週1回2週間、腹腔内に注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終用量の投与から48時間後に血液を各マウスから採取し、マウスを殺し、組織を収集した。

ApoC III mRNA分析

【0691】

標準のプロトコルに従ってリアルタイムPCR及びRIBOGREEN(登録商標)RNA定量化試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いてマウスの肝臓におけるApoC III mRNAレベルを決定した。PBS処理対照に対して標準化する前に(Ribogreenを用いて)ApoC III mRNAレベルを全RNAとの比較で相対的に決定した。以下の結果は、PBS処理対照に対して標準化された各処理群のApoC III mRNAレベルの平均パーセントとして提示され、「%PBS」で表示される。各ASOの半数効果濃度(ED50)も以下の表18に示される。

【0692】

例証されるように、PBS対照と比較して、両方のアンチセンス化合物がApoC III RNAを減少させた。さらに、GalNAc3-1に共役されるアンチセンス化合物(ISIS 647535)は、GalNAc3-1共役体を欠くアンチセンス化合物(ISIS 304801)よりもはるかに強力であった。

【0693】

【表3】

表18

ヒトApoC IIIトランスジェニックマウスにおけるApoC III mRNAレベルへのASO処理の影響

ASO	用量 (μmol/kg)	%PBS	ED ₅₀ (μmol/kg)	3'共役体	ヌクレオシド間連結部/長さ	配列番号
PBS	0	100	--	-	--	
ISIS 304801	0.08	95	0.77	なし	PS/20	821
	0.75	42				
	2.25	32				
	6.75	19				
ISIS 647535	0.08	50	0.074	GalNAc ₃ -1	PS/20	822
	0.75	15				
	2.25	17				
	6.75	8				

ApoC IIIタンパク質分析(比濁アッセイ)

【0694】

2013年3月29日の出版前にオンラインで公開されたGraham et al(Circulation Research)によって報告された手順を用いて、血漿ApoC IIIタンパク質分析を行った。

【0695】

マウスから単離した約100 μLの血漿を、希釈することなく、Olympus臨床分析器及び市販の比濁ApoC IIIアッセイ(Kamiya、カタログ番号KAI-00

10

20

30

40

50

6、Kamiya Biomedical, Seattle, WA)を用いて分析した。アッセイプロトコルを供給業者が説明するとおりに実行した。

【0696】

以下の表19に示されるように、PBS対照と比較して、両方のアンチセンス化合物がApoC IIIタンパク質を減少させた。さらに、GalNAc₃-1に共役されるアンチセンス化合物(ISIS 647535)は、GalNAc₃-1共役体を欠くアンチセンス化合物(ISIS 304801)よりもはるかに強力であった。

【0697】

【表4】

表19

ヒトApoC IIIトランスジェニックマウスにおけるApoC III血漿タンパク質レベルへのASO処理の影響

ASO	用量 (μmol/kg)	%PBS	ED ₅₀ (μmol/kg)	3'共役体	ヌクレオシド間連結部/長さ	配列番号
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0.08	86	0.73	なし	PS/20	821
	0.75	51				
	2.25	23				
	6.75	13				
ISIS 647535	0.08	72	0.19	GalNAc ₃ -1	PS/20	822
	0.75	14				
	2.25	12				
	6.75	11				

【0698】

血漿トリグリセリド及びコレステロールを、Bligh and Dyerの方法(Bligh, E. G. and Dyer, W. J. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917, 1959)(Bligh, E and Dyer, W, Can J Biochem Physiol, 37, 911-917, 1959)(Bligh, E and Dyer, W, Can J Biochem Physiol, 37, 911-917, 1959)を用いて抽出し、Beckmann Coulter臨床分析器及び市販の試薬を用いて測定した。

【0699】

トリグリセリドレベルを、PBSを注入したマウスとの比較で相対的に測定し、「%PBS」で表示する。結果が表20に提示される。例証されるように、両方のアンチセンス化合物がトリグリセリドレベルを低下させた。さらに、GalNAc₃-1に共役されるアンチセンス化合物(ISIS 647535)は、GalNAc₃-1共役体を欠くアンチセンス化合物(ISIS 304801)よりも実質的にはるかに強力であった。

【0700】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 2 0

トランスジェニックマウスにおけるトリグリセリドレベルへのASO処理の影響

ASO	用量 (μ mol/kg)	%PBS	ED ₅₀ (μ mol/kg)	3'共役体	ヌクレオシド間連結部/長さ	配列番号
PBS	0	100	--	--	--	
ISIS 304801	0.08	87	0.63	なし	PS/20	821
	0.75	46				
	2.25	21				
	6.75	12				
ISIS 647535	0.08	65	0.13	GalNAc ₃ -1	PS/20	822
	0.75	9				
	2.25	8				
	6.75	9				

10

【 0 7 0 1 】

血漿試料をHPLCによって分析して、総コレステロールの量及びコレステロールの異なる画分(HDL及びLDL)の量を決定した。結果が表21及び22に提示される。例証されるように、両方のアンチセンス化合物が総コレステロールレベルを低下させ、LDLを低下させ、HDLを上昇させた。さらに、GalNAc₃-1に共役されるアンチセンス化合物(ISIS 647535)は、GalNAc₃-1共役体を欠くアンチセンス化合物(ISIS 304801)よりも実質的にはるかに強力であった。HDLレベルの増加及びLDLレベルの減少は、ApoC IIIのアンチセンス阻害の心臓血管の有益な影響である。

20

【 0 7 0 2 】

【表 6】

表 2 1

トランスジェニックマウスにおける総コレステロールレベルへのASO処理の影響

ASO	用量 (μ mol/kg)	総コレステロール (mg/dL)	3'共役体	ヌクレオシド間連結部/長さ	配列番号
PBS	0	257	--	--	
ISIS 304801	0.08	226	なし	PS/20	821
	0.75	164			
	2.25	110			
	6.75	82			
ISIS 647535	0.08	230	GalNAc ₃ -1	PS/20	822
	0.75	82			
	2.25	86			
	6.75	99			

30

40

【 0 7 0 3 】

50

【表 7】

表 2 2

トランスジェニックマウスにおけるHDL及びLDLコレステロールレベルへのASO処理の影響

ASO	用量 (μ mol/kg)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	3'共役体	ヌクレオシド間連結部/長さ	配列番号
PBS	0	17	28	--	--	
ISIS 304801	0.08	17	23	なし	PS/20	821
	0.75	27	12			
	2.25	50	4			
	6.75	45	2			
ISIS 647535	0.08	21	21	GalNAc ₃ -1	PS/20	822
	0.75	44	2			
	2.25	50	2			
	6.75	58	2			

10

薬物動態分析 (PK)

20

【0704】

ASOのPKも評価した。肝臓及び腎臓試料を切り刻み、標準のプロトコルを用いて抽出した。試料をIP-HPLC-MSを利用するMSD1で分析した。全長ISIS 304801及び647535の組織レベル(μ g/g)を測定し、結果が表23に提供される。例証されるように、総全長アンチセンス化合物の肝臓濃度は、これら2つのアンチセンス化合物と同様であった。したがって、GalNAc₃-1共役アンチセンス化合物が肝臓でより活性であるが(上のRNA及びタンパク質データによって実証されるように)、肝臓内で著しく高い濃度では存在しない。実際には、計算されたEC50(表23に提供される)は、共役化合物の力価の観察された増加が蓄積の増加に完全に起因するわけではないことを裏付ける。この結果は、共役体が、肝臓蓄積単独以外の機構によって、おそらくアンチセンス化合物の細胞への生産的な取り込みを改善することによって、力価を改善したことを示唆する。

30

【0705】

結果は、腎臓におけるGalNAc₃-1共役アンチセンス化合物の濃度が、GalNAc共役体を欠くアンチセンス化合物の濃度よりも低いことも示す。これは、いくつかの有益な治療的意味を有する。腎臓における活性が要求されない治療的指標において、腎臓への曝露は、腎毒性の危険性を有し、それに見合う利益がない。さらに、腎臓における高濃度は、典型的には、尿への化合物の損失をもたらし、より迅速なクリアランスをもたらす。したがって、非腎臓標的の場合、腎臓蓄積は望ましくない。これらのデータは、GalNAc₃-1共役が腎臓蓄積を減少させることを示唆する。

40

【0706】

50

【表 8】

表 2 3

トランスジェニックマウスにおけるASO処理のPK分析

ASO	用量 (μ mol/kg)	肝臓 (μ g/g)	腎臓 (μ g/g)	肝臓EC ₅₀ (μ g/g)	3'共役体	ヌクレオシド間連結部/長さ	配列番号
ISIS 304801	0.1	5.2	2.1	53	なし	PS/20	821
	0.8	62.8	119.6				
	2.3	142.3	191.5				
	6.8	202.3	337.7				
ISIS 647535	0.1	3.8	0.7	3.8	GalNAc ₃ -1	PS/20	822

10

【 0 7 0 7 】

ISIS 647535の代謝物も特定し、それらの質量を高分解能質量分析によって確認した。観察された代謝物の切断部位及び構造が以下に示される。標準的手順を用いて全長ASOの相対%を計算し、結果が表23に提示される。ISIS 647535の主な代謝物は、全共役体を欠く全長ASO(すなわち、ISIS 304801)であり、これは、以下に示される切断部位Aでの切断に由来する。さらに、他の切断部位に由来するさらなる代謝物も観察された。これらの結果は、細胞内の酵素によって切断されるか、またはサイトゾルの還元環境下で切断されるか、またはエンドソーム及びリソソーム内の酸性pHに対して不安定な、GalNAc₃-1糖とASOとの間のエステル、ペプチド、ジスルフィド、ホスホラミデート、またはアシルヒドラゾンなどの他の切断可能な結合の導入も有用でありうることを示唆する。

20

【 0 7 0 8 】

【表 9】

表 2 3 a

ISIS 647535の観察された全長代謝物

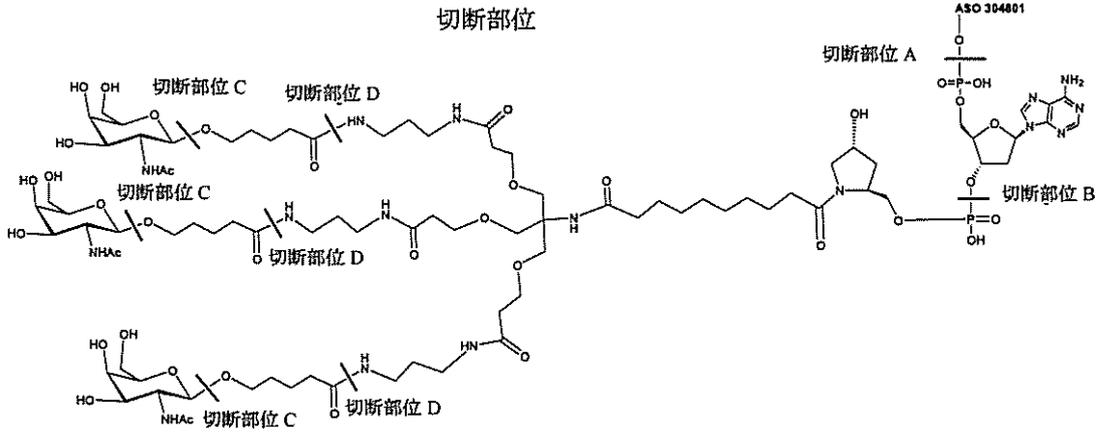
代謝物	ASO	切断部位	相対%
1	ISIS 304801	A	36.1
2	ISIS 304801+dA	B	10.5
3	ISIS 647535-[3 GalNAc]	C	16.1
4	ISIS 647535-[3 GalNAc+1 5-ヒドロキシ-ペンタン酸テザー]	D	17.6
5	ISIS 647535-[2 GalNAc+2 5-ヒドロキシ-ペンタン酸テザー]	D	9.9
6	ISIS 647535-[3 GalNAc+3 5-ヒドロキシ-ペンタン酸テザー]	D	9.8

40

【 0 7 0 9 】

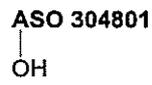
50

【化 1 5 4】

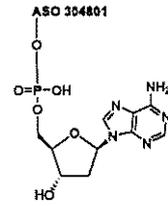


10

代謝物 1



代謝物 2



【 0 7 1 0 】

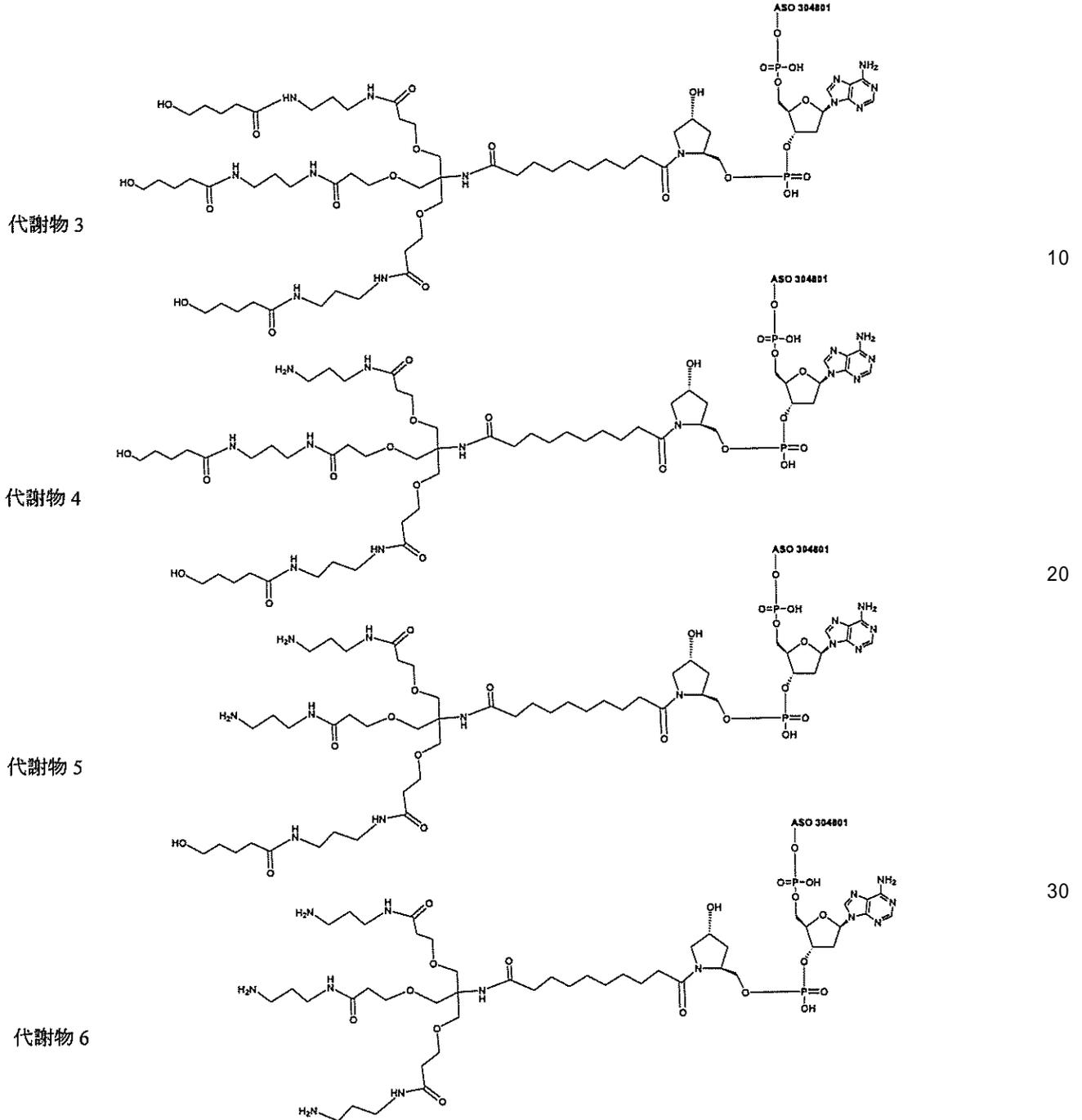
20

30

40

50

【化 1 5 5】



実施例 2 1 : 単回投与試験におけるヒト Apoc III トランスジェニックマウスにおけるヒト Apoc III のアンチセンス阻害 40

【 0 7 1 1】

それぞれヒト Apoc III を標的とし、かつ表 1 7 に記載される ISIS 3 0 4 8 0 1、6 4 7 5 3 5、及び 6 4 7 5 3 6 を、単回投与試験において、ヒト Apoc III トランスジェニックマウスにおけるヒト Apoc III を阻害するそれらの能力についてさらに評価した。

処理

【 0 7 1 2】

ヒト Apoc III トランスジェニックマウスを 1 2 時間の明暗周期に維持し、Teklad 実験食餌を不断給餌した。実験開始前に動物を研究施設で少なくとも 7 日間順化させた。ASO を PBS 中に調製し、0.2 ミクロンのフィルターを通して濾過滅菌した。注 50

入のためにASOを0.9%PBS中に溶解した。

【0713】

ヒトApoC IIIトランスジェニックマウスに、ISIS 304801、647535、もしくは647536（上述のもの）、またはPBS処理対照を、以下に示される投与量で1回、腹腔内注入した。処理群は、3匹の動物からなり、対照群は、4匹の動物からなった。治療前及び最終用量後に血液を各マウスから採取し、血漿試料を分析した。最終投与の72時間後にマウスを殺した。

【0714】

試料を収集し、分析して、肝臓におけるApoC III mRNA及びタンパク質レベル、血漿トリグリセリド、ならびにHDL及びLDL画分を含むコレステロールを決定し、上述（実施例20）のように評価した。これらの分析からのデータは、以下の表24～28に提示される。血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。ALT及びASTレベルは、アンチセンス化合物がすべての投与量で良好な耐性であったことを示した。

【0715】

これらの結果は、GalNAc₃-1共役体を欠くアンチセンス化合物（ISIS 304801）と比較して、3'末端にGalNAc₃-1共役体を含むアンチセンス化合物（ISIS 647535及び647536）の力価の改善を示す。さらに、GalNAc₃-1共役体及びいくつかのホスホジエステル連結部を含むISIS 647536は、同一の共役体を含むISIS 647535と同程度に強力であり、ASO内のすべてのヌクレオシド間連結部は、ホスホロチオエート連結部である。

【0716】

【表10】

表24

ヒトApoC IIIトランスジェニックマウスにおけるApoC III mRNAレベルへのASO処理の影響

ASO	用 量 (mg/kg)	%PBS	ED ₅₀ (mg/kg)	3'共役体	ヌクレオシド 間連結部/長さ	配列番号
PBS	0	99	--	-	--	
ISIS 304801	1	104	13.2	なし	PS/20	821
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0.3	98	1.9	GalNAc ₃ -1	PS/20	822
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0.3	103	1.7	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	822
	1	60				
	3	31				
	10	21				

【0717】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 2 5

ヒト Apoc III トランスジェニックマウスにおける Apoc III 血漿タンパク質レベルへの ASO 処理の影響

ASO	用 量 (mg/kg)	%PBS	ED ₅₀ (mg/kg)	3'共役体	ヌクレオシド 間連結部/長さ	配列番号
PBS	0	99	--	--	--	
ISIS 304801	1	104	23.2	なし	PS/20	821
	3	92				
	10	71				
	30	40				
ISIS 647535	0.3	98	2.1	GalNAc ₃ -1	PS/20	822
	1	70				
	3	33				
	10	20				
ISIS 647536	0.3	103	1.8	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	822
	1	60				
	3	31				
	10	21				

10

20

【 0 7 1 8 】

【表 1 2】

表 2 6

トランスジェニックマウスにおけるトリグリセリドレベルへの ASO 処理の影響

ASO	用 量 (mg/kg)	%PBS	ED ₅₀ (mg/kg)	3'共役体	ヌクレオシド 間連結部/長さ	配列番号
PBS	0	98	--	--	--	
ISIS 304801	1	80	29.1	なし	PS/20	821
	3	92				
	10	70				
	30	47				
ISIS 647535	0.3	100	2.2	GalNAc ₃ -1	PS/20	822
	1	70				
	3	34				
	10	23				
ISIS 647536	0.3	95	1.9	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	822
	1	66				
	3	31				
	10	23				

30

40

【 0 7 1 9 】

50

【表 1 3】

表 2 7

トランスジェニックマウスにおける総コレステロールレベルへのASO処理の影響

ASO	用 量 (mg/kg)	%PBS	3'共役体	ヌクレオシド 間連結部/長さ	配列番号
PBS	0	96	--	--	
ISIS 304801	1	104	なし	PS/20	821
	3	96			
	10	86			
	30	72			
ISIS 647535	0.3	93	GalNAc ₃ -1	PS/20	822
	1	85			
	3	61			
	10	53			
ISIS 647536	0.3	115	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	822
	1	79			
	3	51			
	10	54			

10

20

【 0 7 2 0】

【表 1 4】

表 2 8

トランスジェニックマウスにおけるHDL及びLDLコレステロールレベルへのASO処理の影響

ASO	用 量 (mg/kg)	HDL %PBS	LDL %PBS	3'共役体	ヌクレオシド 間連結部/長さ	配列番号
PBS	0	131	90	--	--	
ISIS 304801	1	130	72	なし	PS/20	821
	3	186	79			
	10	226	63			
	30	240	46			
ISIS 647535	0.3	98	86	GalNAc ₃ -1	PS/20	822
	1	214	67			
	3	212	39			
	10	218	35			
ISIS 647536	0.3	143	89	GalNAc ₃ -1	PS/PO/20	822
	1	187	56			
	3	213	33			
	10	221	34			

30

40

【 0 7 2 1】

これらの結果は、GalNAc₃-1共役体がアンチセンス化合物の力価を改善することを裏付ける。これらの結果は、GalNAc₃-1共役アンチセンス化合物の同等の力価

50

も示し、これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、混成連結部（6個のホスホジエステル連結部を有するISIS 647536）及び同一のアンチセンス化合物の完全なホスホロチオエートバージョン（ISIS 647535）を有する。

【0722】

ホスホロチオエート連結部は、アンチセンス化合物にいくつかの特性を提供する。例えば、これらは、ヌクレアーゼ消化に抵抗し、タンパク質に結合し、腎臓/尿ではなく肝臓における化合物の蓄積をもたらす。これらは、肝臓における徴候を治療する際に特に望ましい特性である。しかしながら、ホスホロチオエート連結部は、炎症性応答とも関連している。したがって、化合物におけるホスホロチオエート連結部の数を減少させることにより、炎症の危険性の減少が見込まれるが、肝臓中の化合物の濃度も低下させ、腎臓及び尿中の濃度を増加させ、ヌクレアーゼの存在下で安定性を低下させ、全体の力価を低下させる。これらの結果は、特定のホスホロチオエート連結部がホスホジエステル連結部に置換されたGalNAc₃-1共役アンチセンス化合物が、肝臓における標的に対して、完全なホスホロチオエート連結部を有する対応物と同程度に強力であることを示す。そのような化合物は、より炎症誘発性が低いと見込まれる（PSの減少が炎症性効果の減少をもたらすことを示す実験を説明する実施例24を参照のこと）。

10

実施例22：生体内におけるSRB-1を標的とするGalNAc₃-1共役修飾ASOの影響

【0723】

それぞれSRB-1を標的とし、かつ表17に記載されるISIS 440762及び651900を、用量依存的試験において、Balb/cマウスにおけるSRB-1を阻害するそれらの能力について評価した。

20

処理

【0724】

6週齢の雄Balb/cマウス（Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME）に、ISIS 440762、651900、またはPBS処理対照を、以下に示される投与量で1回、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の48時間後にマウスを殺して、標準のプロトコルに従ってリアルタイムPCR及びRIBOGREEN（登録商標）RNA定量化試薬（Molecular Probes, Inc. Eugene, OR）を用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを決定した。PBS処理対照に対して標準化する前に（Ribogreenを用いて）SRB-1 mRNAレベルを全RNAとの比較で相対的に決定した。以下の結果は、PBS処理対照に対して標準化された各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示され、「%PBS」で表示される。

30

【0725】

表29に例証されるように、両方のアンチセンス化合物がSRB-1 mRNAレベルを低下させた。さらに、GalNAc₃-1共役体（ISIS 651900）を含むアンチセンス化合物は、GalNAc₃-1共役体を欠くアンチセンス化合物（ISIS 440762）よりもはるかに強力であった。これらの結果は、異なる標的に相補的であり、かつ異なる化学修飾ヌクレオシドを有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、GalNAc₃-1共役体の力価利益が観察されることを実証し、この事例において、修飾ヌクレオシドは、拘束エチル糖部分（二環式糖部分）を含む。

40

【0726】

【表 15】

表 29

Balb/cマウスにおけるSRB-1 mRNAレベルへのASO処理の影響

ASO	用量 (mg/kg)	肝臓 %PBS	ED ₅₀ (mg/kg)	3'共役体		ヌクレオシド 間連結部/長さ	配列 番号
PBS	0	100		-		--	
ISIS 440762	0.7	85	2.2	なし		PS/14	823
	2	55					
	7	12					
	20	3					
ISIS 651900	0.07	98	0.3	GalNAc ₃ -1		PS/14	824
	0.2	63					
	0.7	20					
	2	6					
	7	5					

実施例 23：ヒト末梢血単核細胞 (hPBMC) アッセイプロトコル

【0727】

BD Vacutainer CPTチューブ法を用いてhPBMCアッセイを実行した。US HealthWorks clinic (Faraday & El Camino Real, Carlsbad) においてインフォームドコンセントを得た志願ドナー由来の全血試料を得て、4~15個のBD Vacutainer CPT 8mLチューブ (VWRカタログ番号BD362753) 内に収集した。PBMCアッセイデータシートを用いて、各ドナーのCPTチューブ内の開始合計全血量の近似値を記録した。

【0728】

遠心分離の直前に、チューブを8~10回、穏やかに反転させることによって、血液試料を再度混合した。CPTチューブを、水平 (スイングアウト) ローター内で、室温 (18~25) で30分間、ブレーキオフで1500~1800RCFで遠心分離した (2700RPM、Beckman Allegra 6R)。細胞を (Ficollとポリマーゲル層との間の) バフィーコート界面から回収し、50mLの滅菌円錐チューブに移し、最大5個のCPTチューブ/50mLの円錐チューブ/ドナーをプールした。その後、細胞をPBS (Ca⁺⁺、Mg⁺⁺を含まない; GIBCO) で2回洗浄した。チューブを最大50mLまで満たし、数回反転させて混合した。その後、試料を、室温で15分間、330×gで遠心分離し (1215RPM、Beckman Allegra 6R)、ペレットを乱すことなくできるだけ多くの上澄みを吸引した。チューブを穏やかに回転させて細胞ペレットを取り除き、細胞をRPMI+10%FBS+pen/strep (約1mL/10mLの開始全血量) 中に再懸濁した。60μLの試料を、600μLのVersaLyse試薬 (Beckman Coulter、カタログ番号A09777) を有する試料バイアル (Beckman Coulter) にピペット注入し、10~15秒間穏やかにボルテックスした。試料を室温で10分間インキュベートし、計数前に再度混合した。PBMC細胞型を用いたViceLL XR細胞生存率分析器 (Beckman Coulter) で細胞懸濁液を計数した (1:11の希釈係数を他のパラメータと共に保存した)。生細胞/mL及び生存率を記録した。細胞懸濁液をRPMI+10%FBS+pen/strep中で1×10⁷生PBMC/mLに希釈した。

【0729】

細胞を96ウェル組織培養プレート (Falcon Microtest) の50μL/ウェル中に5×10⁵でプレーティングした。RPMI+10%FBS+pen/strep中で希釈した2倍濃度のオリゴ/対照の50μL/ウェルを実験テンプレートに従

10

20

30

40

50

って添加した（合計100 μ L/ウェル）。プレートを振盪器に設置し、約1分間混合させた。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で24時間インキュベートした後、プレートを400 \times gで10分間遠心分離し、その後、MSDサイトカインアッセイ（すなわち、ヒトIL-6、IL-10、IL-8、及びMCP-1）のために上澄みを除去した。

実施例24：hPBMCアッセイにおけるGalNAc₃-1共役ASOの炎症誘発作用の評価

【0730】

表30に列記されるアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を、実施例23に記載されるプロトコルを用いたhPBMCアッセイにおいて炎症誘発作用について評価した。ISIS 353512は、このアッセイにおいてIL-6放出に関する高レスポンスとして知られる内部標準物である。hPBMCを新鮮な志願ドナーから単離し、0、0.0128、0.064、0.32、1.6、8、40、及び200 μ m濃度のASOで処理した。処理から24時間後、サイトカインレベルを測定した。

10

【0731】

IL-6のレベルを一次読み出しとして用いた。標準的手順を用いてEC₅₀及びE_{max}を計算した。結果が2つのドナー由来のE_{max}/EC₅₀の平均比率として表され、「E_{max}/EC₅₀」で表示される。より低い比率は、炎症誘発応答の相対的減少を示し、より高い比率は、炎症誘発応答の相対的増加を示す。

【0732】

試験化合物に関して、炎症誘発性が最も低い化合物は、PS/PO連結ASO（ISIS 616468）であった。GalNAc₃-1共役ASO（ISIS 647535）は、その非共役対応物（ISIS 304801）よりもわずかに炎症誘発性が低かった。これらの結果は、いくつかのPO連結部の組み込みが炎症誘発反応を減少させ、GalNAc₃-1共役体の添加が化合物の炎症誘発性を高めず、炎症誘発応答を減少させることを示す。したがって、混成PS/PO連結部及びGalNAc₃-1共役体の両方を含むアンチセンス化合物が、完全PS連結アンチセンス化合物（GalNAc₃-1共役体の有無にかかわらず）と比較して、より低い炎症誘発応答をもたらすことが予想されるであろう。これらの結果は、GalNAc₃-1共役アンチセンス化合物、特に減少したPS含有量を有するものの炎症誘発性がより低いことを示す。

20

【0733】

総合して、これらの結果は、GalNAc₃-1共役化合物、特にPS含有量を減らしたものを、対応物であるGalNAc₃-1共役体を欠く完全PSアンチセンス化合物よりも高い用量で投与することができることを示唆する。これらの化合物の半減期が実質的に異なることが予想されないため、そのようなより高い投与量は、結果として低頻度の投薬につながる。実際には、GalNAc₃-1共役化合物の方が力価が高く（実施例20～22を参照のこと）、再投薬は化合物の濃度が所望のレベル未満に低下した時に必要になるが、その所望のレベルは力価に基づくことから、そのような投与の頻度はさらに低くなるだろう。

30

【0734】

40

【表 1 6】

表 3 0
修飾ASO

ASO	配列(5'から3')	標的	配列番号
ISIS 104838	G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	TNF α	825
ISIS 353512	T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} T _{es} G _{es} G _e	CRP	826
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	821
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	ApoC III	822
ISIS 616468	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _e	ApoC III	821

10

【0735】

下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「k」は、6'-(S)-CH₃二環式ヌクレオシド(例えば、cet)を示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部(PS)を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部(PO)を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。上付き文字「m」は、5-メチルシトシンを示す。「A_{do}'-GalNAc₃-1_a」は、示されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドの3'末端に結合される、実施例9に示される構造GalNAc₃-1を有する共役体を示す。

20

【0736】

【表 1 7】

表 3 1
hPBMCAッセイにおけるApoC IIIを標的とするASOの炎症誘発作用

30

ASO	EC ₅₀ (μM)	E _{max} (μM)	E _{max} /EC ₅₀	3'共役体	ヌクレオシド間連結部/長さ	配列番号
ISIS 353512(高レスポンド)	0.01	265.9	26,590	なし	PS/20	826
ISIS 304801	0.07	106.55	1,522	なし	PS/20	821
ISIS 647535	0.12	138	1,150	GalNAc ₃ -1	PS/20	822
ISIS 616468	0.32	71.52	224	なし	PS/PO/20	821

40

実施例25：生体外におけるヒトApoC IIIを標的とするGalNAc₃-1共役修飾ASOの影響

【0737】

上述のISIS 304801及び647535を生体外で試験した。トランスジェニックマウス由来の25,000細胞/ウェルの密度の初代肝細胞を、0.03, 0.08、

50

0.24、0.74、2.22、6.67、及び20 µm濃度の修飾オリゴヌクレオチドで処理した。約16時間の処理期間後、RNAを細胞から単離し、mRNAレベルを定量的リアルタイムPCRで測定し、hApoC III mRNAレベルをRIBOGREENで測定された全RNA含有量に従って調整した。

【0738】

標準的方法を用いてIC₅₀を計算し、結果が表32に提示される。例証されるように、対照ISIS 304801と比較して、同程度の力価がISIS 647535で処理した細胞において観察された。

【0739】

【表18】

表32

初代肝細胞におけるヒトApoC IIIを標的とする修飾ASO

ASO	IC ₅₀ (µM)	3'共役体	ヌクレオシド間連結部/長さ	配列番号
ISIS 304801	0.44	なし	PS/20	821
ISIS 647535	0.31	GalNAc ₃ -1	PS/20	822

10

20

【0740】

この実験において、生体内で観察されるGalNAc₃-1共役の大きな力価利益は、生体外では観察されなかった。生体外での初代肝細胞におけるその後の自由取り込み実験は、GalNAc共役体を欠くオリゴヌクレオチドと比較して、さまざまなGalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドの力価の増加を示した(実施例60、82、及び92を参照のこと)。

実施例26: ApoC III ASO活性へのPO/PS連結部の影響

【0741】

ヒトApoC IIIトランスジェニックマウスに、ISIS 304801もしくはISIS 616468(両方ともに上述のもの)またはPBS処理対照を、25 mg/kgで週1回2週間、腹腔内注入した。処理群は、3匹の動物からなり、対照群は、4匹の動物からなった。治療前及び最終服用後に血液を各マウスから採取し、血漿試料を分析した。最終投与の72時間後にマウスを殺した。

30

【0742】

試料を収集し、分析して、上述のように肝臓におけるApoC IIIタンパク質レベルを決定した(実施例20)。これらの分析からのデータが以下の表33に提示される。

【0743】

これらの結果は、完全PS(ISIS 304801)と比較して、ウイングにPO/PSを有するアンチセンス化合物(ISIS 616468)の力価の減少を示す。

40

【0744】

50

【表 19】

表 33

ヒトApoC IIIトランスジェニックマウスにおけるApoC III
Iタンパク質レベルへのASO処理の影響

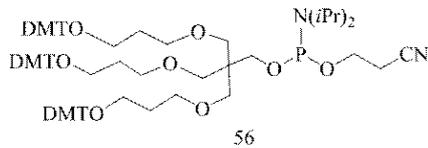
ASO	用量 (mg/kg)	%PBS	3'共役体	ヌクレオシド 間連結部/長さ	配列番号
PBS	0	99	-	--	
ISIS 304801	25mg/kg/週 を2週間	24	なし	完全PS	821
ISIS 616468	25mg/kg/週 を2週間	40	なし	14 PS/6 PO	821

10

実施例 27：化合物 56

【0745】

【化156】



20

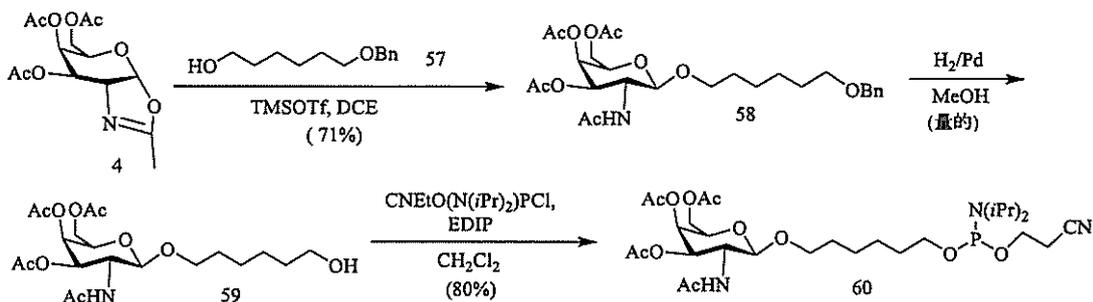
【0746】

化合物 56 は、Glen Research から市販されているか、または Shchepinov et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4447-4454 によって報告された公開された手順に従って調製することができる。

実施例 28：化合物 60 の調製

【0747】

【化157】



30

40

【0748】

化合物 4 を実施例 2 に例証される手順どおりに調製した。化合物 57 は、市販のものである。化合物 60 を構造分析で確認した。

【0749】

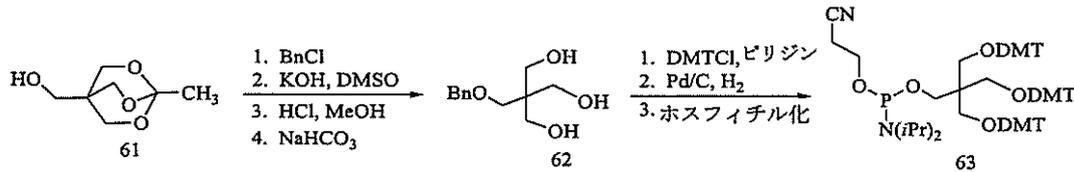
他の単保護された置換または無置換アルキルジオール、例えば限定するわけではないが、本明細書に提示されるものを用いて既定の組成を有するホスホラミダイトを調製することができるため、化合物 57 は、代表的なものであり、限定する意図はない。

実施例 29：化合物 63 の調製

【0750】

50

【化158】



【0751】

化合物61及び62を、Tober et al., Eur. J. Org. Chem., 2013, 3, 566-577、及びJiang et al., Tetrahedron, 2007, 63(19), 3982-3988によって報告された手順と同様の手順を用いて調製する。

10

【0752】

あるいは、化合物63を、Kim et al.の科学文献及び特許文献(Synlett, 2003, 12, 1838-1840、及びKim et al.の公開されたPCT国際出願第WO2004063208号)に報告される手順と同様の手順を用いて調製する。

実施例30：化合物63bの調製

【0753】

【化159】



20

【0754】

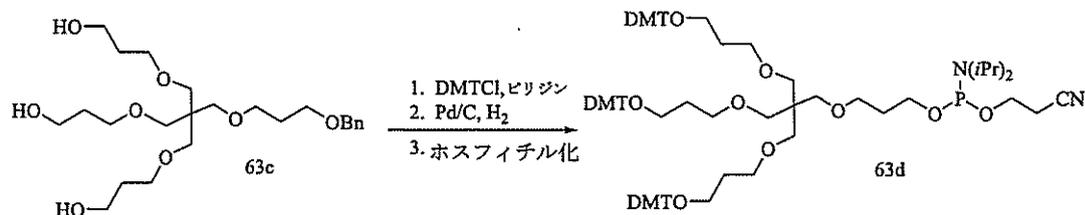
化合物63aを、Hanessian et al., Canadian Journal of Chemistry, 1996, 74(9), 1731-1737によって報告された手順と同様の手順を用いて調製する。

30

実施例31：化合物63dの調製

【0755】

【化160】



40

【0756】

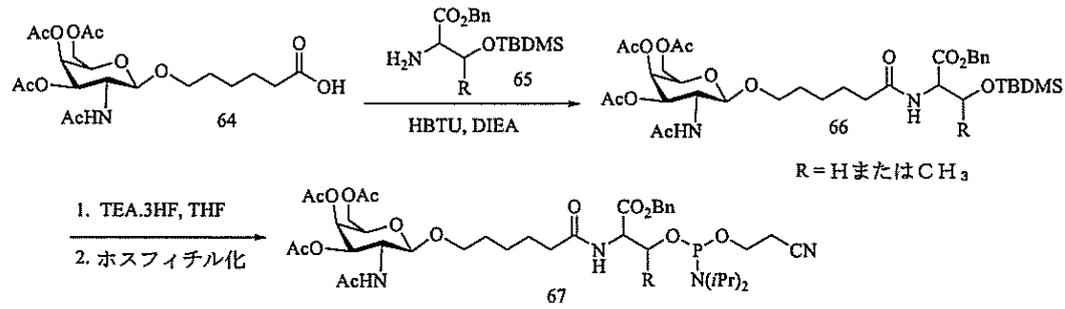
化合物63cを、Chen et al., Chinese Chemical Letters, 1998, 9(5), 451-453によって報告された手順と同様の手順を用いて調製する。

実施例32：化合物67の調製

【0757】

50

【化161】



10

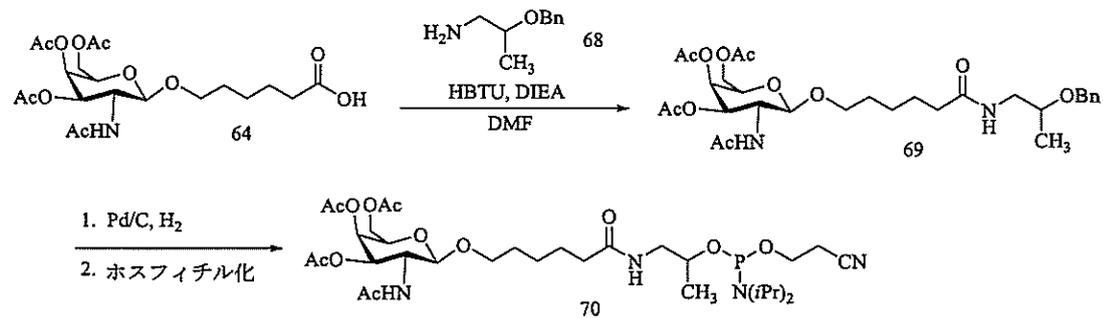
【0758】

実施例2に例証される手順どおりに化合物64を調製した。化合物65を、Or et a l . の公開されたPCT国際出願第WO2009003009号によって報告された手順と同様の手順を用いて調製する。他の保護基、例えば限定するわけではないが、本明細書に提示されるものを用いることができるため、化合物65に用いた保護基は、代表的なものであり、限定する意図はない。

実施例33：化合物70の調製

【0759】

【化162】



20

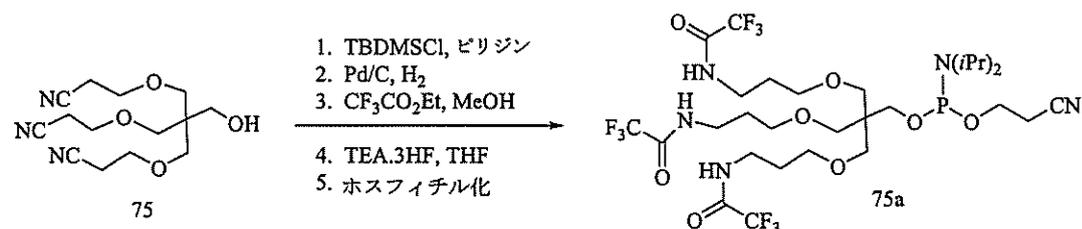
【0760】

実施例2に例証される手順どおりに化合物64を調製した。化合物68は、市販のものである。他の保護基、例えば限定するわけではないが、本明細書に提示されるものを用いることができるため、化合物68に用いた保護基は、代表的なものであり、限定する意図はない。

実施例34：化合物75aの調製

【0761】

【化163】



40

【0762】

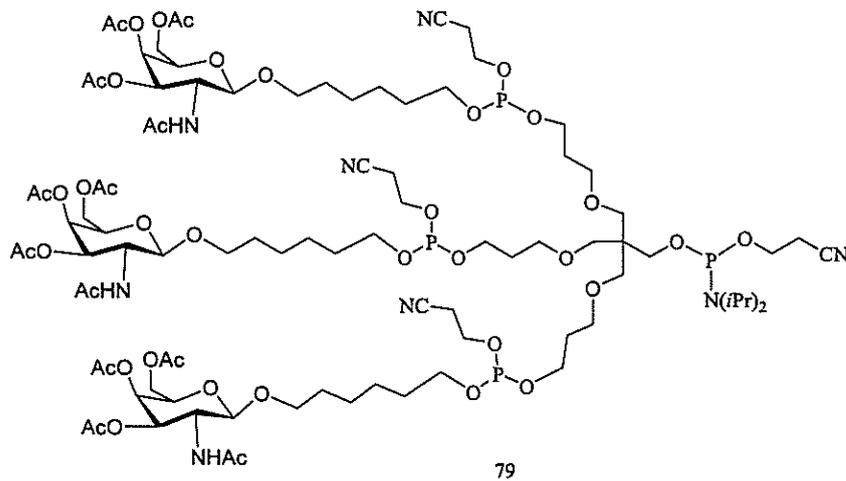
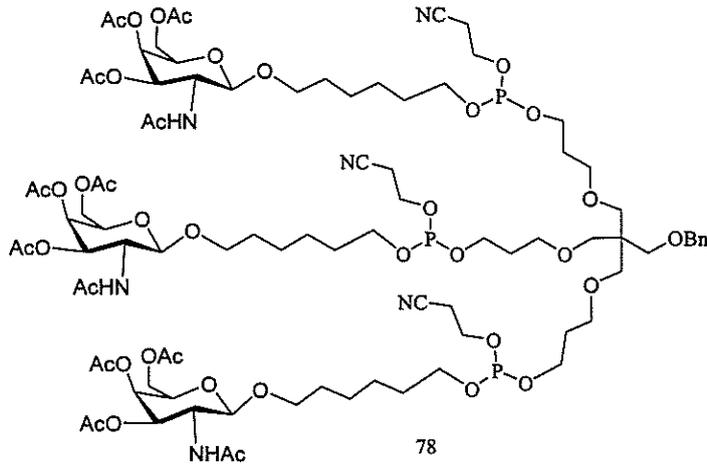
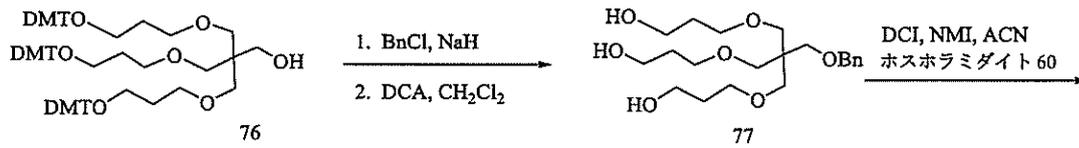
化合物75をShchepinov et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4447-4454によって報告された公開された手順に従って調製する。

実施例35：化合物79の調製

50

【 0 7 6 3 】

【 化 1 6 4 】



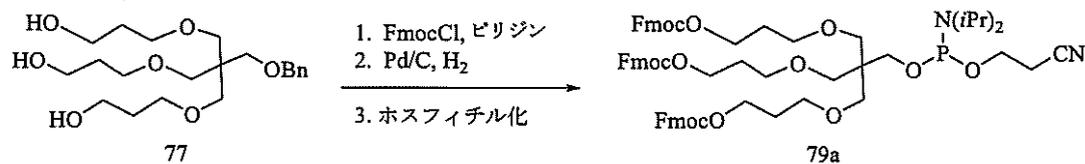
【 0 7 6 4 】

化合物 76 を Shchepinov et al., *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (22), 4447 - 4454 によって報告された公開された手順に従って調製した。

実施例 36 : 化合物 79 a の調製

【 0 7 6 5 】

【 化 1 6 5 】

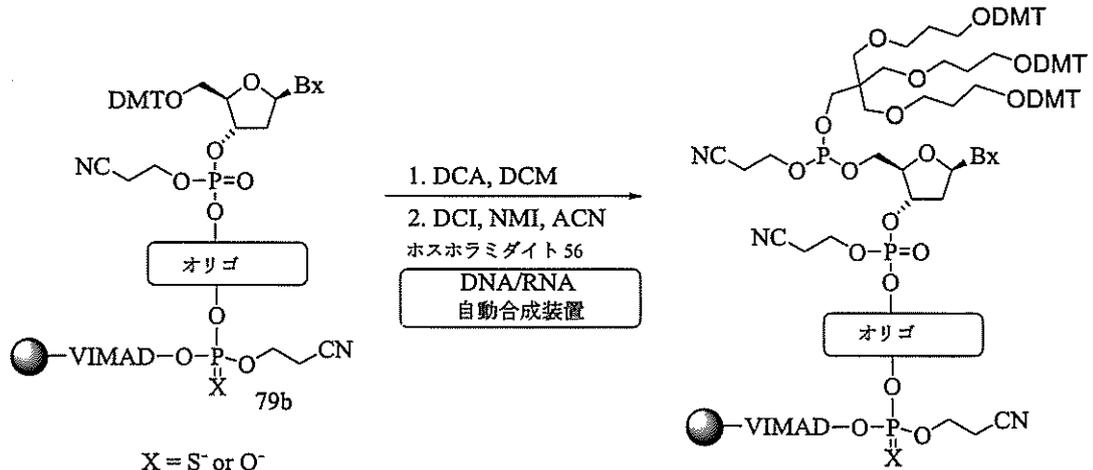


【 0 7 6 6 】

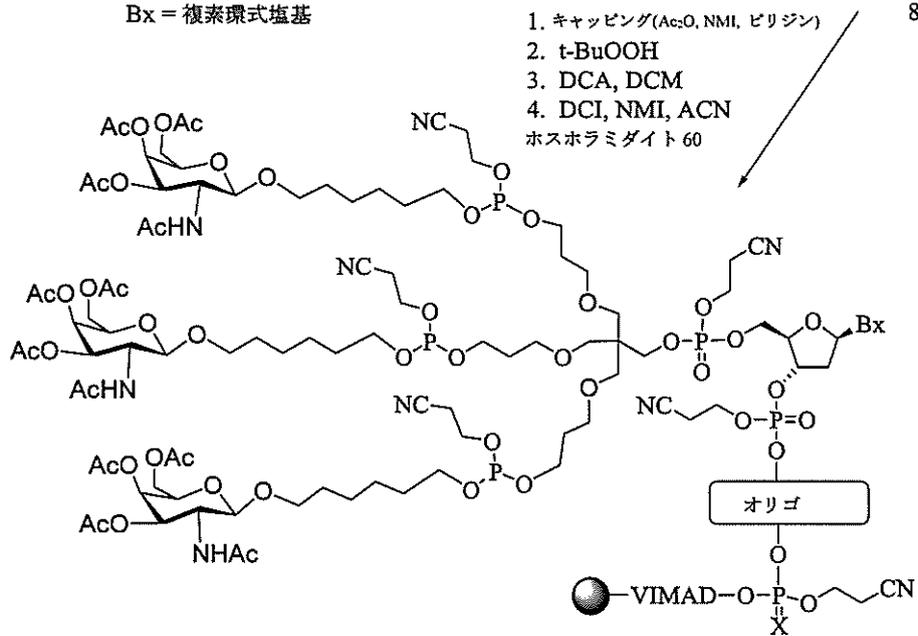
化合物 77 を実施例 35 に例証される手順どおりに調製する。

実施例 37 : 固体支持体による 5' 末端にホスホジエステル連結 GalNA₃-2 共役体を含む共役オリゴマー化合物 82 の調製のための一般的方法 (方法 I)

【 0 7 6 7 】
【 化 1 6 6 】



X = S⁻ or O⁻
Bx = 複素環式塩基



1. キャッピング(Ac₂O, NMI, ピリジン)
2. t-BuOOH
3. トルエン中 20% Et₂NH (v/v)
4. NH₄, 55 °C,

【 0 7 6 8 】

10

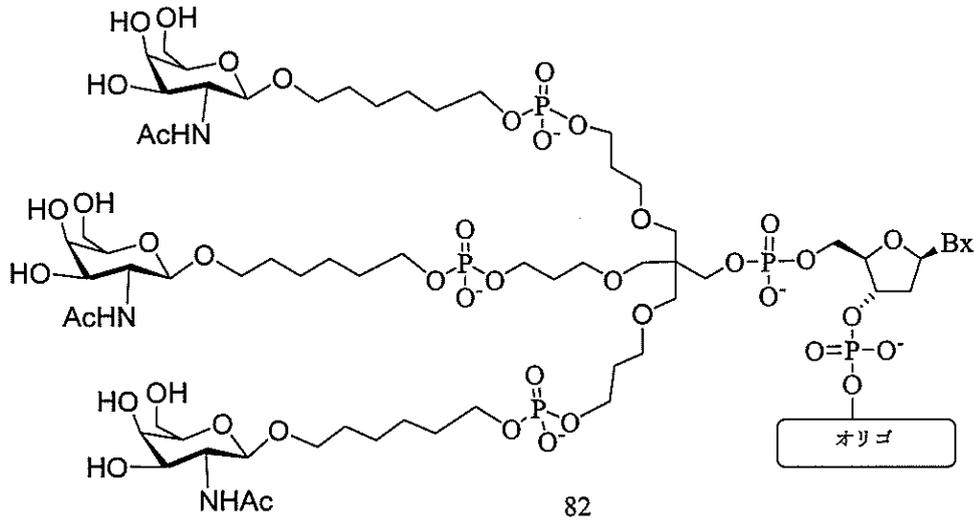
20

30

40

50

【化167】



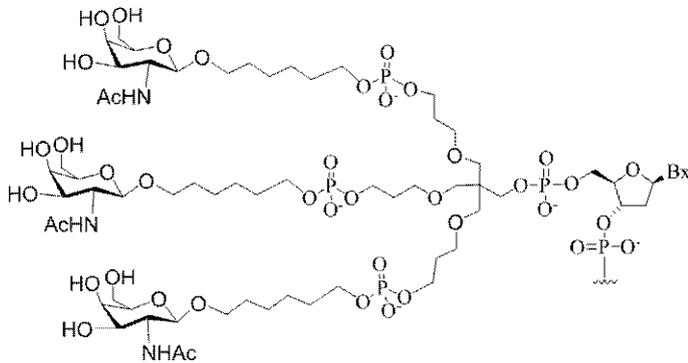
10

【0769】

GalNAc₃-2が、以下の構造を有する：

【0770】

【化168】



20

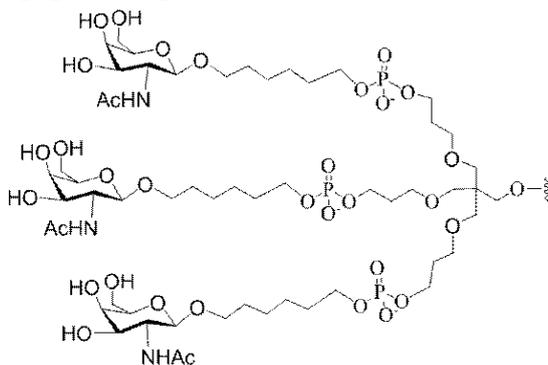
30

【0771】

共役基GalNAc₃-2 (GalNAc₃-2_a)のGalNAc₃クラスター部分を任意の切断可能部分と合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。GalNAc₃-2_aは、以下の式を有する：

【0772】

【化169】



40

【0773】

VIMAD結合オリゴマー化合物79bを、自動DNA/RNA合成における標準の手順を用いて調製した(Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627を参照のこと)。ホスホラミダイト化合物56及

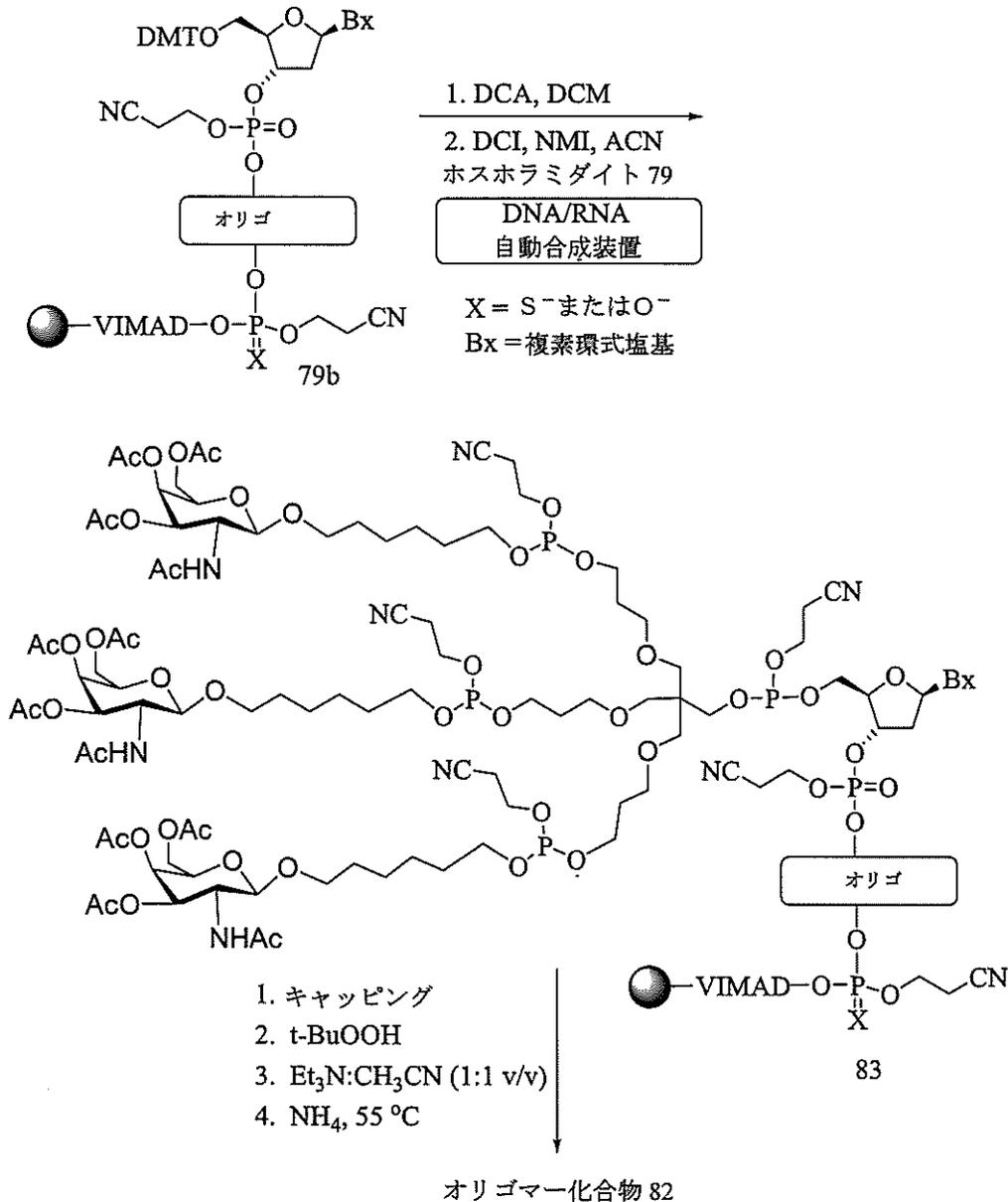
50

び60を、それぞれ、実施例27及び28にそれぞれ例証される手順どおりに調製した。他のホスホラミダイト構築ブロック、例えば限定するわけではないが、本明細書に提示されるものを用いて、5'末端にホスホジエステル連結共役基を有するオリゴマー化合物を調製することができるため、例証されるホスホラミダイトは、代表的なものであり、限定する意図はない。固体支持体に添加されるホスホラミダイトの順序及び量を調整して、任意の既定の配列及び組成を有する本明細書に記載するオリゴマー化合物を調製することができる。

実施例38：5'末端にホスホジエステル連結GalNAc₃-2共役体を含むオリゴマー化合物82の調製のための代替方法（方法II）

【0774】

【化170】



【0775】

VIMAD結合オリゴマー化合物79bを、自動DNA/RNA合成における標準的手順を用いて調製した(Dupouy et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 3623-3627を参照のこと)。GalNAc₃-2クラスターホスホラミダイト(化合物79)を実施例35に例証される手順どおりに調製した。この代替方法は、合成の最終ステップでのホスホジエステル連結GalNAc₃-2共役体の

10

20

30

40

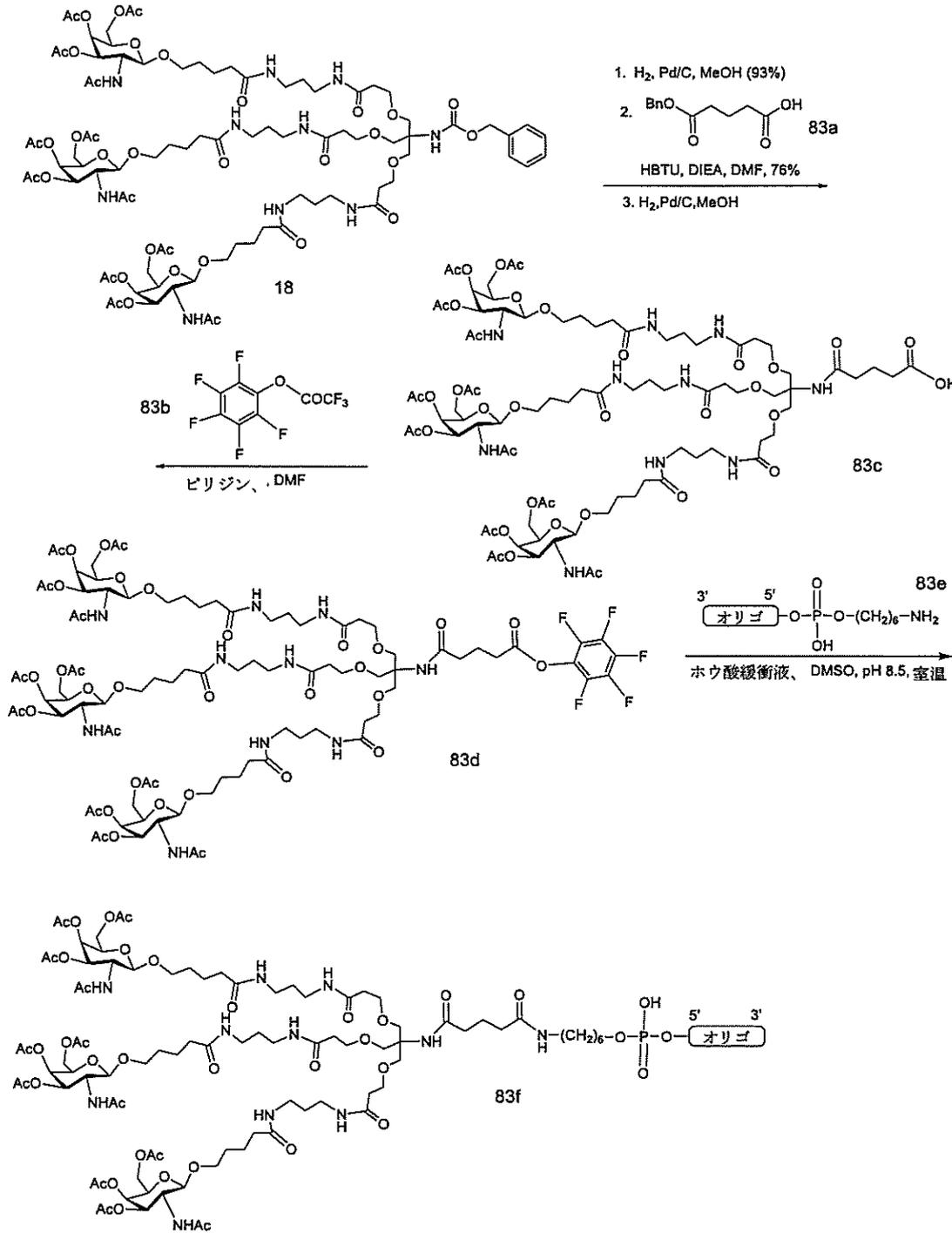
50

オリゴマー化合物への一段階導入を可能にする。他のホスホラミダイト構築ブロック、例えば限定するわけではないが、本明細書に提示されるものを用いて5'末端にホスホジエステル共役体を有するオリゴマー化合物を調製することができるため、例証されるホスホラミダイトは、代表的なものであり、限定する意図はない。固体支持体に添加されるホスホラミダイトの順序及び量を調整して、任意の既定の配列及び組成を有する本明細書に記載するオリゴマー化合物を調製することができる。

実施例39：固体支持体による5'末端にGalNAc₃-3共役体(5'末端結合のためにGalNAc₃-1修飾されたもの)を含むオリゴマー化合物83hの調製のための一般的方法

【0776】

【化171】



10

20

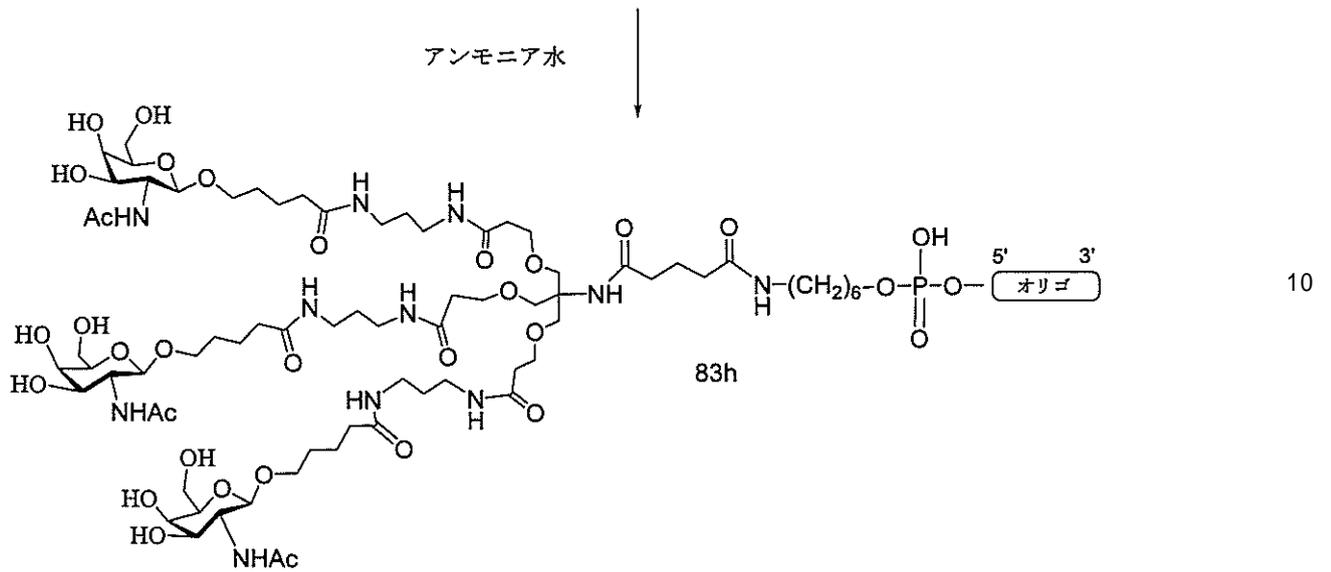
30

40

50

【 0 7 7 7 】

【 化 1 7 2 】



【 0 7 7 8 】

化合物 18 を実施例 4 に例証される手順どおりに調製した。化合物 8 3 a 及び 8 3 b は、市販のものである。ホスホジエステル連結ヘキシルアミンを含むオリゴマー化合物 8 3 e を標準のオリゴヌクレオチド合成手順を用いて調製した。保護されたオリゴマー化合物をアンモニア水で処理することにより、5' - GalNAc₃ - 3 共役オリゴマー化合物 (8 3 h) を提供した。

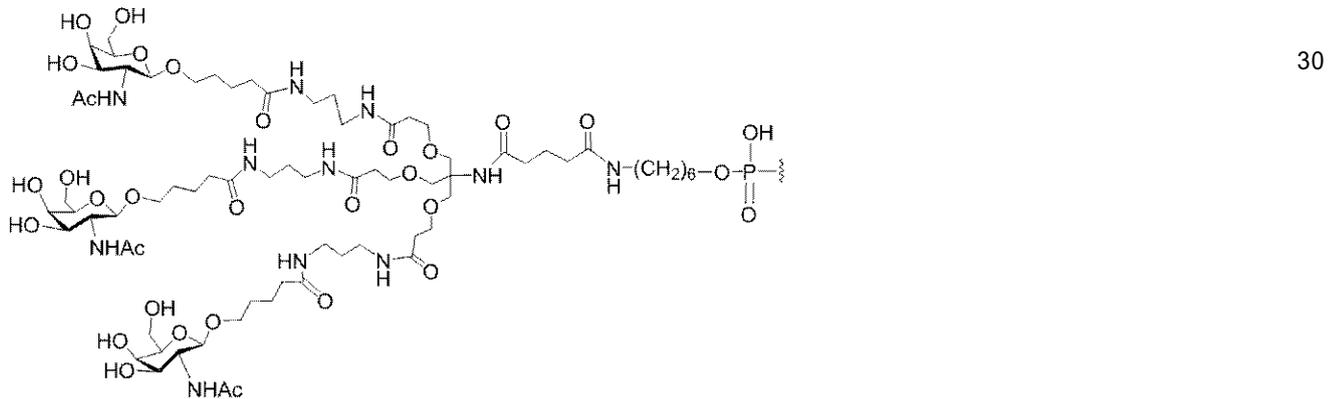
20

【 0 7 7 9 】

GalNAc₃ - 3 が、以下の構造を有する：

【 0 7 8 0 】

【 化 1 7 3 】



【 0 7 8 1 】

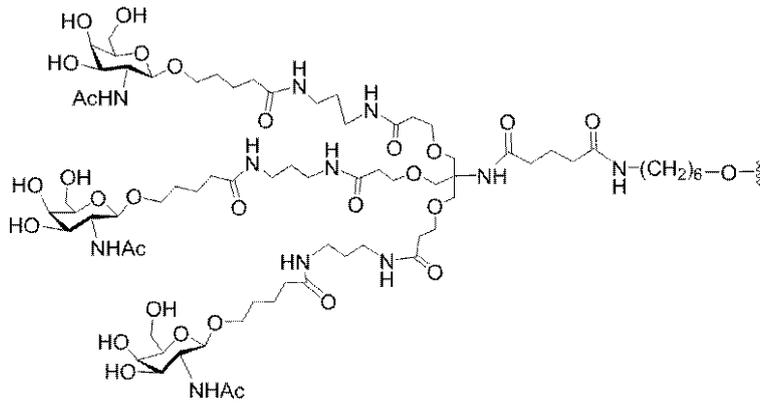
共役基 GalNAc₃ - 3 (GalNAc₃ - 3 a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。GalNAc₃ - 3 a は、以下の式を有する：

40

【 0 7 8 2 】

50

【化 1 7 4】



10

実施例 40 : 固体支持体による 3' 末端にホスホジエステル連結 GalNAc₃-4 共役体を含むオリゴマー化合物 89 の調製のための一般的方法

【 0 7 8 3】

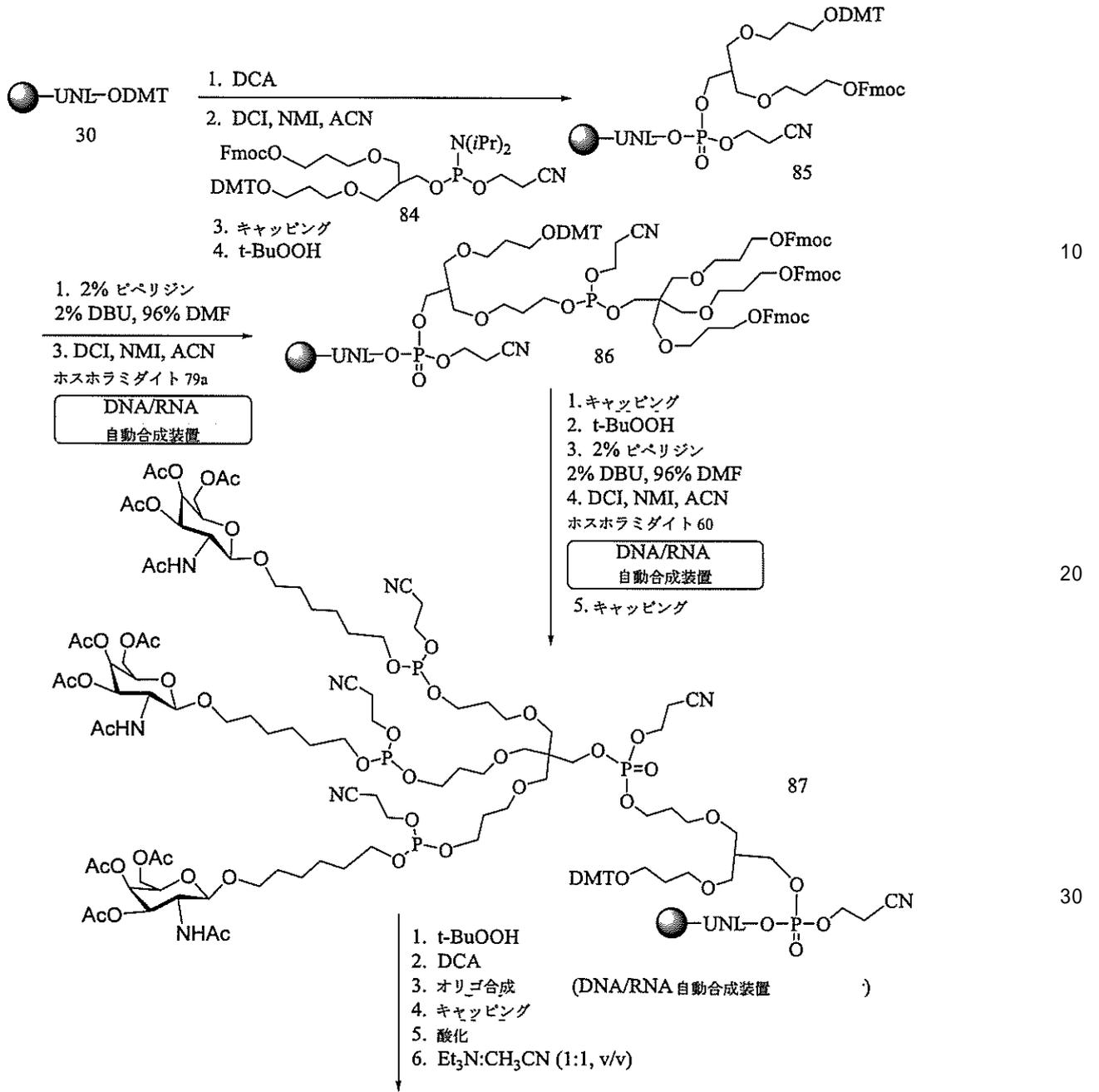
20

30

40

50

【化 1 7 5】



【 0 7 8 4】

10

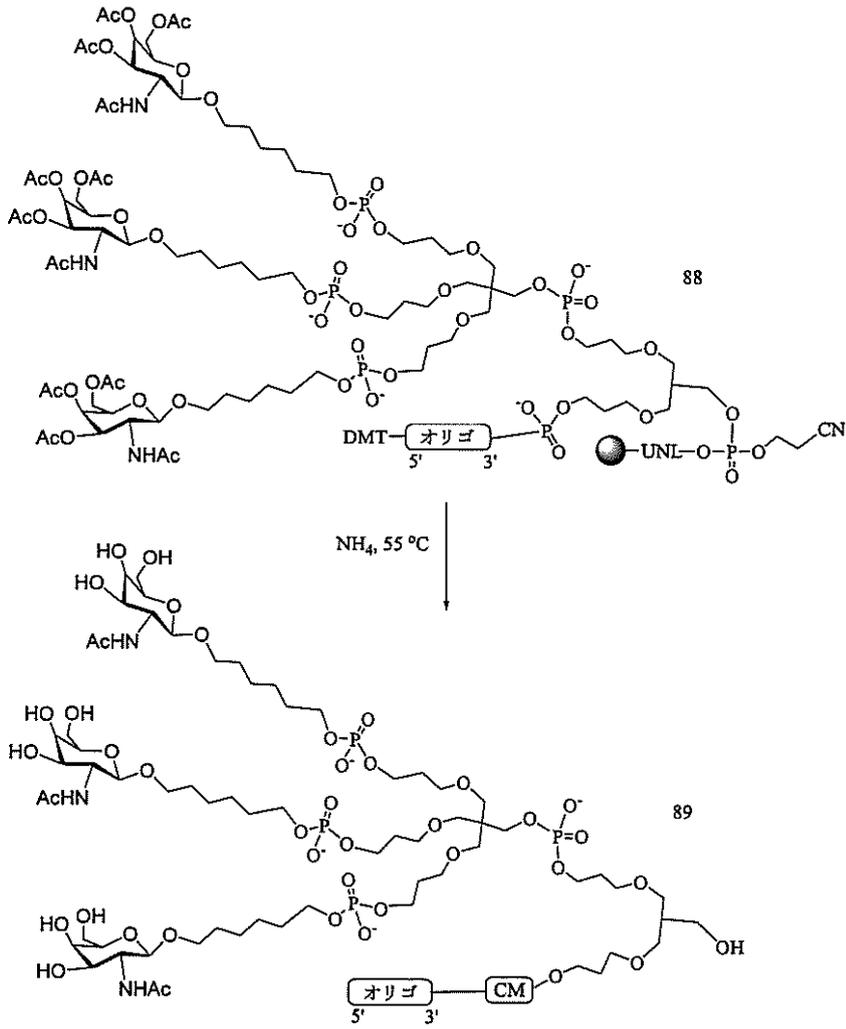
20

30

40

50

【化176】



10

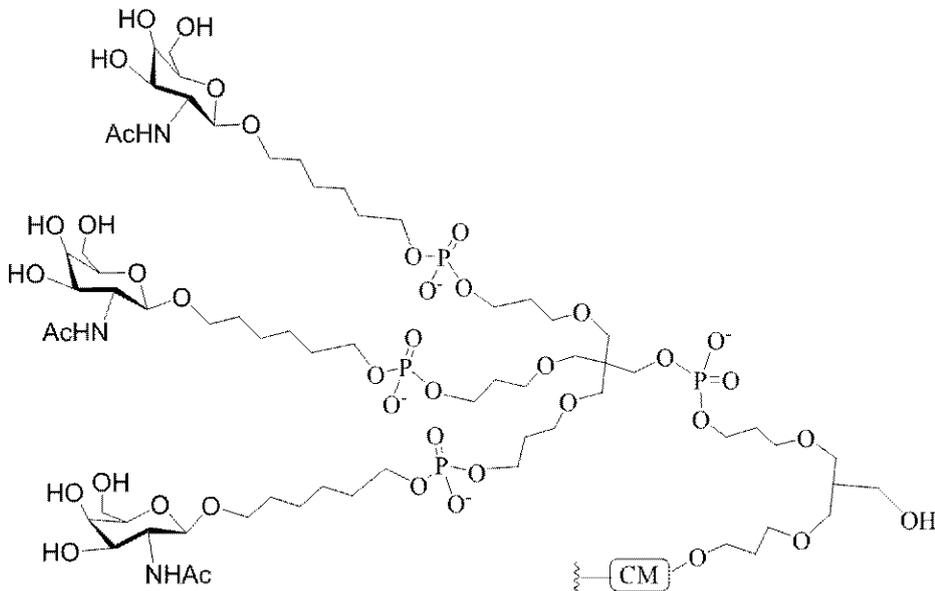
20

【0785】

GalNAc₃-4が、以下の構造を有する：

【0786】

【化177】



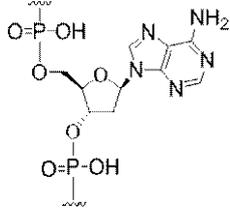
【0787】

50

式中、CMは、切断可能部分である。特定の実施形態において、切断可能部分は、以下のものである：

【0788】

【化178】



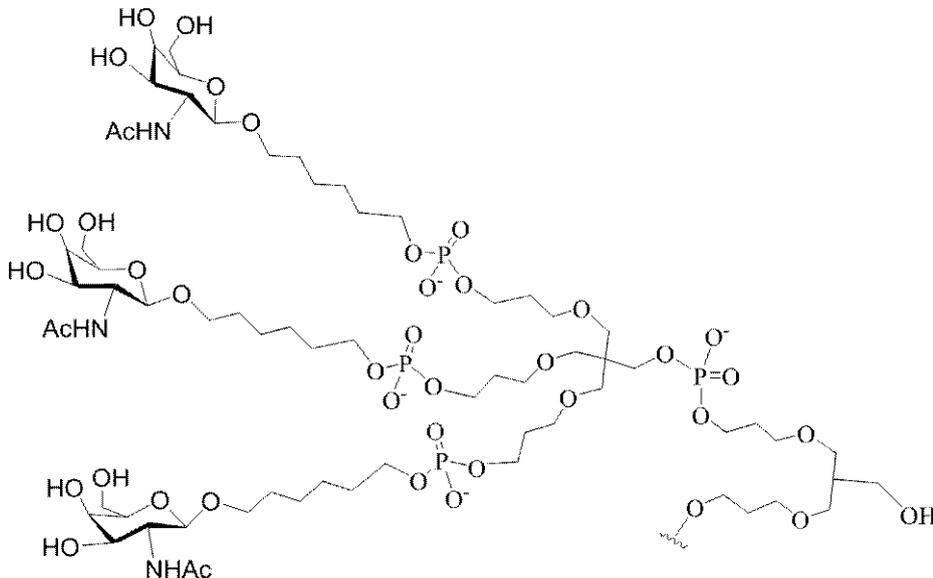
10

【0789】

共役基GalNAc₃-4 (GalNAc₃-4a)のGalNAc₃クラスター部分を任意の切断可能部分と合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。GalNAc₃-4aは、以下の式を有する：

【0790】

【化179】



20

30

【0791】

保護されたUnylinker機能化固体支持体化合物30は、市販のものである。化合物84を、文献に報告される手順と同様の手順を用いて調製する(Shchepinov et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4447-4454、Shchepinov et al., Nucleic Acids Research, 1999, 27, 3035-3041、及びHornet et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25, 4842-4849を参照のこと)。

40

【0792】

ホスホラミダイト構築ブロック(化合物60及び79a)を実施例28及び36に例証される手順どおりに調製する。他のホスホラミダイト構築ブロックを用いて、既定の配列及び組成を有する3'末端にホスホジエステル連結共役体を有するオリゴマー化合物を調製することができるため、例証されるホスホラミダイトは、代表的なものであり、限定する意図はない。固体支持体に添加されるホスホラミダイトの順序及び量を調整して、任意の既定の配列及び組成を有する本明細書に記載するオリゴマー化合物を調製することができる。実施例41：固相技法による5'位にホスホジエステル連結GalNAc₃-2(Bxがアデニンである実施例37を参照のこと)共役体を含むASOの調製のための一般的方法(ISIS 661134の調製)

50

【 0 7 9 3 】

別段の明示がある場合を除き、オリゴマー化合物の合成に用いるすべての試薬及び溶液を商業的供給源から購入する。標準のホスホラミダイト構築ブロック及び固体支持体を、例えば、T、A、G、及びmC残基を含む、ヌクレオシド残基の組み込みのために用いる。ホスホラミダイト化合物56及び60を用いて、5'末端のホスホジエステル連結GalNAc₃-2共役体を合成した。無水アセトニトリル中のホスホラミダイトの0.1M溶液をb-D-2'-デオキシリボヌクレオシド及び2'-MOEに用いた。

【 0 7 9 4 】

カラムに充填されたVIMAD固体支持体(110µmol/g、Guzaev et al., 2003)でのホスホラミダイトカップリング法により、ASO合成を、ABI 394合成装置(1~2µmolの規模)またはGE Healthcare Bioscience AeKTAオリゴパイロット合成装置(40~200µmolの規模)で実行した。このカップリングステップについて、固体支持体の初期負荷量に対して4倍過剰のホスホラミダイトを送達し、ホスホラミダイトカップリングを10分間行った。すべての他のステップは、製造業者から提供された標準のプロトコルに従った。トルエン中の6%ジクロロ酢酸溶液を用いて、ヌクレオチドの5'-ヒドロキシル基からジメトキシトリチル(DMT)基を除去した。カップリングステップ中、無水CH₃CN中の4,5-ジシアノイミダゾール(0.7M)を活性化剤として用いた。ホスホロチオエート連結部を、3分間の接触時間で、1:1のピリジン/CH₃CN中のキサンタンヒドリドの0.1M溶液による硫化によって導入した。6%の水を含有するCH₃CN中の20%のtert-ブチルヒドロペルオキシドの溶液を酸化剤として用いて、12分間の接触時間で、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部を提供した。

【 0 7 9 5 】

所望の配列が構築された後、シアノエチルホスフェート保護基を、45分間の接触時間で、トルエン中の20%ジエチルアミン(v/v)を用いて脱保護した。固体支持体に結合されたASOをアンモニア水(28~30重量%)中に懸濁し、55℃で6時間加熱した。

【 0 7 9 6 】

その後、非結合型ASOを濾過し、アンモニアを沸去した。残渣を強アニオン交換カラムでの高圧液体クロマトグラフィーによって精製した(GE Healthcare Bioscience, Source 30Q, 30µm, 2.54x8cm, A=30%CH₃CN水溶液中100mM酢酸アンモニウム、B=A中1.5M NaBr、60分後0~40%のB、流量14mL/分、λ=260nm)。残渣を逆相カラムでのHPLCにより脱塩して、固体支持体への初期負荷量に基づいて15~30%の単離収率で所望のASOを得た。ASOを、Agilent 1100 MSDシステムを用いたイオン対HPLC/MS分析によって特徴付けた。

【 0 7 9 7 】

【表20】

表34

SRB-1を標的とする5'位にホスホジエステル連結GalNAc₃-2共役体を含むASO

ISIS 番号	配列(5'から3')	計算された質量	観察された質量	配列番号
661134	GalNAc ₃ -2-a'-A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	6482.2	6481.6	827

【 0 7 9 8 】

下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、b-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「k」は、6'-(S)-CH₂二環式ヌクレオシド(例

例えば、c E t)を示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部 (P S) を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部 (P O) を示し、「o'」は、- O - P (= O) (O H) - を示す。上付き文字「m」は、5 - メチルシトシンを示す。G a l N A c₃ - 2 a の構造が実施例 3 7 に示される。

実施例 4 2 : 固相技法による 5 ' 位に G a l N A c₃ - 3 共役体を含む A S O の調製のための一般的な方法 (I S I S 6 6 1 1 6 6 の調製)

【 0 7 9 9 】

I S I S 6 6 1 1 6 6 の合成を、実施例 3 9 及び 4 1 に例証される手順と同様の手順を用いて実行した。

【 0 8 0 0 】

I S I S 6 6 1 1 6 6 は、5 ' 位が G a l N A c₃ - 3 共役体を含む 5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーである。A S O を、A g i l e n t 1 1 0 0 M S D システムを用いたイオン対 H P L C / M S 分析によって特徴付けた。

【 0 8 0 1 】

【表 2 1】

表 3 4 a

M a l a t - 1 を標的とする、ヘキシルアミノホスホジエステル連結部を介して 5 ' 位に G a l N A c₃ - 3 共役体を含む A S O

ISIS 番号	配列(5'から3')	共役体	計算された質量	観察された質量	配列番号
661166	5'-GalNAc ₃ -3 _{a-o'} ^m C _{es} G _{es} G _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{es} A _{es} A _{es} T _{es} T _e	5'-GalNAc ₃ -3	8992.16	8990.51	828

【 0 8 0 2 】

下付き文字「e」は、2 ' - M O E 修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、- D - 2 ' - デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部 (P S) を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部 (P O) を示し、「o'」は、- O - P (= O) (O H) - を示す。上付き文字「m」は、5 - メチルシトシンを示す。「5 ' - G a l N A c₃ - 3 a」の構造が実施例 3 9 に示される。

実施例 4 3 : 生体内における S R B - 1 を標的とする 5 ' 末端でのホスホジエステル連結 G a l N A c₃ - 2 の用量依存的試験 (B x がアデニンである実施例 3 7 及び 4 1 を参照のこと)

【 0 8 0 3 】

5 ' 末端にホスホジエステル連結 G a l N A c₃ - 2 共役体を含む I S I S 6 6 1 1 3 4 (実施例 4 1 を参照のこと) を、用量依存的試験においてマウスにおける S R B - 1 のアンチセンス阻害について試験した。非共役 I S I S 4 4 0 7 6 2 及び 6 5 1 9 0 0 (3 ' 末端に G a l N A c₃ - 1 共役体、実施例 9 を参照のこと) を比較のために試験に含め、先の表 1 7 に記載する。

処理

【 0 8 0 4 】

6 週齢の雄 B a l b / c マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r y , B a r H a r b o r , M E) に、I S I S 4 4 0 7 6 2 、 6 5 1 9 0 0 、 6 6 1 1 3 4 、 または P B S 処理対照を、以下に示される投与量で 1 回、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 7 2 時間後にマウスを 殺して、リアルタイム P C R 及び R I B O G R E E N (登録商標) R N A 定量化試薬 (M o l e c u l a r P r o b e s , I n c

10

20

30

40

50

. Eugene, OR) を用いて、肝臓における SRB-1 mRNA レベルを標準プロトコルに従って決定した。PBS 処理対照に対して標準化する前に (Ribogreen を用いて) SRB-1 mRNA レベルを全 RNA との比較で相対的に決定した。以下の結果は、PBS 処理対照に対して標準化された各処理群の SRB-1 mRNA レベルの平均パーセントとして提示され、「%PBS」で表示される。前記方法と同様の方法を用いて ED₅₀ を測定し、以下に提示する。

【0805】

表35に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で SRB-1 mRNA レベルを低下させた。実際には、5'末端にホスホジエステル連結 GalNAc₃-2 共役体 (ISIS 661134) または 3'末端に連結された GalNAc₃-1 共役体 (ISIS 651900) を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド (ISIS 440762) と比較して、力価の大幅な改善を示した。さらに、5'末端にホスホジエステル連結 GalNAc₃-2 共役体を含む ISIS 661134 は、3'末端に GalNAc₃-1 共役体を含む ISIS 651900 と比較して、等効力であった。

【0806】

【表22】

表35

SRB-1 を標的とする、GalNAc₃-1 または GalNAc₃-2 を含有する ASO

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA レベル (%PBS)	ED ₅₀ (mg/kg)	共役体	配列番号
PBS	0	100	--	--	
440762	0.2	116	2.58	共役体なし	823
	0.7	91			
	2	69			
	7	22			
	20	5			
651900	0.07	95	0.26	3'GalNAc ₃ -1	824
	0.2	77			
	0.7	28			
	2	11			
	7	8			
661134	0.07	107	0.25	5'GalNAc ₃ -2	827
	0.2	86			
	0.7	28			
	2	10			
	7	6			

【0807】

3'GalNAc₃-1 及び 5'GalNAc₃-2 の構造は、先の実施例 9 及び 37 に記載されている。

薬物動態分析 (PK)

【0808】

高用量群 (7 mg/kg) での ASO の PK を調べ、実施例 20 に例証される方法と同一の方法で評価した。肝臓試料を切り刻み、標準のプロトコルを用いて抽出した。6611

34 (5' GalNAc₃-2) 及び ISIS 651900 (3' GalNAc₃-1) の全長代謝物を特定し、これらの質量を高分解能質量分析によって確認した。結果は、5' 末端にホスホジエステル連結 GalNAc₃-2 共役体を含む ASO (ISIS 661134) に対して検出された主な代謝物が、ISIS 440762 であったことを示した (データ示されず)。検出可能なレベルでさらなる代謝物は観察されなかった。その対応物とは異なり、先の表 23a に報告された代謝物と同様のさらなる代謝物が、3' 末端に GalNAc₃-1 共役体を有する ASO (ISIS 651900) で観察された。これらの結果は、ホスホジエステル連結 GalNAc₃-1 または GalNAc₃-2 共役体を有することで、それらの力価を損なうことなく ASO の PK プロファイルを改善しうることを示唆する。

10

実施例 44: SRB-1 を標的とする 3' 末端に GalNAc₃-1 共役体 (実施例 9 を参照のこと) を含む ASO のアンチセンス阻害への PO / PS 連結部の影響

【0809】

それぞれ SRB-1 を標的とする、3' 末端に GalNAc₃-1 共役体を含む ISIS 655861 及び 655862 を、単回投与試験においてマウスにおける SRB-1 を阻害するそれらの能力について試験した。親非共役化合物 ISIS 353382 を比較のために試験に含めた。

【0810】

ASO は 5'-10'-5 MOE ギャップマーであり、ギャップ領域は、10 個の 2'-デオキシリボヌクレオシドを含み、各ウイング領域は、5 個の 2'-MOE 修飾ヌクレオシドを含む。ASO を先の実施例 19 に例証される方法と同様の方法を用いて調製し、以下の表 36 に示す。

20

【0811】

【表 23】

表 36

SRB-1 を標的とする 3' 末端に GalNAc₃-1 共役体を含む修飾 ASO

ISIS 番号	配列(5'から3')	化学的特徴	配列番号
353382(親)	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	完全 PS、共役体なし	829
655861	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	完全 PS、GalNAc ₃ -1 共役体あり	830
655862	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} T _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	混成 PS/PO、GalNAc ₃ -1 共役体あり	830

30

【0812】

下付き文字「e」は、2'-MOE 修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部 (PS) を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部 (PO) を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。上付き文字「m」は、5-メチルシトシンを示す。「GalNAc₃-1」の構造が実施例 9 に示される。

処理

【0813】

6 週齢の雄 Balb/c マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) に、ISIS 353382、655861、655862、または PB

40

50

S 処理対照を、以下に示される投与量で 1 回、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなつた。治療前及び最終服用後に血液を各マウスから採取し、血漿試料を分析した。最終投与の 72 時間後にマウスを殺して、リアルタイム PCR 及び RIBOGREEN (登録商標) RNA 定量化試薬 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を用いて、肝臓における SRB-1 mRNA レベルを決定した。PBS 処理対照に対して標準化する前に (Ribogreen を用いて) SRB-1 mRNA レベルを全 RNA との比較で相対的に決定した。以下の結果は、PBS 処理対照に対して標準化された各処理群の SRB-1 mRNA レベルの平均パーセントとして提示され、「% PBS」で表示される。前記方法と同様の方法を用いて ED₅₀ を測定し、以下に報告する。

10

【0814】

表 37 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、PBS 処理対照と比較して、用量依存的様式で SRB-1 mRNA レベルを低下させた。実際には、3' 末端に GalNAc₃-1 共役体を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド (ISIS 655861 及び 655862) は、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド (ISIS 353382) と比較して、力価の大幅な改善を示した。さらに、混成 PS/PO 連結部を有する ISIS 655862 は、完全 PS (ISIS 655861) と比較して、力価の改善を示した。

【0815】

【表 24】

20

表 37

SRB-1 を標的とする 3' 末端に GalNAc₃-1 共役体を含む ASO のアンチセンス阻害への PO/PS 連結部の影響

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA レベル (%PBS)	ED ₅₀ (mg/kg)	化学的特徴	配列番号
PBS	0	100	--	--	
353382 (親)	3	76.65	10.4	完全PS、共役体なし	829
	10	52.40			
	30	24.95			
655861	0.5	81.22	2.2	完全PS、GalNAc ₃ -1 共役体あり	830
	1.5	63.51			
	5	24.61			
	15	14.80			
655862	0.5	69.57	1.3	混成PS/PO、GalNAc ₃ -1 共役体あり	830
	1.5	45.78			
	5	19.70			
	15	12.90			

30

40

【0816】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。臓器重量も評価した。結果は、PBS 対照と比較して、ASO で処理したマウスにおいて、トランスアミナーゼレベル (表 38) の増加も臓器重量 (データ示されず) の増加も観察されなかったことを示した。さらに、混成 PS/PO 連結部を有する ASO (ISIS 655862) は、完全 PS (ISIS 655861) と比較して、同様のトランスアミナーゼ

50

レベルを示した。

【 0 8 1 7 】

【 表 2 5 】

表 3 8

SRB-1を標的とする3'末端にGalNAc₃-1共役体を含むASOのトランスアミナーゼレベルへのPO/PS連結部の影響

ISIS番号	投与量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	化学的特徴	配列番号
PBS	0	28.5	65	--	
353382 (親)	3	50.25	89	完全PS、共役体なし	829
	10	27.5	79.3		
	30	27.3	97		
655861	0.5	28	55.7	完全PS、 GalNAc ₃ -1あり	830
	1.5	30	78		
	5	29	63.5		
	15	28.8	67.8		
655862	0.5	50	75.5	混成PS/PO、 GalNAc ₃ -1あり	830
	1.5	21.7	58.5		
	5	29.3	69		
	15	22	61		

10

20

実施例 4 5 : PFPエステル(化合物 1 1 0 a)の調製

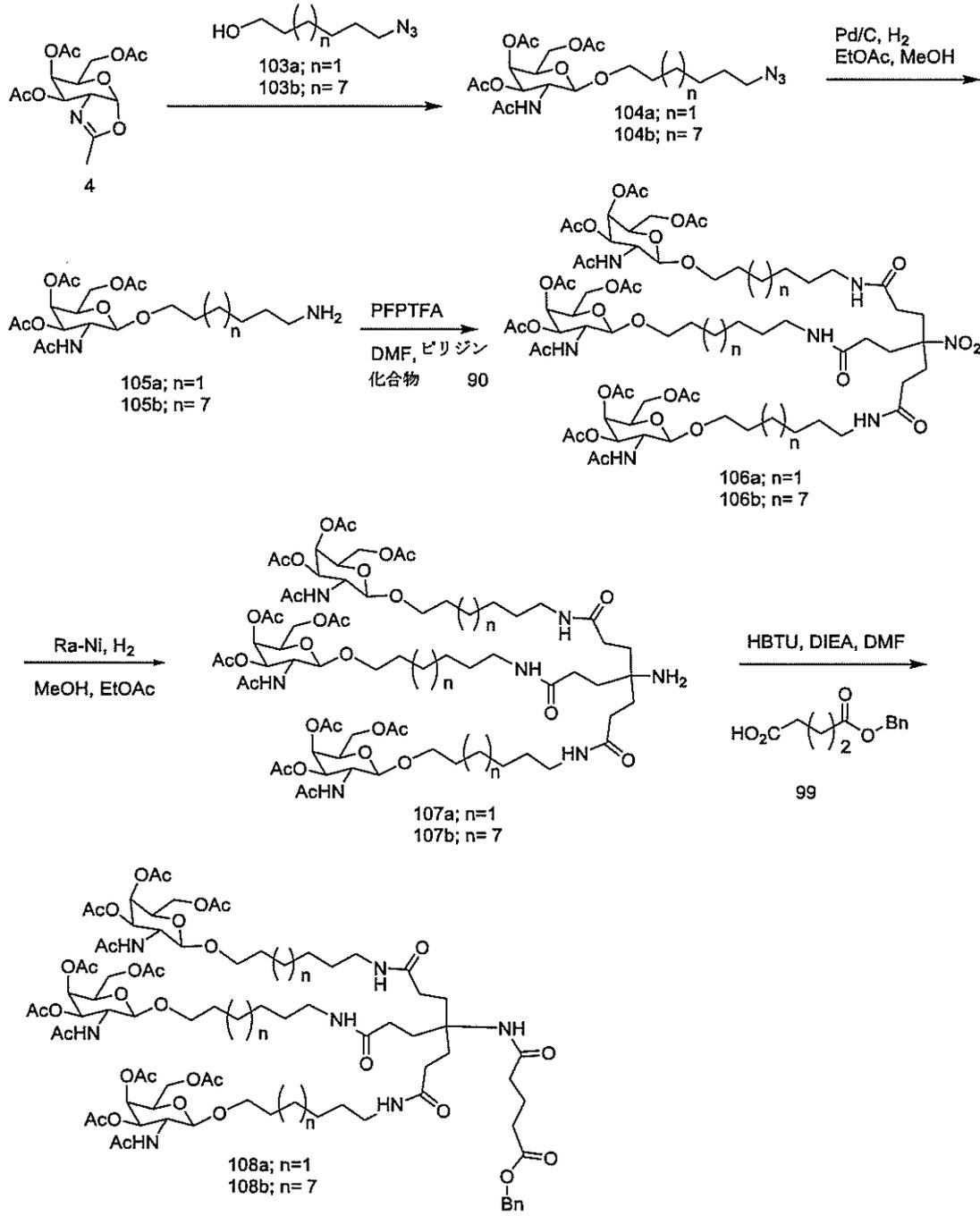
【 0 8 1 8 】

30

40

50

【化180】



10

20

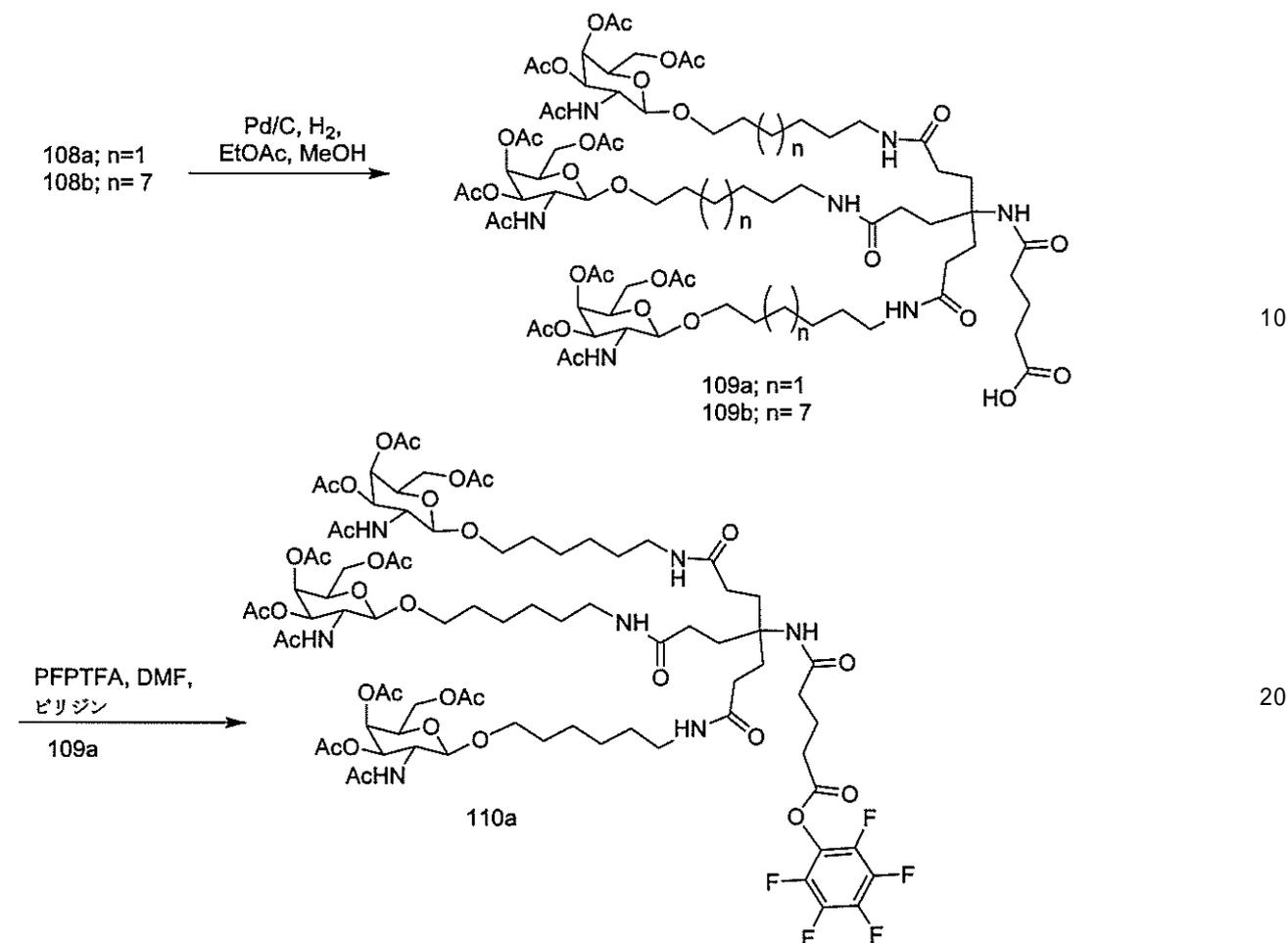
30

【0819】

40

50

【化 1 8 1】



【0 8 2 0】

化合物 4 (9 . 5 g , 2 8 . 8 m m o l e) を化合物 1 0 3 a または 1 0 3 b (3 8 m m o l e) で個別に処理し、ジクロロメタン (2 0 0 m L) 中の T M S O T f (0 . 5 当量) 及びモレキュラーシーブで処理し、室温で 1 6 時間攪拌した。この時点で、セライトを通して有機層を濾過し、その後、重炭酸ナトリウム、水、及びブラインで洗浄した。その後、有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で還元した。結果として生じた油状物をシリカゲルクロマトグラフィー (2 % 1 0 % メタノール / ジクロロメタン) によって精製して、8 0 % 超の収率で化合物 1 0 4 a 及び 1 0 4 b を得た。LCMS 及びプロトン NMR は、その構造と一致した。

【0 8 2 1】

化合物 1 0 4 a 及び 1 0 4 b を化合物 1 0 0 a ~ d (実施例 4 7) と同一の条件で処理して、9 0 % 超の収率で化合物 1 0 5 a 及び 1 0 5 b を得た。LCMS 及びプロトン NMR は、その構造と一致した。

【0 8 2 2】

化合物 1 0 5 a 及び 1 0 5 b を、化合物 9 0 1 a ~ d と同一の条件下、化合物 9 0 で個別に処理して、化合物 1 0 6 a (8 0 %) 及び 1 0 6 b (2 0 %) を得た。LCMS 及びプロトン NMR は、その構造と一致した。

【0 8 2 3】

化合物 1 0 6 a 及び 1 0 6 b を化合物 9 6 a ~ d (実施例 4 7) と同一の条件で処理して、1 0 7 a (6 0 %) 及び 1 0 7 b (2 0 %) を得た。LCMS 及びプロトン NMR は、その構造と一致した。

【0 8 2 4】

化合物 1 0 7 a 及び 1 0 7 b を化合物 9 7 a ~ d (実施例 4 7) と同一の条件で処理して

、40～60%の収率で化合物108a及び108bを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

【0825】

化合物108a(60%)及び108b(40%)を化合物100a～d(実施例47)と同一の条件で処理して、80%超の収率で化合物109a及び109bを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

【0826】

化合物109aを化合物101a～d(実施例47)と同一の条件で処理して、30～60%の収率で化合物110aを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。あるいは、化合物110bを化合物109bから開始して同様の方法で調製することができる。

10

実施例46：PFPEステル(オリゴヌクレオチド111)との共役のための一般的手順；ISIS 666881(GalNAc₃-10)の調製

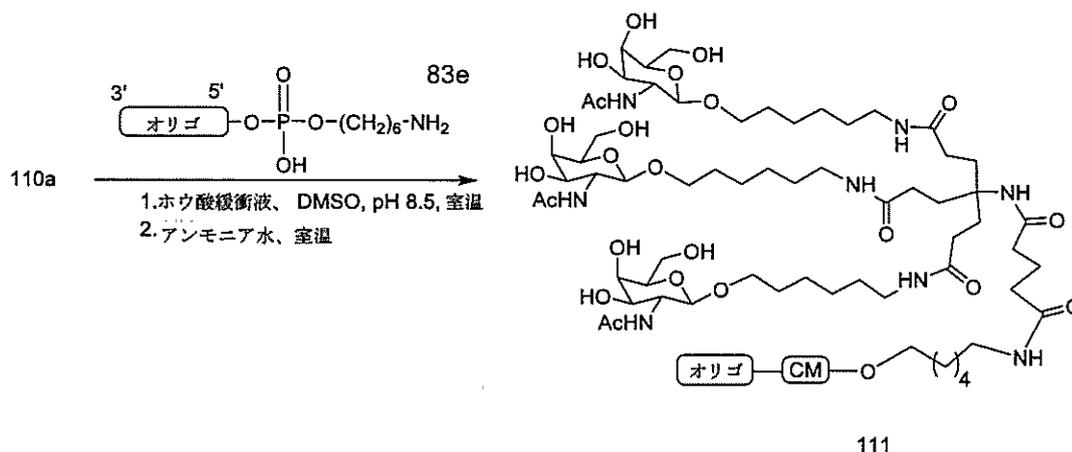
【0827】

標準の固相オリゴヌクレオチド手順を用いて5'-ヘキシルアミノ修飾オリゴヌクレオチドを合成し、精製した。5'-ヘキシルアミノ修飾オリゴヌクレオチドを0.1M四ホウ酸ナトリウム(pH8.5、200μL)中に溶解し、DMSO(50μL)中に溶解した3当量の選択されたPFPEステル化GalNAc₃クラスターを添加した。ASO溶液への添加時にPFPEステルが沈殿した場合、すべてのPFPEステルが溶解した状態になるまでDMSOを添加した。室温で約16時間混合した後、反応が完了した。結果として生じた溶液を水で希釈して12mLにし、その後、質量カットオフが3000Daのスピンドフィルター中、3000rpmで沈降させた。このプロセスを2回繰り返して、小分子不純物を除去した。その後、この溶液を凍結乾燥乾固させ、濃縮アンモニア水中に再溶解し、室温で2.5時間混合し、その後、真空内で濃縮して、アンモニアの大部分を除去した。共役オリゴヌクレオチドを精製し、RP-HPLCによって脱塩し、凍結乾燥させて、GalNAc₃共役オリゴヌクレオチドを得た。

20

【0828】

【化182】



30

40

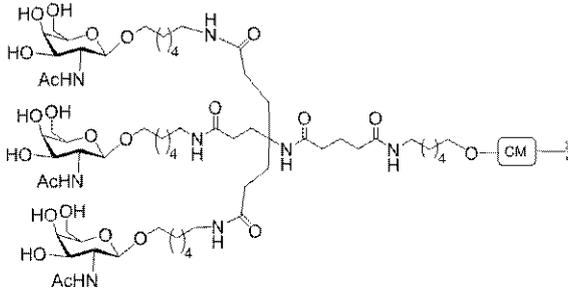
【0829】

オリゴヌクレオチド111をGalNAc₃-10と共役する。共役基GalNAc₃-10(GalNAc₃-10a)のGalNAc₃クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、以下のGalNAc₃-10で合成されたオリゴヌクレオチド(ISIS 666881)に示される-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-10(GalNAc₃-10a-CM-)の構造は、以下に示される：

【0830】

50

【化 1 8 3】



10

【0 8 3 1】

この一般的手順に従って、ISIS 666881を調製した。標準の固相オリゴヌクレオチド手順を用いて5'-ヘキシルアミノ修飾オリゴヌクレオチド (ISIS 660254) を合成し、精製した。ISIS 660254 (40 mg、5.2 μmol) を0.1 M 四ホウ酸ナトリウム pH 8.5 (200 μL) 中に溶解し、DMSO (50 μL) 中に溶解した3当量のPFPEステル (化合物110a) を添加した。ASO溶液への添加時にPFPEステルが沈殿した場合、PFPEステルを完全に溶解するためにさらなるDMSO (600 μL) が必要であった。室温で約16時間混合した後、反応が完了した。この溶液を水で希釈して全体積12 mLにし、質量カットオフが3000 Daのスピンドフィルター中、3000 rpmで沈降させた。このプロセスを2回繰り返して、小分子不純物を除去した。この溶液を凍結乾燥乾固させ、濃縮アンモニア水中に再溶解し、室温で2.5時間混合し、その後、真空内で濃縮して、アンモニアの大部分を除去した。共役オリゴヌクレオチドを精製し、RP-HPLCによって脱塩し、凍結乾燥させて、90重量%の収率でISIS 666881 (42 mg、4.7 μmol) を得た。

20

【0 8 3 2】

【表 2 6】

GalNAc₃-10共役オリゴヌクレオチド

ASO	配列(5'から3')	5'基	配列番号
ISIS 660254	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{-o-A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}$ $^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}^m\text{C}_{\text{es}}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	ヘキシルアミン	831
ISIS 666881	$\text{GalNAc}_3\text{-10}_{\text{a-o}}\text{-o-A}_{\text{do}}\text{G}_{\text{es}}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}^m\text{C}_{\text{es}}\text{A}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}$ $^m\text{C}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{es}}^m\text{C}_{\text{es}}^m\text{C}_{\text{es}}\text{T}_{\text{es}}\text{T}_{\text{e}}$	GalNAc ₃ -10	831

30

【0 8 3 3】

大文字は、各ヌクレオチドの核酸塩基を示し、mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオチドを示し、「d」は、-D-2'-デオキシリボヌクレオチドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結部 (PS) を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオチド間連結部 (PO) を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

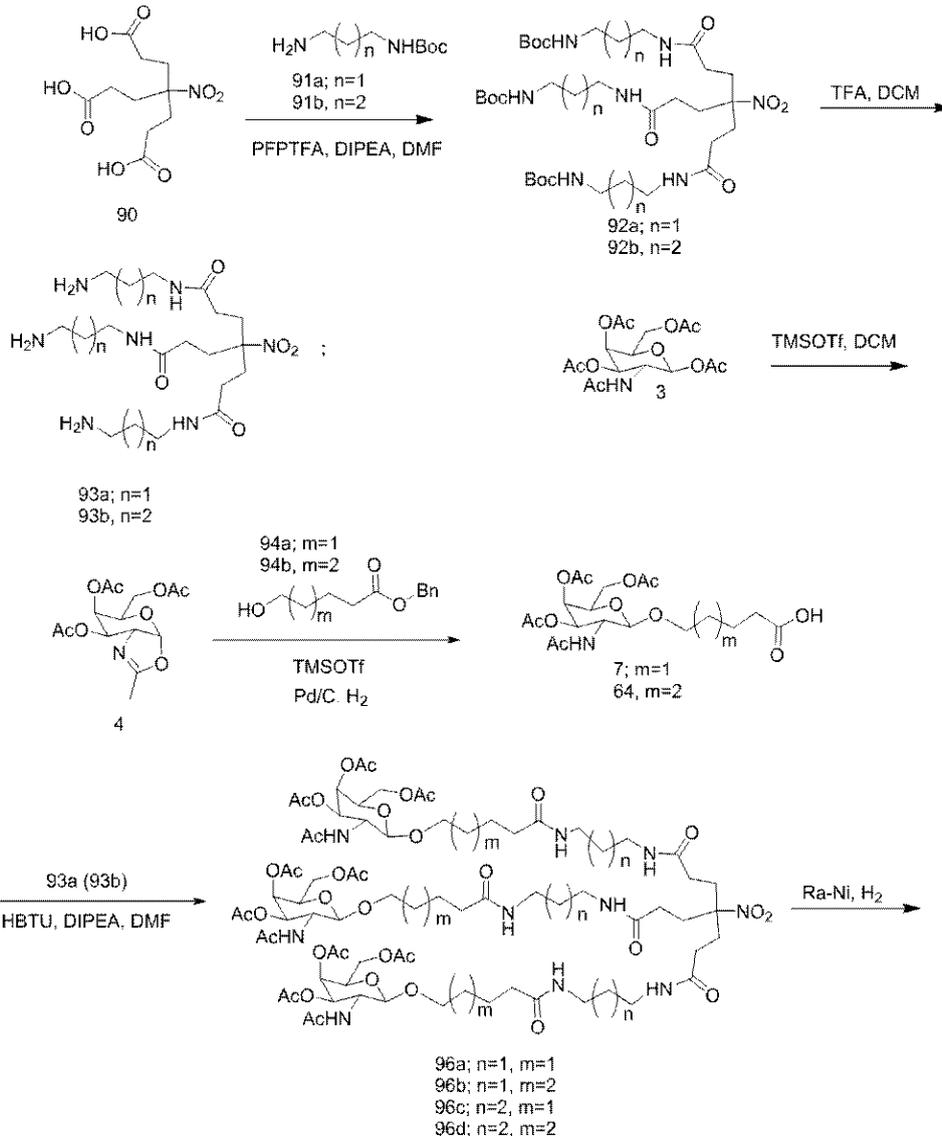
40

実施例 47: GalNAc₃-8を含むオリゴヌクレオチド102の調製

【0 8 3 4】

50

【化 1 8 4】



10

20

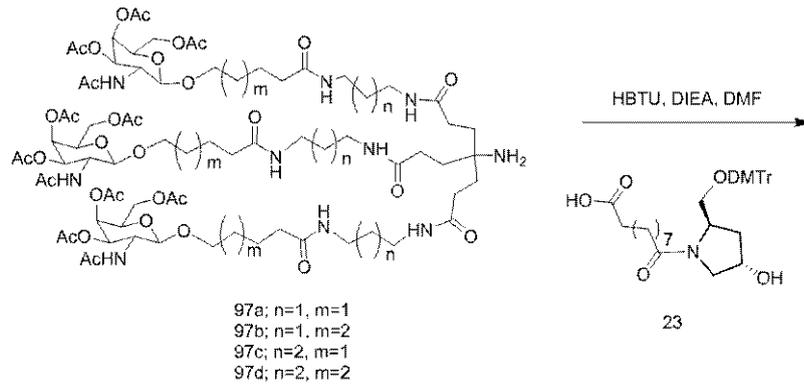
30

【 0 8 3 5】

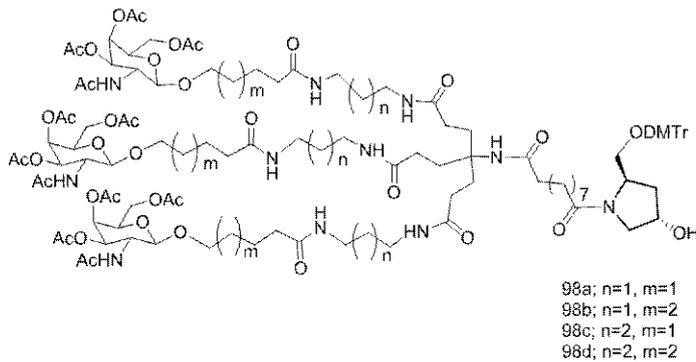
40

50

【化 1 8 5】



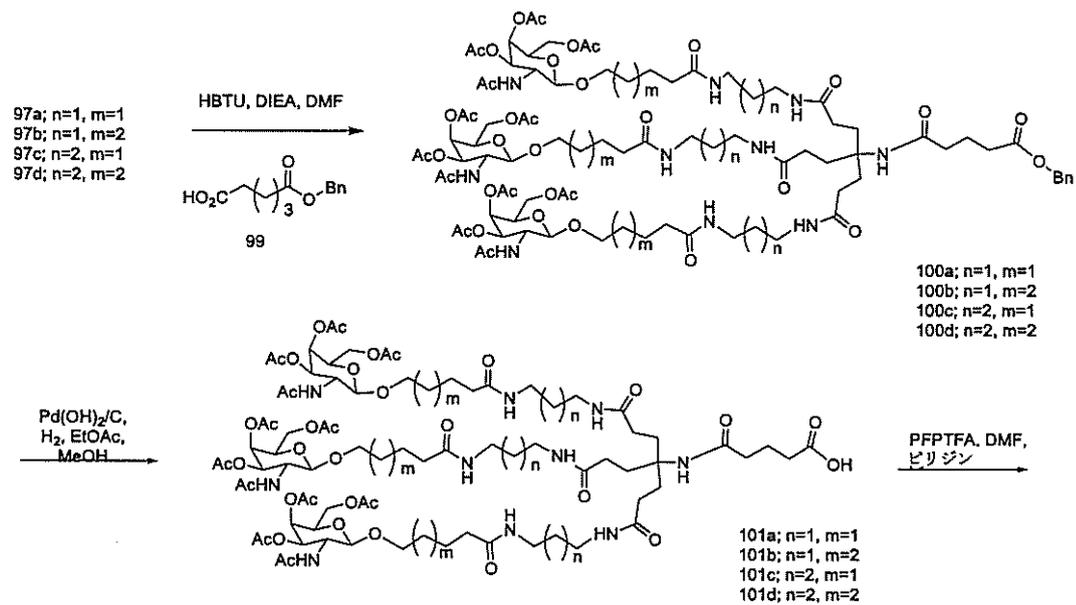
10



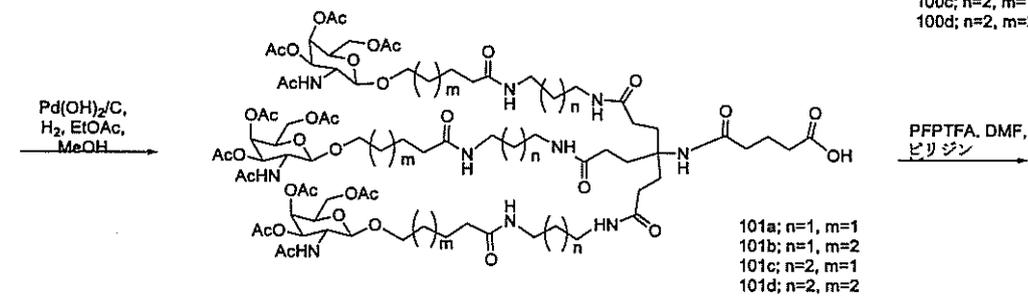
20

【 0 8 3 6】

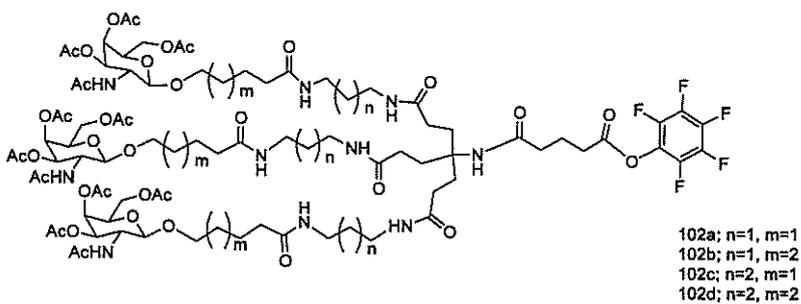
【化 1 8 6】



30



40



50

【0837】

三酸90(4g、14.43mmol)をDMF(120mL)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(12.35mL、72mmol)中に溶解した。トリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル(8.9mL、52mmol)をアルゴン下で滴加し、反応物を室温で30分間撹拌させた。Boc-ジアミン91aまたは91b(68.87mmol)をN,N-ジイソプロピルエチルアミン(12.35mL、72mmol)とともに添加し、反応物を室温で16時間撹拌させた。この時点で、DMFを減圧下で75%超、減量し、その後、混合物をジクロロメタン中に溶解した。有機層を重炭酸ナトリウム、水、及びブラインで洗浄した。その後、有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で減量して、油状物とした。結果として生じた油状物をシリカゲルクロマトグラフィー(2% 10%メタノール/ジクロロメタン)によって精製して、約80%の収率で化合物92a及び92bを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

10

【0838】

化合物92aまたは92b(6.7mmol)を20mLのジクロロメタン及び20mLのトリフルオロ酢酸で、室温で16時間処理した。結果として生じた溶液を蒸発させ、その後、メタノール中に溶解し、DOWEX-OH樹脂で30分間処理した。結果として生じた溶液を濾過し、減圧下で減量して油状物とすることで、85~90%の収率の化合物93a及び93bを得た。

【0839】

化合物7または64(9.6mmol)をDMF(20mL)中のHBTU(3.7g、9.6mmol)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(5mL)で15分間処理した。これに、化合物93aまたは93b(3mmol)のいずれかを添加し、室温で16時間撹拌させた。この時点で、DMFを減圧下で75%超、減量し、その後、混合物をジクロロメタン中に溶解した。有機層を重炭酸ナトリウム、水、及びブラインで洗浄した。その後、有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で減量して、油状物とした。結果として生じた油状物をシリカゲルクロマトグラフィー(5% 20%メタノール/ジクロロメタン)によって精製して、20~40%の収率で化合物96a~dを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

20

【0840】

化合物96a~d(0.75mmol)をラネーニッケル上で3時間、エタノール(75mL)中で個別に水素化した。この時点で、セライトを通して触媒を濾去し、エタノールを減圧下で除去して、80~90%の収率で化合物97a~dを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

30

【0841】

化合物23(0.32g、0.53mmol)をDMF(30mL)中のHBTU(0.2g、0.53mmol)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.19mL、1.14mmol)で15分間処理した。これに、化合物97a~d(0.38mmol)を個別に添加し、室温で16時間撹拌させた。この時点で、DMFを減圧下で75%超、減量し、その後、混合物をジクロロメタン中に溶解した。有機層を重炭酸ナトリウム、水、及びブラインで洗浄した。その後、有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で減量して、油状物とした。結果として生じた油状物をシリカゲルクロマトグラフィー(2% 20%メタノール/ジクロロメタン)によって精製して、30~40%の収率で化合物98a~dを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

40

【0842】

化合物99(0.17g、0.76mmol)をDMF(50mL)中のHBTU(0.29g、0.76mmol)及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.35mL、2.0mmol)で15分間処理した。これに、化合物97a~d(0.51mmol)を個別に添加し、室温で16時間撹拌させた。この時点で、DMFを減圧下で7

50

5%超、減量し、その後、混合物をジクロロメタン中に溶解した。有機層を重炭酸ナトリウム、水、及びブラインで洗浄した。その後、有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で減量して、油状物とした。結果として生じた油状物をシリカゲルクロマトグラフィー（5% 20%メタノール/ジクロロメタン）によって精製して、40~60%の収率で化合物100a~dを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

【0843】

化合物100a~d（0.16mmole）を、10%Pd(OH)₂/C上で3時間、メタノール/酢酸エチル（1:1、50mL）中で個別に水素化した。この時点で、セライトを通して触媒を濾去し、有機物を減圧下で除去して、80~90%の収率で化合物101a~dを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

10

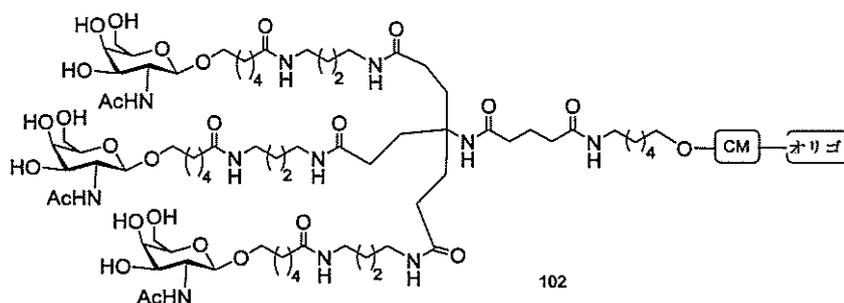
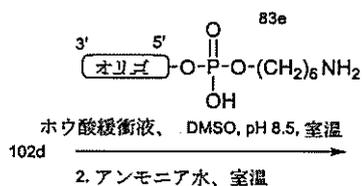
【0844】

化合物101a~d（0.15mmole）をDMF（15mL）及びピリジン（0.016mL、0.2mmole）中に個別に溶解した。トリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル（0.034mL、0.2mmole）をアルゴン下で滴加し、反応物を室温で30分間攪拌させた。この時点で、DMFを減圧下で75%超、減量し、その後、混合物をジクロロメタン中に溶解した。有機層を重炭酸ナトリウム、水、及びブラインで洗浄した。その後、有機層を分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で減量して、油状物とした。結果として生じた油状物をシリカゲルクロマトグラフィー（2% 5%メタノール/ジクロロメタン）によって精製して、約80%の収率で化合物102a~dを得た。LCMS及びプロトンNMRは、その構造と一致した。

20

【0845】

【化187】



30

【0846】

実施例46に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-8共役基を含むオリゴマー化合物102を調製した。共役基GalNAc₃-8（GalNAc₃-8a）のGalNAc₃クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。好ましい一実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。

40

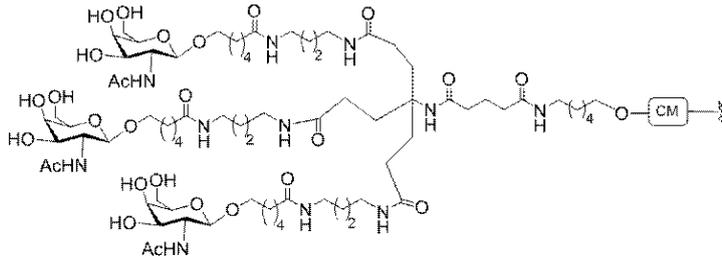
【0847】

GalNAc₃-8（GalNAc₃-8a-CM-）の構造は、以下に示される：

【0848】

50

【化 1 8 8】

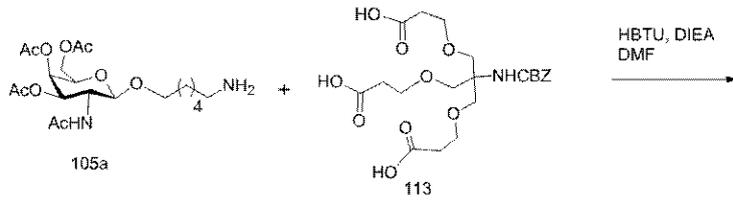
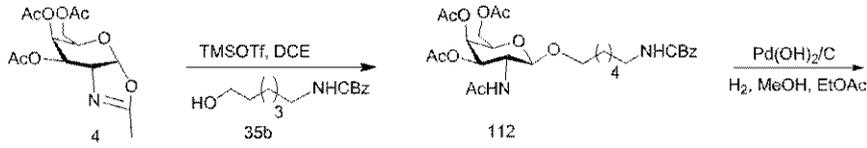


実施例 48 : GalNAc₃-7 を含むオリゴヌクレオチド 119 の調製

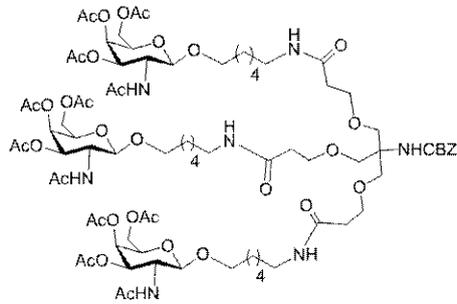
10

【 0 8 4 9】

【化 1 8 9】



20



114

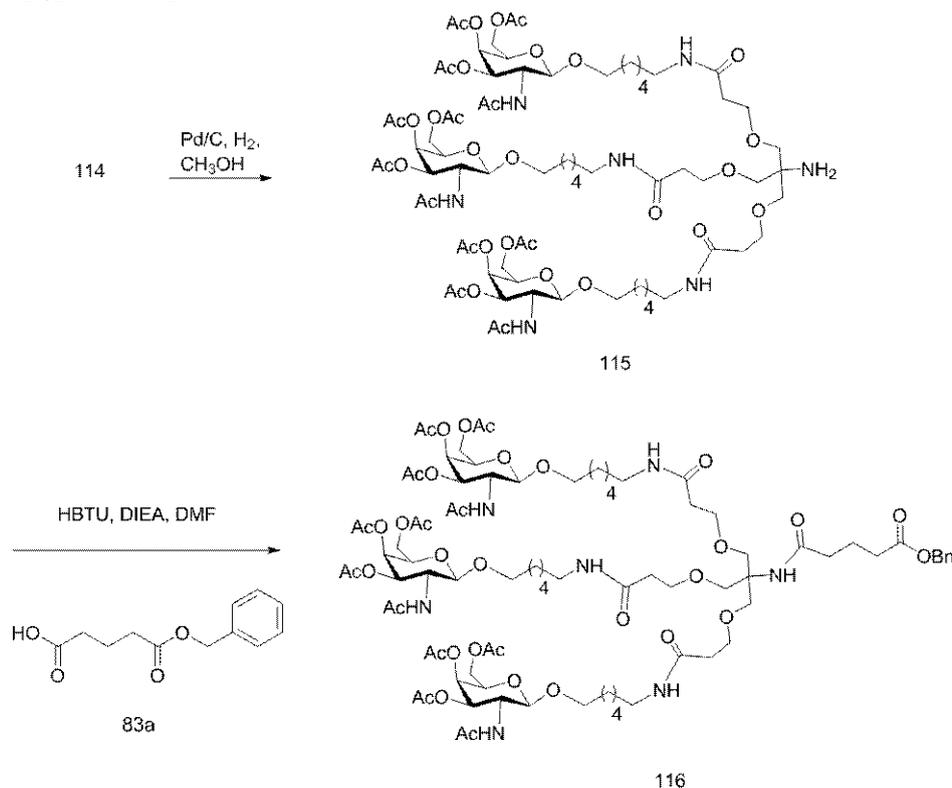
30

【 0 8 5 0】

40

50

【化190】



10

20

【0851】

文献 (J . Med . Chem . 2004 , 47 , 5798 - 5808) に記載される手順に従って化合物 112 を合成した。

【0852】

化合物 112 (5 g , 8 . 6 mmol) を 1 : 1 メタノール / 酢酸エチル (22 mL / 22 mL) 中に溶解した。炭素 (0 . 5 g) 上水酸化パラジウムを添加した。反応混合物を室温で 12 時間、水素下で撹拌した。セライトパッドを通して反応混合物を濾過し、そのパッドを 1 : 1 メタノール / 酢酸エチルで洗浄した。濾液と洗浄物を合わせ、濃縮乾固させて、化合物 105 a (定量的) を得た。この構造を、LCMS によって確認した。

30

【0853】

化合物 113 (1 . 25 g , 2 . 7 mmol) 、 HBTU (3 . 2 g , 8 . 4 mmol) 、及び DIEA (2 . 8 mL , 16 . 2 mmol) を無水 DMF (17 mL) 中に溶解し、反応混合物を室温で 5 分間撹拌した。これに、無水 DMF (20 mL) 中の化合物 105 a (3 . 77 g , 8 . 4 mmol) の溶液を添加した。反応物を室温で 6 時間撹拌した。溶媒を減圧下で除去して、油状物を得た。残渣を CH_2Cl_2 (100 mL) 中に溶解し、飽和 NaHCO_3 水溶液 (100 mL) 及びブライン (100 mL) で洗浄した。有機相を分離し、乾燥させ (Na_2SO_4) 、濾過し、蒸発させた。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、ジクロロメタン中の 10 ~ 20 % MeOH で溶出して、化合物 114 (1 . 45 g , 30 %) を得た。この構造を、LCMS 及び ^1H NMR 分析によって確認した。

40

【0854】

化合物 114 (1 . 43 g , 0 . 8 mmol) を 1 : 1 メタノール / 酢酸エチル (4 mL / 4 mL) 中に溶解した。パラジウム炭素 (湿性、0 . 14 g) を添加した。反応混合物を水素でフラッシュし、室温で 12 時間、水素下で撹拌した。セライトパッドを通して反応混合物を濾過した。このセライトパッドをメタノール / 酢酸エチル (1 : 1) で洗浄した。濾液と洗浄物を一つに合わせ、減圧下で蒸発させて、化合物 115 (定量的) を得た。この構造を、LCMS 及び ^1H NMR 分析によって確認した。

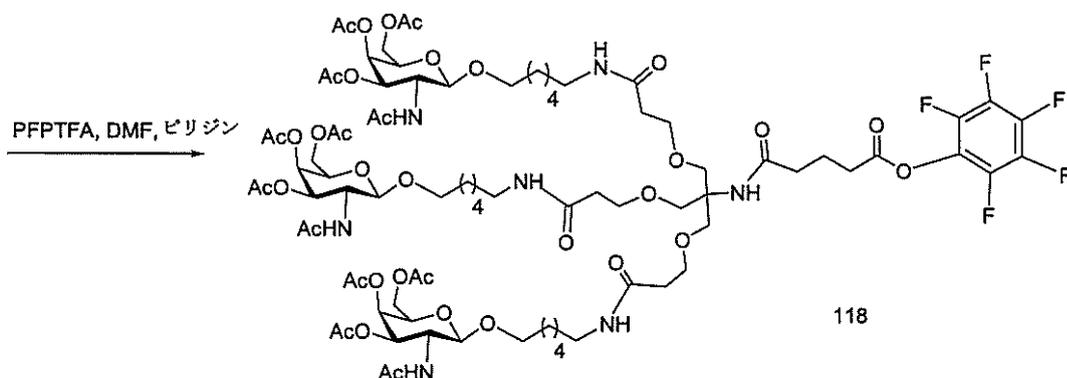
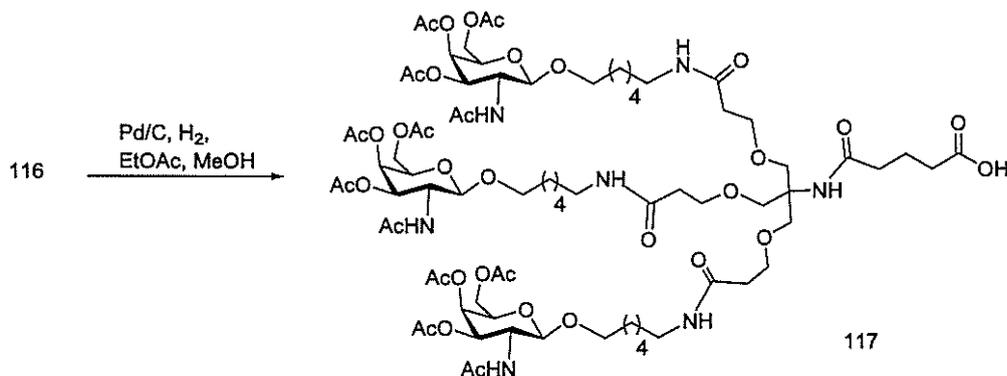
【0855】

50

化合物 83a (0.17 g, 0.75 mmol)、HBTU (0.31 g, 0.83 mmol)、及び DIEA (0.26 mL, 1.5 mmol) を無水 DMF (5 mL) 中に溶解し、反応混合物を室温で 5 分間攪拌した。これに、無水 DMF 中の化合物 115 (1.22 g, 0.75 mmol) の溶液を添加し、反応物を室温で 6 時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣を CH₂Cl₂ 中に溶解した。有機層を飽和 NaHCO₃ 水溶液及びブラインで洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させ、濾過した。有機層を濃縮乾固させ、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、ジクロロメタン中の 3 ~ 15 % MeOH で溶出して、化合物 116 (0.84 g, 61%) を得た。この構造を、LCMS 及び ¹H NMR 分析によって確認した。

【0856】

【化191】



【0857】

化合物 116 (0.74 g, 0.4 mmol) を 1 : 1 メタノール / 酢酸エチル (5 mL / 5 mL) 中に溶解した。パラジウム炭素 (湿性、0.074 g) を添加した。反応混合物を水素でフラッシュし、室温で 12 時間、水素下で攪拌した。セライトパッドを通して反応混合物を濾過した。このセライトパッドをメタノール / 酢酸エチル (1 : 1) で洗浄した。濾液と洗浄物を一つに合わせ、減圧下で蒸発させて、化合物 117 (0.73 g, 98%) を得た。この構造を、LCMS 及び ¹H NMR 分析によって確認した。

【0858】

化合物 117 (0.63 g, 0.36 mmol) を無水 DMF (3 mL) 中に溶解した。この溶液に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (70 μL, 0.4 mmol) 及びトリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル (72 μL, 0.42 mmol) を添加した。反応混合物を室温で 12 時間攪拌し、飽和 NaHCO₃ 水溶液に注いだ。この混合物をジクロロメタンで抽出し、ブラインで洗浄し、無水 Na₂SO₄ 上で乾燥させた。このジクロロメタン溶液を濃縮乾固させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、ジクロロメタン中の 5 ~ 10 % MeOH で溶出して、化合物 118 (0.51 g, 79%) を得た。この構造を、LCMS と、¹H ならびに ¹H 及び ¹⁹F NMR によって確認した。

【0859】

10

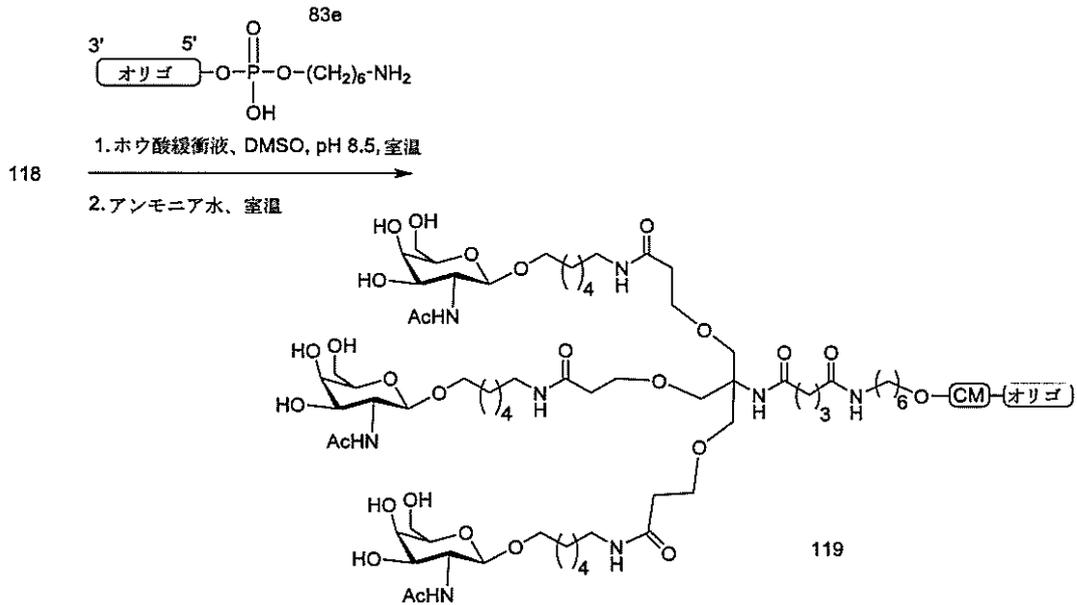
20

30

40

50

【化 1 9 2】



10

【 0 8 6 0】

実施例 46 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-7 共役基を含むオリゴマー化合物 119 を調製した。共役基 GalNAc₃-7 (GalNAc₃-7a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。

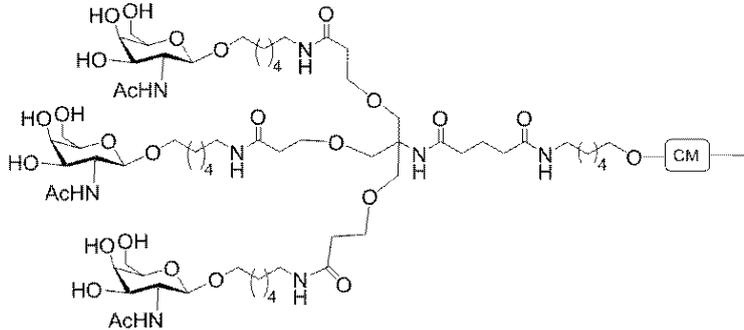
20

【 0 8 6 1】

GalNAc₃-7 (GalNAc₃-7a-CM-) の構造は、以下に示される：

【 0 8 6 2】

【化 1 9 3】

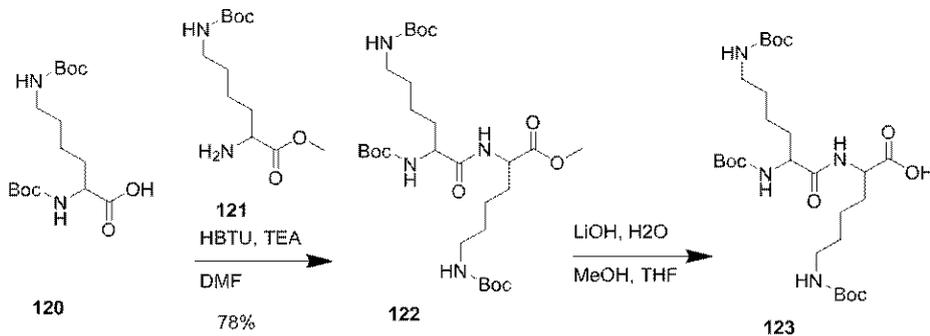


30

実施例 49：GalNAc₃-5 を含むオリゴヌクレオチド 132 の調製

【 0 8 6 3】

【化 1 9 4】



40

50

【0864】

化合物120 (14.01 g, 40 mmol) 及び HBTU (14.06 g, 37 mmol) を無水 DMF (80 mL) 中に溶解した。トリエチルアミン (11.2 mL, 80.35 mmol) を添加し、5 分間攪拌した。反応混合物を氷浴中で冷却し、無水 DMF (20 mL) 中の化合物121 (10 g, mmol) の溶液を添加した。さらなるトリエチルアミン (4.5 mL, 32.28 mmol) を添加し、反応混合物をアルゴン雰囲気下で18時間攪拌した。TLC (1:1の酢酸エチル:ヘキサン; $R_f = 0.47$) によって反応を監視した。溶媒を減圧下で除去した。残渣を EtOAc (300 mL) 中に取り込み、1 M NaHSO₄ (3 × 150 mL)、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (3 × 150 mL)、及びブライン (2 × 100 mL) で洗浄した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥させた。乾燥剤を濾去し、有機層を回転蒸発によって濃縮した。粗混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、ヘキサン中の35~50% EtOAcを用いて溶出して、化合物122 (15.50 g, 78.13%) を得た。この構造を、LCMS 及び ¹H NMR 分析によって確認した。質量 (m/z) 589.3 [M+H]⁺。

10

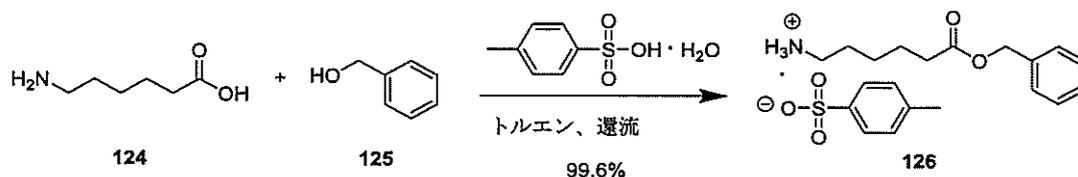
【0865】

水 (20 mL) 及び THF (10 mL) 中の LiOH (92.15 mmol) の溶液を、メタノール (15 mL) 中に溶解した化合物122の冷溶液 (7.75 g, 13.16 mmol) に添加した。反応混合物を室温で45分間攪拌し、TLC (1:1のEtOAc:ヘキサン) によって監視した。反応混合物を減圧下で濃縮して、半分の体積にした。残りの溶液を氷浴中で冷却して、濃縮 HCl を添加して中和した。反応混合物を希釈し、EtOAc (120 mL) で抽出し、ブライン (100 mL) で洗浄した。エマルジョンが生じたが、一晩静置すると濁りがなくなった。有機層を分離し、乾燥させ (Na₂SO₄)、濾過し、蒸発させて、化合物123 (8.42 g) を得た。質量が大きすぎる原因はおそらく残留塩である。LCMS は、この構造と一致した。この生成物をさらに精製することなく使用した。M.W. 計算値: 574.36、M.W. 実測値: 575.3 [M+H]⁺。

20

【0866】

【化195】



30

【0867】

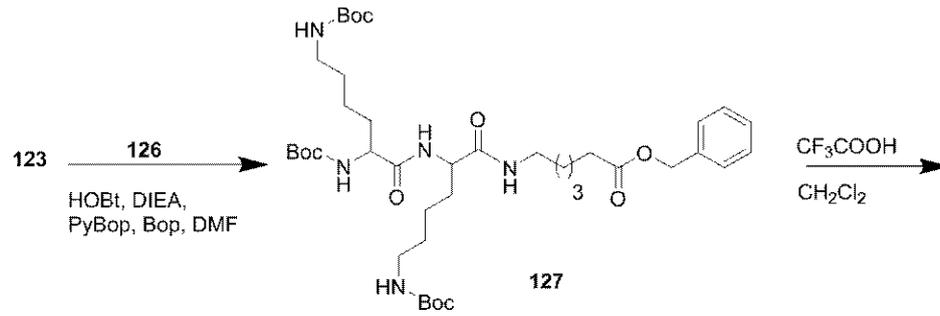
文献 (J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 958-963) に記載される手順に従って化合物126を合成した。

【0868】

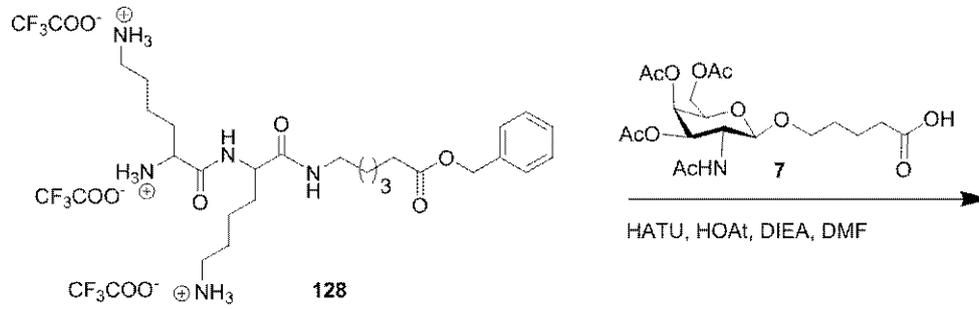
40

50

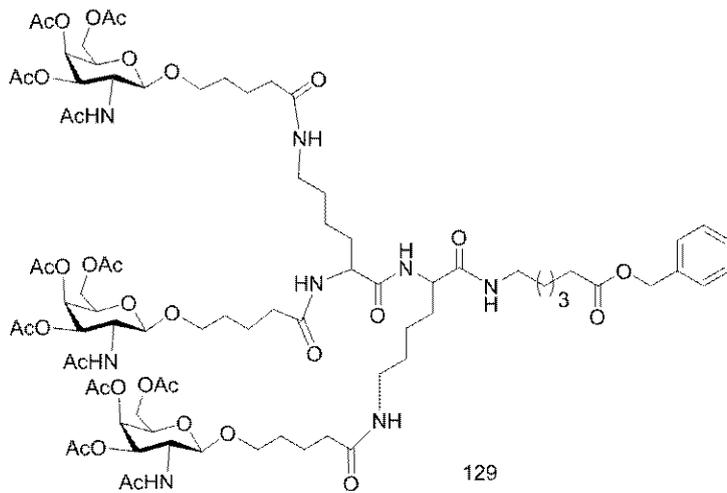
【化 1 9 6】



10



20



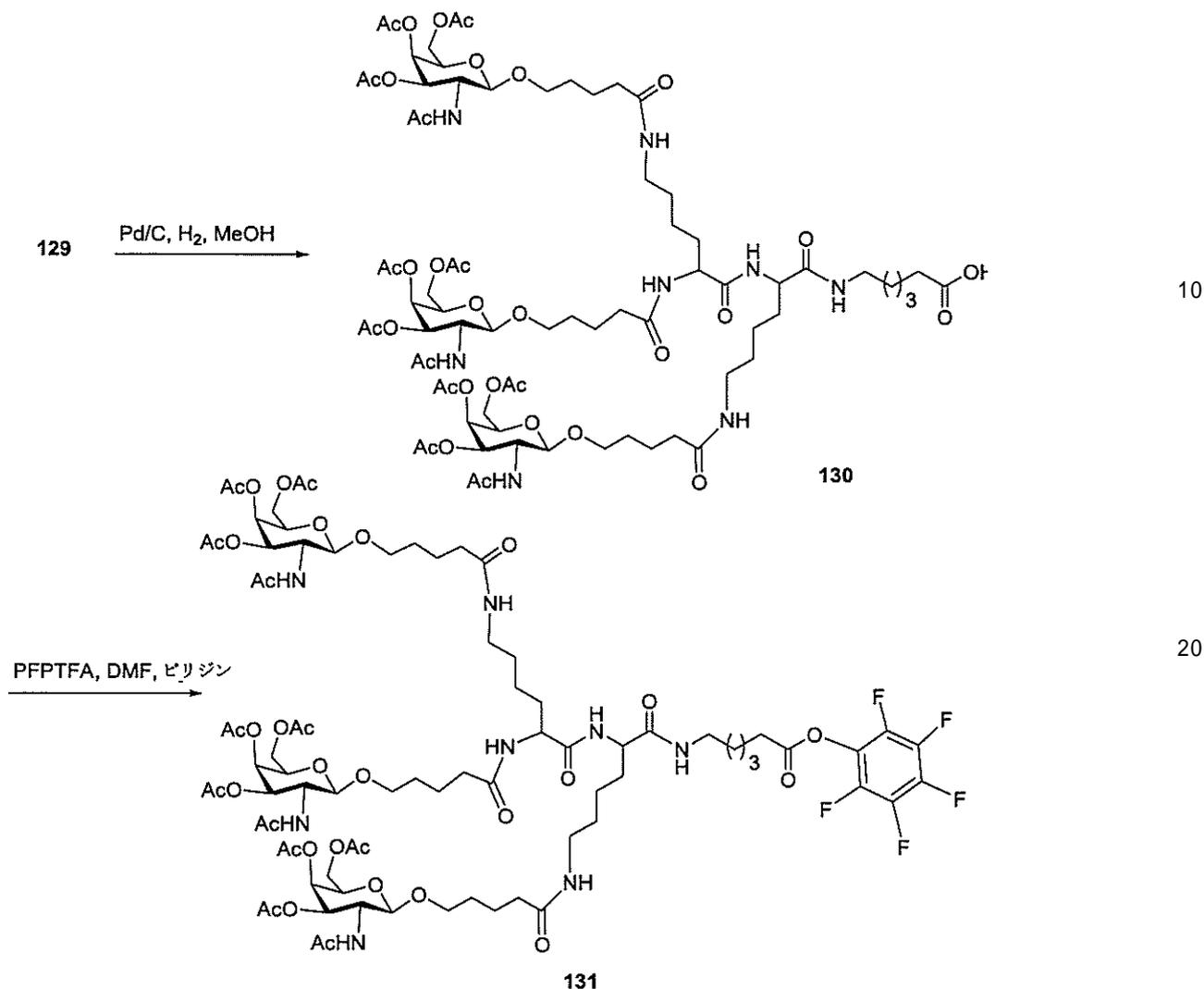
30

【 0 8 6 9 】

40

50

【化 1 9 7】



【0 8 7 0】

化合物 1 2 3 (7 . 4 1 9 g、1 2 . 9 1 m m o l)、H O B t (3 . 4 9 g、2 5 . 8 2 m m o l)、及び化合物 1 2 6 (6 . 3 3 g、1 6 . 1 4 m m o l)をDMF (4 0 m L)中に溶解し、結果として生じた反応混合物を氷浴中で冷却した。これに、N , N - ジイソプロピルエチルアミン (4 . 4 2 m L、2 5 . 8 2 m m o l)、P y B o p (8 . 7 g、1 6 . 7 m m o l)、続いて、B o pカップリング試薬 (1 . 1 7 g、2 . 6 6 m m o l)をアルゴン雰囲気下で添加した。氷浴を除去し、溶液を室温まで温めた。1時間後に反応が完了したことを、T L C (8 9 : 1 0 : 1のD C M : M e O H : A A)によって決定した。反応混合物を減圧下で濃縮した。残渣をE t O A c (2 0 0 m L)中に溶解し、1 M N a H S O 4 (3 × 1 0 0 m L)、飽和N a H C O 3水溶液 (3 × 1 0 0 m L)、及びブライン (2 × 1 0 0 m L)で洗浄した。有機相を分離し、乾燥させ (N a 2 S O 4)、濾過し、濃縮した。残渣を50%ヘキサン / E t O A c : 100% E t O A cの勾配でのシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製して、白色の泡状物として化合物 1 2 7 (9 . 4 g)を得た。L C M S及び¹H N M Rは、その構造と一致した。質量 (m / z) 7 7 8 . 4 [M + H] ⁺。

【0 8 7 1】

トリフルオロ酢酸 (1 2 m L)をジクロロメタン (1 2 m L)中の化合物 1 2 7 (1 . 5 7 g、2 . 0 2 m m o l)の溶液に添加し、室温で1時間攪拌した。反応混合物を減圧下でトルエン (3 0 m L)と共蒸発乾固させた。得られた残渣をアセトニトリル (3 0 m L)及びトルエン (4 0 m L)と2回共蒸発させて、トリフルオロ酢酸塩として化合物 1 2

8 (1 . 6 7 g) を得て、さらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS及び ^1H NMRは、その構造と一致した。質量 (m/z) 478.2 [M+H] $^+$ 。

【0872】

丸底フラスコ内で、化合物7 (0 . 4 3 g、0 . 9 6 3 mmol)、HATU (0 . 3 5 g、0 . 9 1 mmol)、及びHOAt (0 . 0 3 5 g、0 . 2 6 mmol) を一つに合わせ、減圧下、 P_2O_5 上で4時間乾燥させ、その後、無水DMF (1 mL) 中に溶解し、5分間撹拌した。これに無水DMF (0 . 2 mL) 及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン (0 . 2 mL) 中の化合物128 (0 . 2 0 g、0 . 2 6 mmol) の溶液を添加した。反応混合物をアルゴン雰囲気下、室温で撹拌した。30分間後に反応が完了したことを、LCMS及びTLC (7 % MeOH / DCM) によって決定した。反応混合物を減圧下で濃縮した。残渣をDCM (3 0 mL) 中に溶解し、1 M NaHSO_4 (3 \times 2 0 mL)、飽和 NaHCO_3 水溶液 (3 \times 2 0 mL)、及びブライン (3 \times 2 0 mL) で洗浄した。有機相を分離し、 Na_2SO_4 上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をジクロロメタン中の5 ~ 1 5 % MeOHを用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製して、化合物129 (9 6 . 6 mg) を得た。LCMS及び ^1H NMRは、この構造と一致する。質量 (m/z) 883.4 [M+2H] $^+$ 。

10

【0873】

20 mLのシンチレーションバイアル内で化合物129 (0 . 0 9 g、0 . 0 5 1 mmol) をメタノール (5 mL) 中に溶解した。これに、少量の10% Pd/C (0 . 0 1 5 mg) を添加し、反応容器を H_2 ガスでフラッシュした。反応混合物を室温で18時間、 H_2 雰囲気下で撹拌した。セライトパッドを通して反応混合物を濾過し、このセライトパッドをメタノールで洗浄した。濾液洗浄物を一つにプールし、減圧下で濃縮して、化合物130 (0 . 0 8 g) を得た。LCMS及び ^1H NMRは、その構造と一致した。この生成物をさらに精製することなく使用した。質量 (m/z) 838.3 [M+2H] $^+$ 。

20

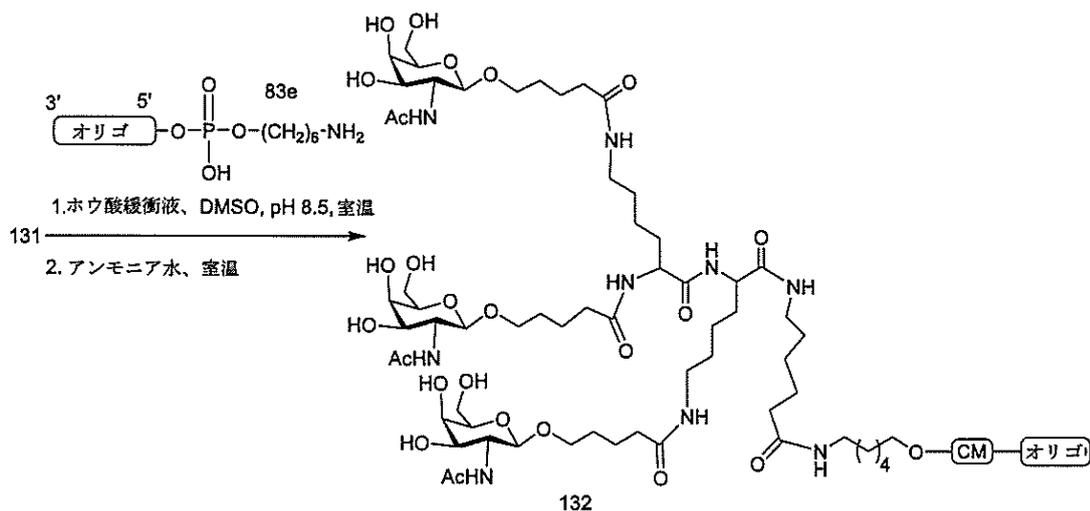
【0874】

10 mLの先の尖った丸底フラスコに、化合物130 (7 5 . 8 mg、0 . 0 4 6 mmol)、0 . 3 7 Mピリジン/DMF (2 0 0 μL)、及び撹拌子を添加した。この溶液に、0 . 7 Mトリフルオロ酢酸ペンタフルオロフェニル/DMF (1 0 0 μL) を撹拌しながら滴加した。1時間後に反応が完了したことを、LCMSによって決定した。溶媒を減圧下で除去し、残渣を CHCl_3 (約10 mL) 中に溶解した。有機層を NaHSO_4 (1 M、1 0 mL)、飽和 NaHCO_3 水溶液 (1 0 mL)、及びブライン (1 0 mL) にそれぞれ3回分配した。有機相を分離し、 Na_2SO_4 上で乾燥させ、濾過し、濃縮して、化合物131 (7 7 . 7 mg) を得た。LCMSは、この構造と一致した。さらに精製することなく使用した。質量 (m/z) 921.3 [M+2H] $^+$ 。

30

【0875】

【化198】



40

50

【 0 8 7 6 】

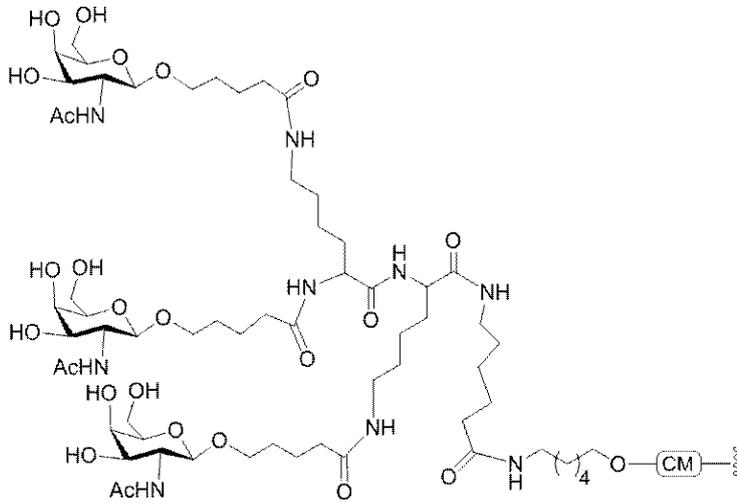
実施例 4 6 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-5 共役基を含むオリゴマー化合物 1 3 2 を調製した。共役基 GalNAc₃-5 (GalNAc₃-5_a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)- である。

【 0 8 7 7 】

GalNAc₃-5 (GalNAc₃-5_a-CM-) の構造は、以下に示される：

【 0 8 7 8 】

【 化 1 9 9 】



実施例 5 0 : GalNAc₄-1 1 を含むオリゴヌクレオチド 1 4 4 の調製

【 0 8 7 9 】

10

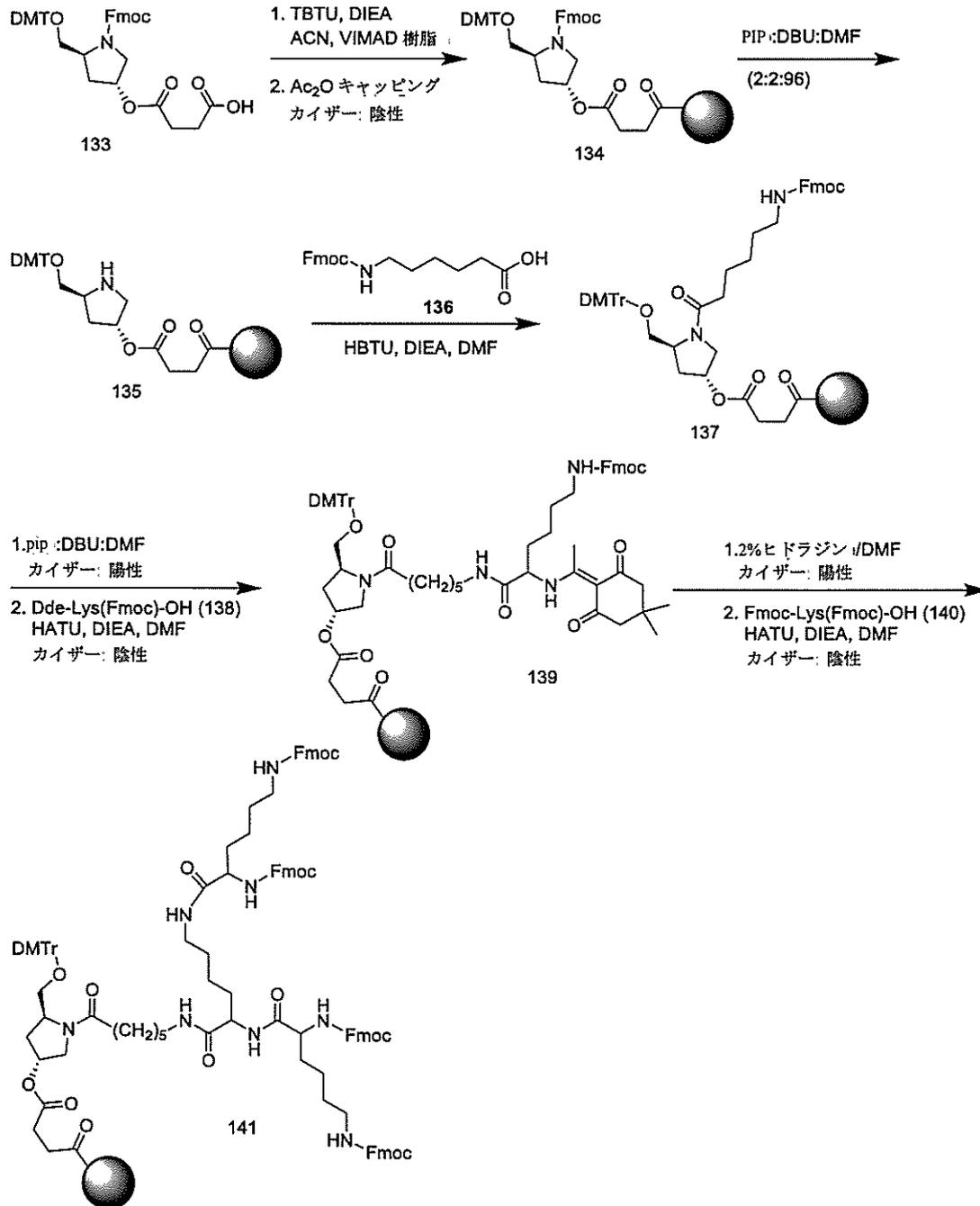
20

30

40

50

【化200】



10

20

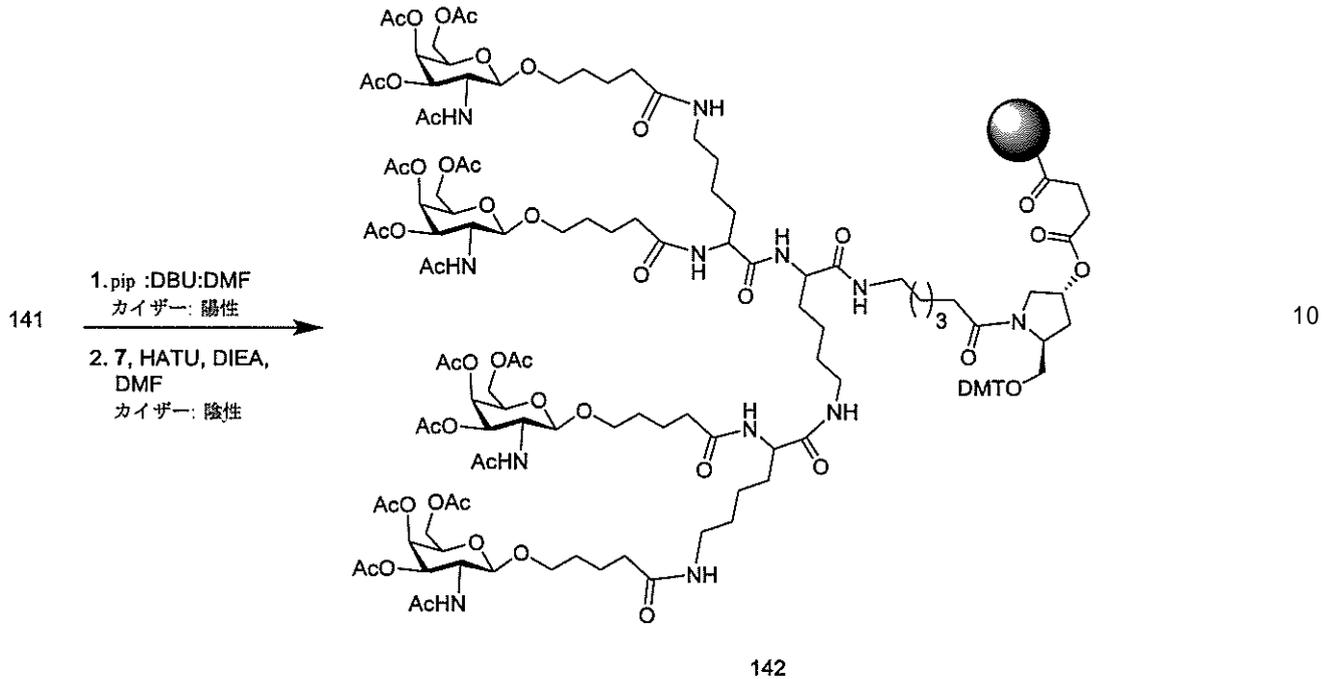
30

【0880】

40

50

【化201】



【0881】

化合物134の合成。Merrifieldフラスコに、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジクロロメタン、及びアセトニトリルで洗浄したアミノメチルVIMAD樹脂(2.5g、450 μ mol/g)を添加した。この樹脂は、アセトニトリル(4mL)中で膨潤した。20(1.0mmol、0.747g)、TBTU(1.0mmol、0.321g)、アセトニトリル(5mL)、及びDIEA(3.0mmol、0.5mL)を添加して、化合物133を100mLの丸底フラスコ内で事前に活性化した。この溶液を5分間攪拌させ、その後、振盪しながらMerrifieldフラスコに添加した。懸濁液を3時間振盪させた。反応混合物を排出し、樹脂をアセトニトリル、DMF、及びDCMで洗浄した。DCM中500nm(消光係数=76000)でDMTカチオンの吸光度を測定することにより新たな樹脂負荷量を定量化し、238 μ mol/gであると決定した。無水酢酸溶液中で10分間3回懸濁することにより、この樹脂をキャップした。

30

【0882】

反復Fmocベース固相ペプチド合成法を用いて、固体支持体に結合された化合物141を合成した。少量の固体支持体を回収し、アンモニア水(28~30重量%)中に6時間懸濁した。切断された化合物をLC-MSによって分析した。観察された質量は、その構造と一致した。質量(m/z)1063.8[M+2H]⁺。

【0883】

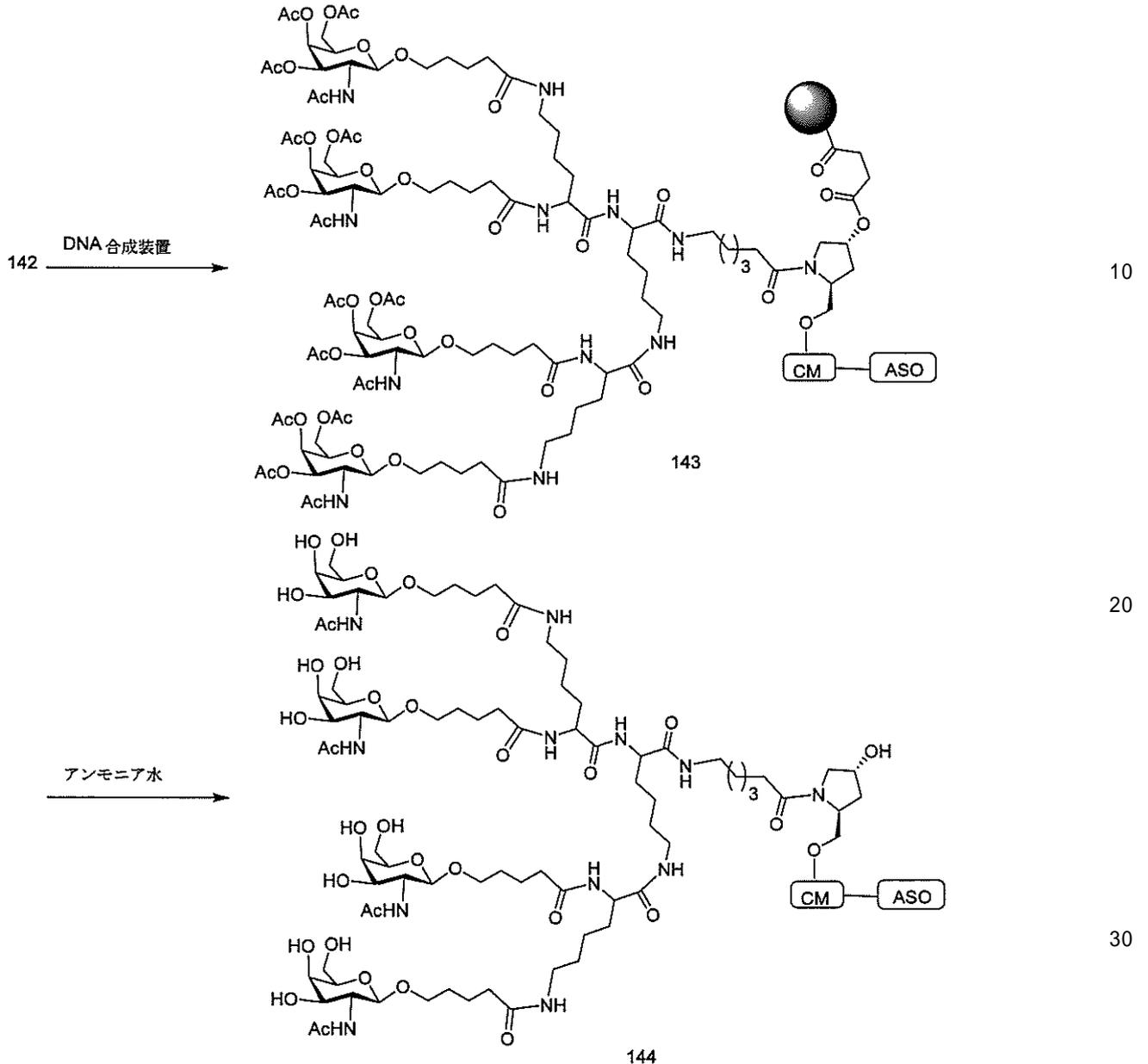
固相ペプチド合成法を用いて、固体支持体に結合された化合物142を合成した。

【0884】

40

50

【化 2 0 2】



【 0 8 8 5】

DNA 合成装置において標準の固相合成を用いて、固体支持体に結合された化合物 143 を合成した。

【 0 8 8 6】

固体支持体に結合された化合物 143 をアンモニア水 (28 - 30 重量%) 中に懸濁し、55 で 16 時間加熱した。溶液を冷却し、固体支持体を濾過した。濾液を濃縮し、残渣を水中に溶解し、強アニオン交換カラム上で HPLC によって精製した。全長化合物 144 を含有する画分を一つにプールし、脱塩した。結果として生じた GalNAc₄-11 共役オリゴマー化合物を LC-MS によって分析し、観察された質量は、その構造と一致した。

【 0 8 8 7】

共役基 GalNAc₄-11 (GalNAc₄-11a) の GalNAc₄ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)- である。

10

20

30

40

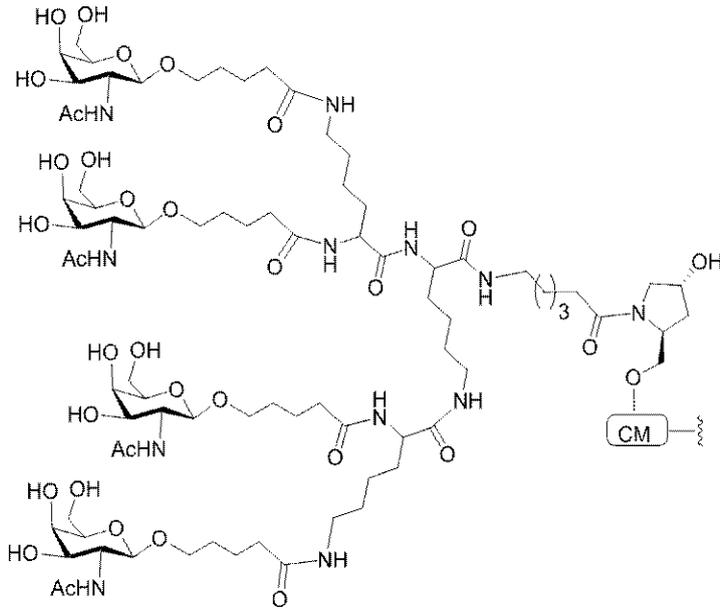
50

【0888】

GalNAc₄-11 (GalNAc₄-11_a-CM) の構造は、以下に示される：

【0889】

【化203】



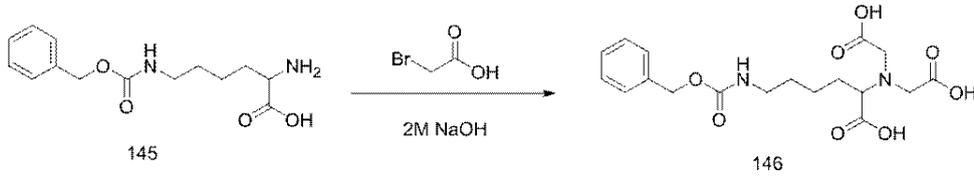
10

20

実施例51：GalNAc₃-6を含むオリゴヌクレオチド155の調製

【0890】

【化204】



【0891】

文献 (Analytical Biochemistry 1995, 229, 54-60) に記載されるように、化合物146を合成した。

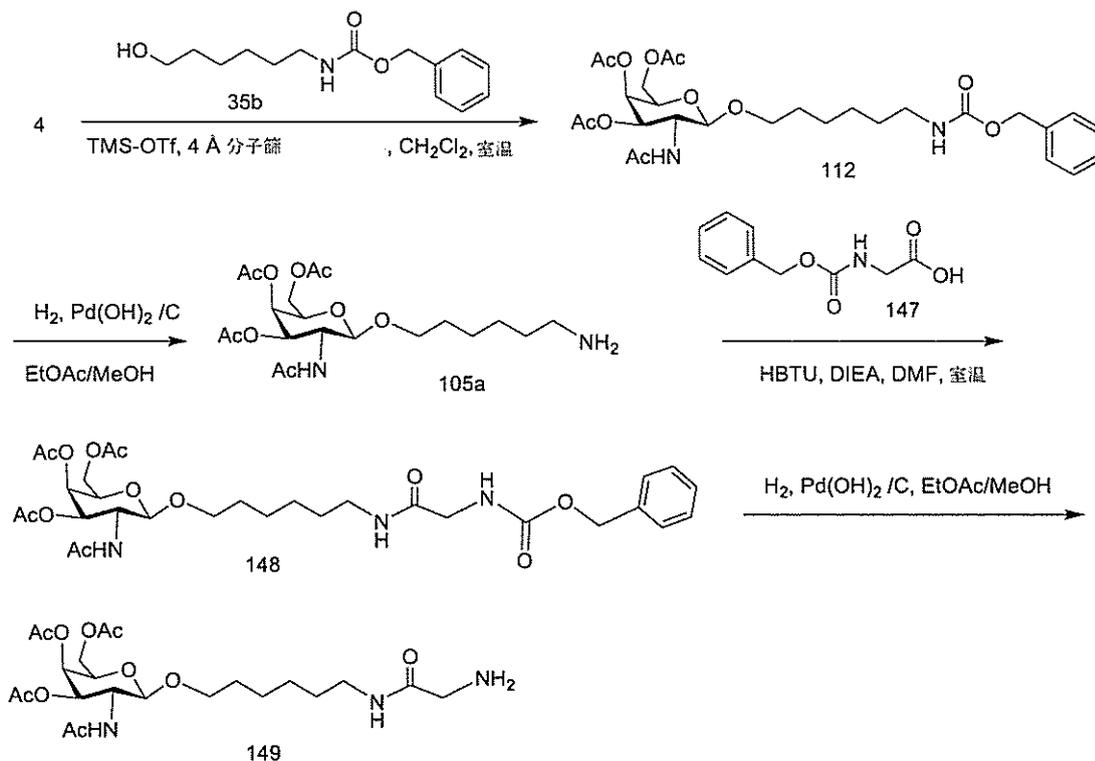
【0892】

30

40

50

【化 2 0 5】



10

20

【0 8 9 3】

化合物 4 (15 g、45.55 mmol) 及び化合物 35 b (14.3 g、57 mmol) を CH₂Cl₂ (200 mL) 中に溶解した。活性化モレキュラーシーブ (4 g、粉末) を添加し、反応物を窒素雰囲気下で 30 分間攪拌させた。TMS-OTf を添加し (4.1 mL、22.77 mmol)、反応物を室温で一晩攪拌させた。完了した時点で、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (500 mL) 及び粉碎した水 (約 150 g) を注いで反応物を反応停止処理した。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、MgSO₄ 上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮してオレンジ色の油状物を得た。粗物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、CH₂Cl₂ 中の 2 ~ 10 % MeOH で溶出して、化合物 112 (16.53 g、63%) を得た。LCMS 及び ¹H NMR は、予想した化合物と一致した。

30

【0 8 9 4】

化合物 112 (4.27 g、7.35 mmol) を 1 : 1 の MeOH / EtOAc (40 mL) 中に溶解した。この溶液を通してアルゴン流を 15 分間バブリングして反応混合物をパージした。パールマン触媒 (炭素上の水酸化パラジウム、400 mg) を添加し、この溶液を通して水素ガスを 30 分間バブリングした。完了した時点で (TLC (CH₂Cl₂ 中の 10 % MeOH) 及び LCMS)、セライトパッドを通して触媒を濾去した。濾液を回転蒸発によって濃縮し、高真空下で短時間乾燥させて、化合物 105 a (3.28 g) を得た。LCMS 及び ¹H NMR は、所望の生成物と一致した。

40

【0 8 9 5】

化合物 147 (2.31 g、11 mmol) を無水 DMF (100 mL) 中に溶解した。N, N - ジイソプロピルエチルアミン (DIEA、3.9 mL、22 mmol)、続いて、HBTU (4 g、10.5 mmol) を添加した。反応混合物を窒素下で約 15 分間攪拌させた。これに、乾燥 DMF 中の化合物 105 a (3.3 g、7.4 mmol) の溶液を添加し、窒素雰囲気下で 2 時間攪拌した。反応物を EtOAc で希釈し、飽和 NaHCO₃ 水溶液及びブラインで洗浄した。有機相を分離し、乾燥させ (MgSO₄)、濾過し、濃縮してオレンジ色のシロップ状物を得た。粗物質をカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ 中の 2 ~ 5 % MeOH) によって精製して、化合物 148 (3.44 g、73%)

50

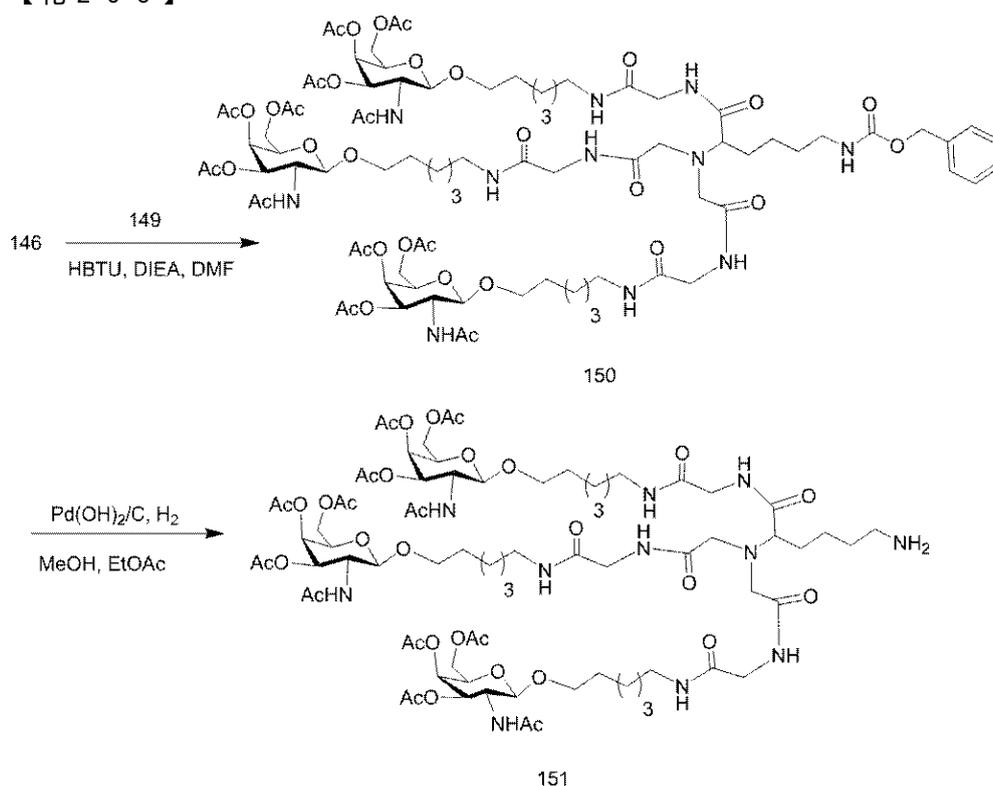
)を得た。LCMS及び¹H NMRは、予想した生成物と一致した。

【0896】

化合物148 (3.3 g、5.2 mmol)を1:1のMeOH/EtOAc (75 mL)中に溶解した。この溶液を通してアルゴン流を15分間バブリングして反応混合物をパージした。パールマン触媒(炭素上の水酸化パラジウム)を添加した(350 mg)。この溶液を通して水素ガスを30分間バブリングした。完了した時点で(TLC(DCM中の10% MeOH)及びLCMS)、セライトパッドを通して触媒を濾去した。濾液を回転蒸発によって濃縮し、高真空下で短時間乾燥させて、化合物149 (2.6 g)を得た。LCMSは、所望の生成物と一致した。残渣を乾燥DMF (10 mL)中に溶解し、次のステップで即座に使用した。

【0897】

【化206】



【0898】

化合物146 (0.68 g、1.73 mmol)を乾燥DMF (20 mL)中に溶解した。これに、DIEA (450 μ L、2.6 mmol、1.5当量)及びHBTU (1.96 g、0.52 mmol)を添加した。反応混合物を室温で15分間、窒素下で撹拌させた。無水DMF (10 mL)中の化合物149 (2.6 g)の溶液を添加した。DIEAを添加することにより(必要に応じて)、反応物のpHをpH = 9 ~ 10に調整した。反応物を室温で2時間、窒素下で撹拌させた。完了した時点で、反応物をEtOAc (100 mL)で希釈し、飽和NaHCO₃水溶液で洗浄し、続いて、ブラインで洗浄した。有機相を分離し、MgSO₄上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、CH₂Cl₂中の2 ~ 10% MeOHで溶出して、化合物150 (0.62 g、20%)を得た。LCMS及び¹H NMRは、所望の生成物と一致した。

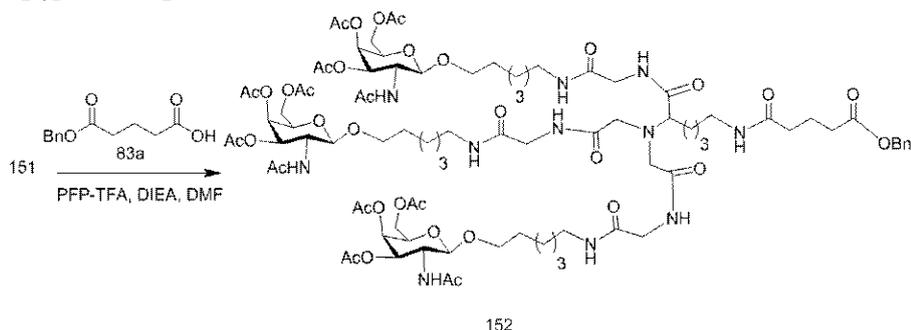
【0899】

化合物150 (0.62 g)を1:1のMeOH/EtOAc (5 L)中に溶解した。この溶液を通してアルゴン流を15分間バブリングして反応混合物をパージした。パールマン触媒(炭素上の水酸化パラジウム)を添加した(60 mg)。この溶液を通して水素ガスを30分間バブリングした。完了した時点で(TLC(DCM中の10% MeOH)及

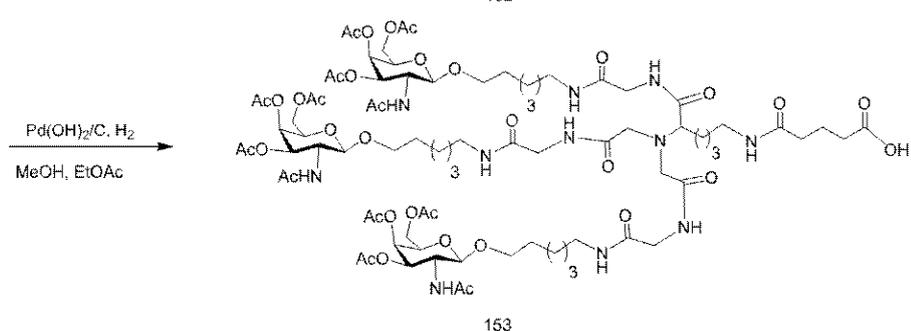
びLCMS)、触媒を濾去した(シリジチップTeflonフィルター、 $0.45\ \mu\text{m}$)。濾液を回転蒸発によって濃縮し、高真空下で短時間乾燥させて、化合物151(0.57g)を得た。LCMSは、所望の生成物と一致した。この生成物を4mLの乾燥DMF中に溶解し、次のステップで即座に使用した。

【0900】

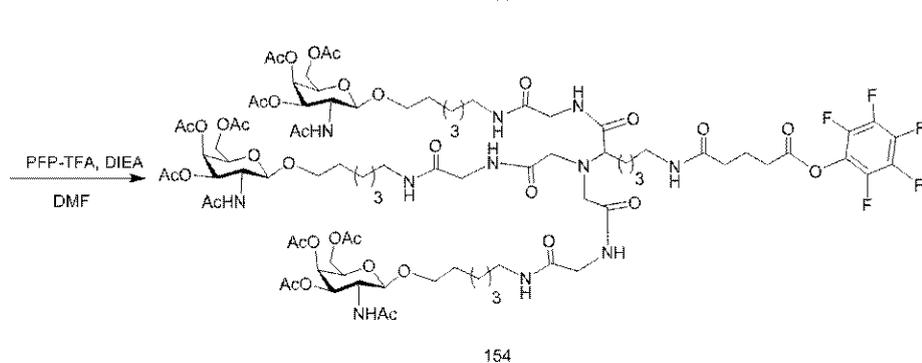
【化207】



10



20



30

【0901】

化合物83a(0.11g、0.33mmol)を無水DMF(5mL)中に溶解し、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(75 μL 、1mmol)及びPFP-TFA(90 μL 、0.76mmol)を添加した。接触時に反応混合物は赤紫色になり、その後30分間かけて徐々にオレンジ色になった。TLC及びLCMSによって反応の進行を監視した。完了した時点で(PFPエステルの形成)、化合物151(0.57g、0.33mmol)のDMF溶液を添加した。N,N-ジイソプロピルエチルアミンを添加することにより(必要に応じて)、反応物のpHをpH=9~10に調整した。反応混合物を窒素下で約30分間撹拌した。完了した時点で、溶媒の大部分を減圧下で除去した。残渣をCH₂Cl₂で希釈し、飽和NaHCO₃水溶液で洗浄し、続いて、ブラインで洗浄した。有機相を分離し、MgSO₄上で乾燥させ、濾過し、濃縮してオレンジ色のシロップ状物を得た。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂中の2~10%MeOH)によって精製して、化合物152(0.35g、55%)を得た。LCMS及び¹H-NMRは、所望の生成物と一致した。

40

【0902】

化合物152(0.35g、0.182mmol)を1:1のMeOH/EtOAc(10mL)中に溶解した。この溶液を通してアルゴン流を15分間バブリングして反応混合

50

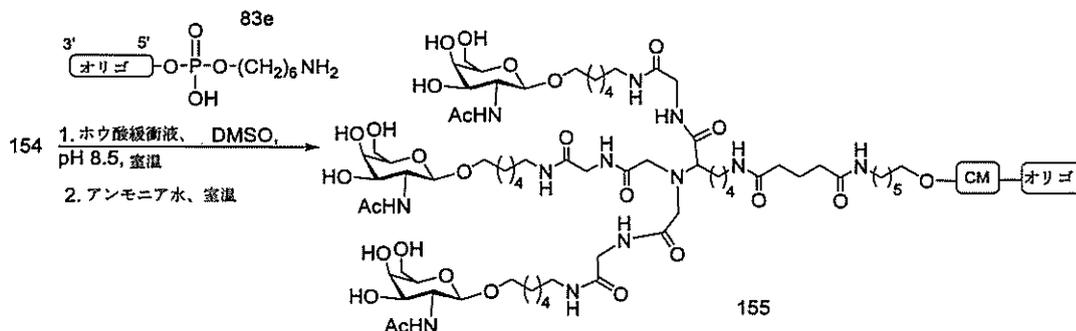
物をパーズした。パールマン触媒（炭素上の水酸化パラジウム）を添加した（35 mg）。この溶液を通して水素ガスを30分間バブリングした。完了した時点で（TLC（DCM中の10% MeOH）及びLCMS）、触媒を濾去した（シリンジチップTeflonフィルター、0.45 μm）。濾液を回転蒸発によって濃縮し、高真空下で短時間乾燥させて、化合物153（0.33 g、定量的）を得た。LCMSは、所望の生成物と一致した。

【0903】

化合物153（0.33 g、0.18 mmol）を窒素下で攪拌しながら無水DMF（5 mL）中に溶解した。これに、N,N-ジイソプロピルエチルアミン（65 μL、0.37 mmol）及びPFPA-TFA（35 μL、0.28 mmol）を添加した。反応混合物を窒素下で約30分間攪拌した。接触時に反応混合物は赤紫色になり、徐々にオレンジ色になった。さらにN,N-ジイソプロピルエチルアミンを添加することにより、反応混合物のpHをpH=9~10で維持した。TLC及びLCMSによって反応の進行を監視した。完了した時点で、溶媒の大部分を減圧下で除去した。残渣をCH₂Cl₂（50 mL）で希釈し、飽和NaHCO₃水溶液で洗浄し、その後、ブラインで洗浄した。有機層をMgSO₄上で乾燥させ、濾過し、濃縮してオレンジ色のシロップ状物を得た。残渣をカラムクロマトグラフィーによって精製し、CH₂Cl₂中の2~10% MeOHで溶出して、化合物154（0.29 g、79%）を得た。LCMS及び¹H NMRは、所望の生成物と一致した。

【0904】

【化208】



【0905】

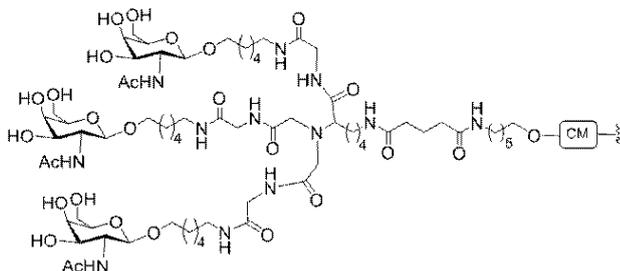
実施例46に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-6共役基を含むオリゴマー化合物155を調製した。共役基GalNAc₃-6（GalNAc₃-6a）のGalNAc₃クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせ、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。

【0906】

GalNAc₃-6（GalNAc₃-6a-CM-）の構造は、以下に示される：

【0907】

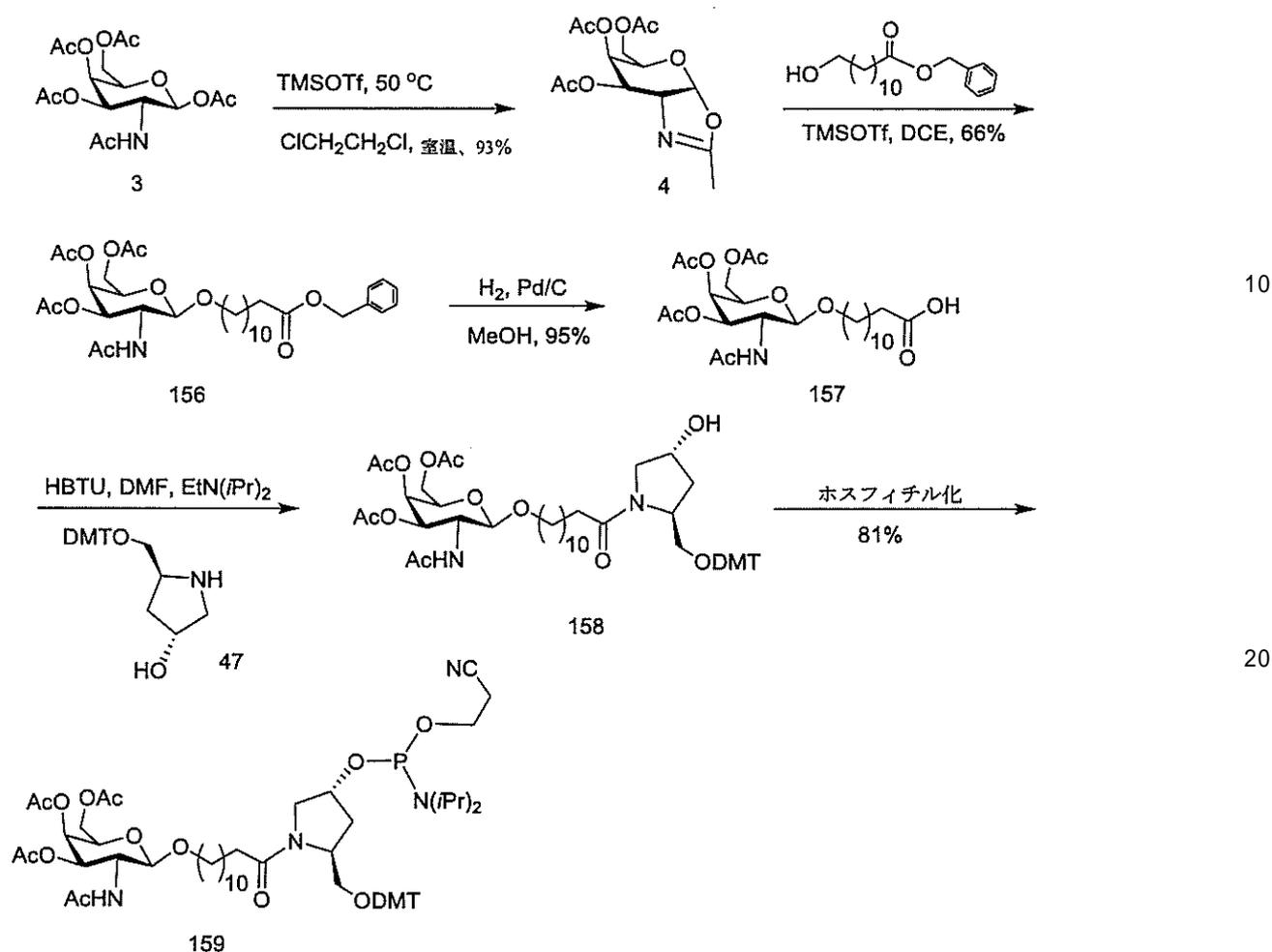
【化209】



実施例52：GalNAc₃-9を含むオリゴヌクレオチド160の調製

【 0 9 0 8 】

【 化 2 1 0 】



【 0 9 0 9 】

文献 (J . Med . Chem . 2 0 0 4 , 4 7 , 5 7 9 8 - 5 8 0 8) に記載される手順に従って化合物 1 5 6 を合成した。

【 0 9 1 0 】

化合物 1 5 6 (1 8 . 6 0 g 、 2 9 . 2 8 m m o l) をメタノール (2 0 0 m L) 中に溶解した。パラジウム炭素 (6 . 1 5 g 、 1 0 重量 % 、 負荷量 (乾燥ベース) 、マトリックス炭素粉末、湿式) を添加した。反応混合物を室温で 1 8 時間、水素下で攪拌した。セライトパッドを通して反応混合物を濾過し、このセライトパッドをメタノールで完全に洗浄した。合わせた濾液を洗浄し、濃縮乾固させた。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、ジクロロメタン中の 5 ~ 1 0 % メタノールで溶出して、化合物 1 5 7 (1 4 . 2 6 g 、 8 9 %) を得た。質量 (m / z) 5 4 4 . 1 [M - H] ⁻。

【 0 9 1 1 】

化合物 1 5 7 (5 g 、 9 . 1 7 m m o l) を無水 DMF (3 0 m L) 中に溶解した。H B T U (3 . 6 5 g 、 9 . 6 1 m m o l) 及び N , N - ジイソプロピルエチルアミン (1 3 . 7 3 m L 、 7 8 . 8 1 m m o l) を添加し、反応混合物を室温で 5 分間攪拌した。これに、化合物 4 7 (2 . 9 6 g 、 7 . 0 4 m m o l) の溶液を添加した。反応物を室温で 8 時間攪拌した。反応混合物を飽和 N a H C O ₃ 水溶液に注いだ。この混合物を酢酸エチルで抽出し、有機層をブラインで洗浄し、乾燥させ (N a ₂ S O ₄) 、濾過し、蒸発させた。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、ヘキサン中の 5 0 % 酢酸エチルで溶出して、化合物 1 5 8 (8 . 2 5 g 、 7 3 . 3 %) を得た。この構造を、MS 及び ¹H NMR 分析によって確認した。

30

40

50

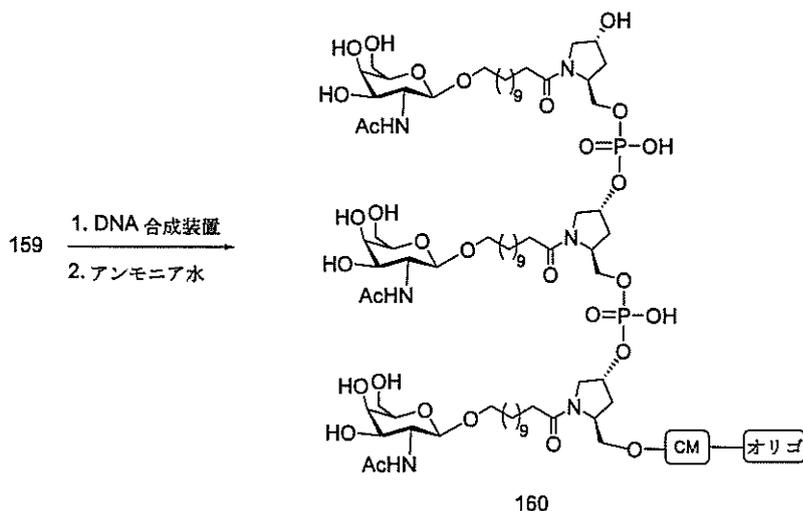
【0912】

化合物158 (7.2 g, 7.61 mmol) を減圧下で P_2O_5 上で乾燥させた。乾燥させた化合物を無水DMF (50 mL) 中に溶解した。これに、1H-テトラゾール (0.43 g, 6.09 mmol) 及びN-メチルイミダゾール (0.3 mL, 3.81 mmol) 及び2-シアノエチル-N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイト (3.65 mL, 11.50 mmol) を添加した。反応混合物をアルゴン雰囲気下で4時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチル (200 mL) で希釈した。反応混合物を飽和 $NaHCO_3$ 及びブラインで洗浄した。有機相を分離し、乾燥させ (Na_2SO_4)、濾過し、蒸発させた。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、ヘキサン中の50~90%酢酸エチルで溶出して、化合物159 (7.82 g, 80.5%) を得た。この構造を、LCMS及び ^{31}P NMR分析によって確認した。

10

【0913】

【化211】



20

【0914】

標準のオリゴヌクレオチド合成手順を用いて、GalNAc₃-9共役基を含むオリゴマー化合物160を調製した。3単位の化合物159を固体支持体に、続いてヌクレオチドホスホラミダイトにカップリングした。保護されたオリゴマー化合物をアンモニア水で処理して、化合物160を得た。共役基GalNAc₃-9 (GalNAc₃-9a) のGalNAc₃クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせ、さまざまな共役基を提供することができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-9 (GalNAc₃-9a-CM) の構造は、以下に示される：

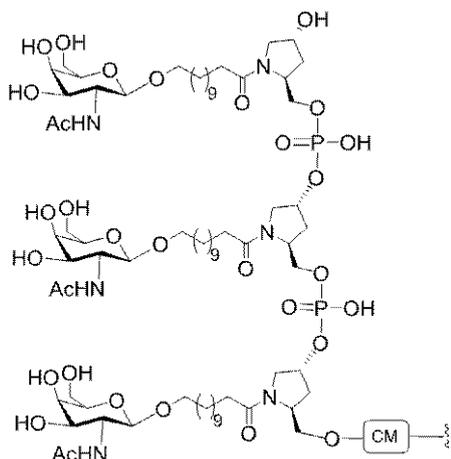
30

【0915】

40

50

【化 2 1 2】

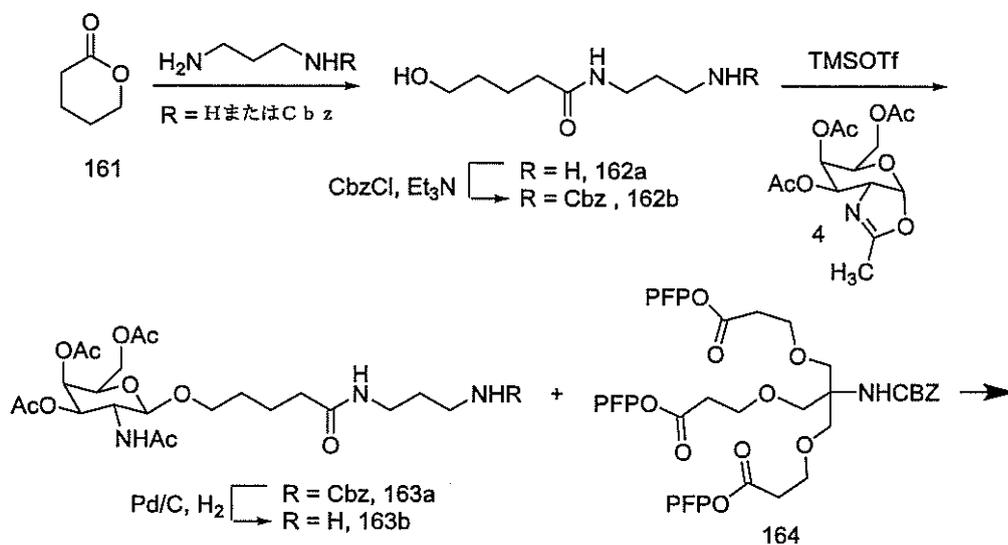


10

実施例 53 : 化合物 18 (GalNAc₃-1a 及び GalNAc₃-3a) の調製のための代替手順

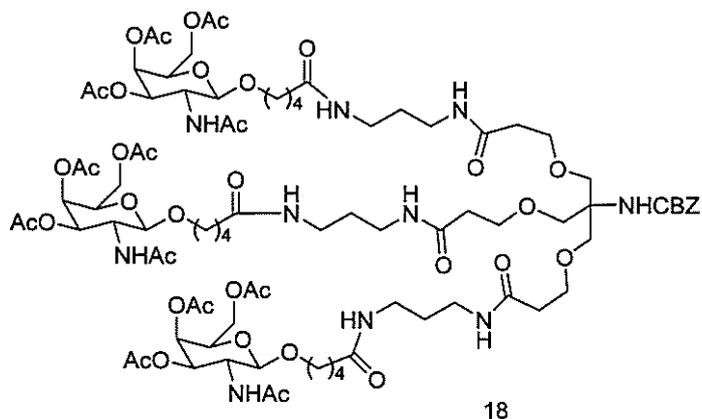
【 0 9 1 6】

【化 2 1 3】



20

30



40

【 0 9 1 7】

ラクトン 161 をジアミノプロパン (3 ~ 5 当量) またはモノ Boc 保護ジアミノプロパン (1 当量) と反応させて、アルコール 162 a または 162 b を得た。非保護プロパンジアミンを上述の反応で用いた場合、過剰なジアミンを高真空下で蒸発させて除去し、CbzCl を用いて 162 a 中の遊離アミノ基を保護して、カラムクロマトグラフィーによ

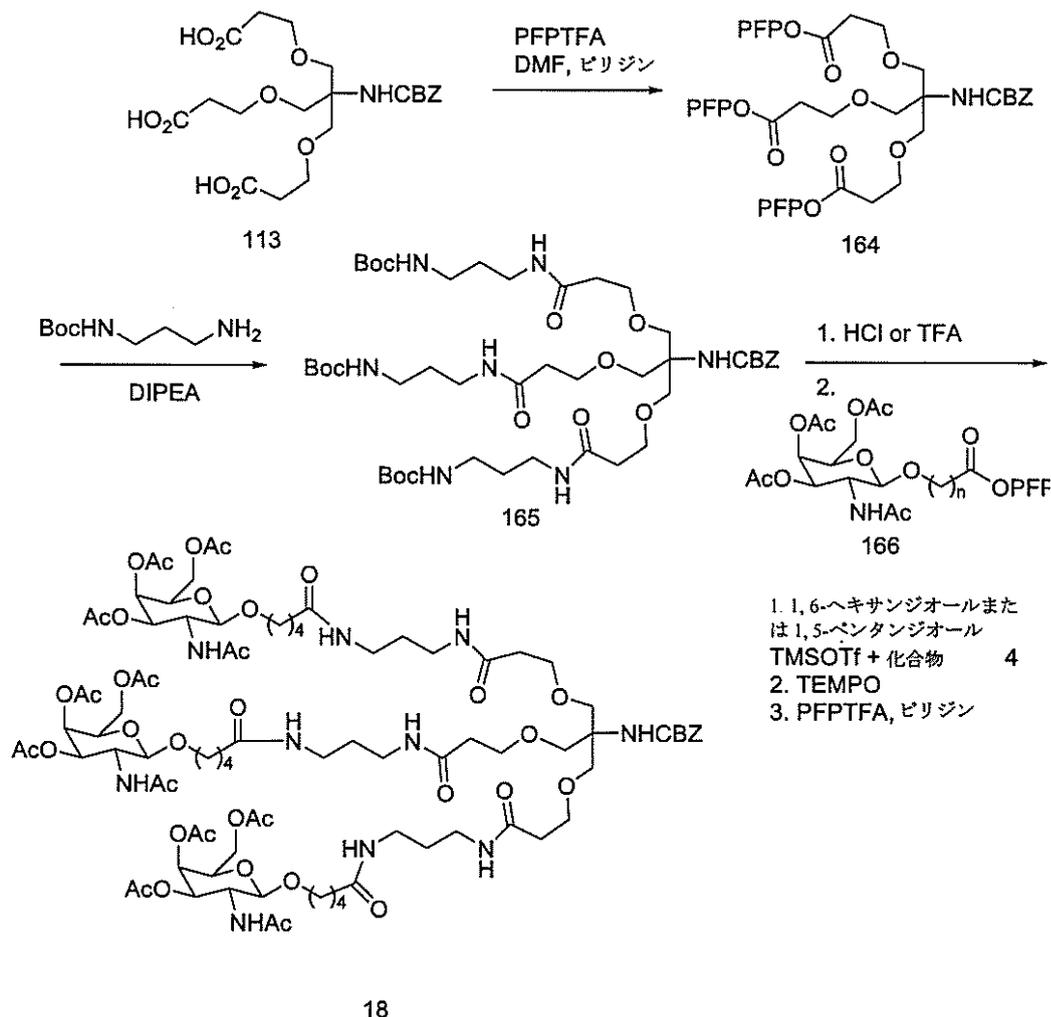
50

って精製した後に、白色の固体として162bを得た。アルコール162bをTMSOTfの存在下で化合物4とさらに反応させ163aを得て、触媒水素化を用いてCbz基を除去することにより、これを163bに変換した。ペンタフルオロフェニル(PFP)エステル164を、三酸113(実施例48を参照のこと)をDMF(0.1~0.5M)中のPFPTFA(3.5当量)及びピリジン(3.5当量)と接触させることによって調製した。トリエステル164をアミン163b(3~4当量)及びDIPEA(3~4当量)と直接反応させて、化合物18を得た。上述の方法は、中間体精製を大幅に促進し、実施例4に記載される手順を用いて形成される副生成物の形成を最小限に抑える。

実施例54: 化合物18(GalNAc3-1a及びGalNAc3-3a)の調製のための代替手順

【0918】

【化214】



【0919】

先の実施例53に概説される手順を用いて酸113からトリPFPエステル164を調製し、モノBoc保護ジアミンと反応させて、本質的に定量的な収率で165を得た。Boc基を塩酸またはトリフルオロ酢酸で除去して、トリアミンを得て、これをDIPEAなどの好適な塩基の存在下でPFP活性化酸166と反応させて、化合物18を得た。

【0920】

DMF中のPFPTFA(1~1.2当量)及びピリジン(1~1.2当量)で処理することにより、PFP保護Gal-NAc酸166を対応する酸から調製した。次いで、アセトニトリル及び水中のTEMPO(0.2当量)及びBAIBを用いて酸化することにより、前駆酸を対応するアルコールから調製した。先の実施例47に記載される条件を用

いて1, 6 - ヘキサンジオール (または1, 5 - ペンタンジオールもしくは他の n 値の他のジオール) (2 ~ 4 当量) 及び T M S O T f と反応させることにより、前駆アルコールを糖中間体 4 から調製した。

実施例 5 5 : 生体内における S R B - 1 を標的とする 3 ' - 共役基または 5 ' - 共役基のいずれかを含むオリゴヌクレオチド (G a l N A c ₃ - 1、3、8、及び 9 の比較) の用量依存的試験

【 0 9 2 1 】

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける S R B - 1 のアンチセンス阻害について試験した。非共役 I S I S 3 5 3 3 8 2 を標準物として含めた。さまざまな G a l N A c ₃ 共役基のそれぞれは、ホスホジエステル連結 2 ' - デオキシアデノシンヌクレオチド (切断可能部分) によってそれぞれのオリゴヌクレオチドの 3 ' 末端または 5 ' 末端のいずれかで結合された。

10

【 0 9 2 2 】

【表 2 7】

表 3 9
S R B - 1 を標的とする修飾 A S O

ASO	配列(5'から3')	モチーフ	共役体	配列番号
ISIS 353382(親)	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	なし	829
ISIS 655861	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAC ₃ -1 _a	5/10/5	GalNAC ₃ -1	830
ISIS 664078	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAC ₃ -9 _a	5/10/5	GalNAC ₃ -9	830
ISIS 661161	GalNAC ₃ -3 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAC ₃ -3	831
ISIS 665001	GalNAC ₃ -8 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAC ₃ -8	831

20

30

【 0 9 2 3 】

大文字は、各ヌクレオチドの核酸塩基を示し、mCは、5 - メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2' - MOE 修飾ヌクレオチドを示し、「d」は、- D - 2' - デオキシリボヌクレオチドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオチド間連結部 (P S) を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオチド間連結部 (P O) を示し、「o'」は、- O - P (= O) (O H) - を示す。共役基は、太字で表示されている。

40

【 0 9 2 4 】

G a l N A c ₃ - 1 _a の構造は、先の実施例 9 に示される。G a l N A c ₃ - 9 の構造は、先の実施例 5 2 に示される。G a l N A c ₃ - 3 の構造は、先の実施例 3 9 に示される。G a l N A c ₃ - 8 の構造は、先の実施例 4 7 に示される。

処理

【 0 9 2 5 】

6 週齢の雄 B a l b / c マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r y , B a r H a r b o r , M E) に、I S I S 3 5 3 3 8 2、6 5 5 8 6 1、6 6 4 0 7 8、6 6 1 1 6 1、6 6 5 0 0 1、または生理食塩水を、以下に示される投与量で 1 回、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 7 2 時間後にマウスを 殺して、リアル

50

タイムPCR及びRIBOGREEN(登録商標)RNA定量化試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを標準プロトコルに従って決定した。以下の結果は、生理食塩水(対照)に対して標準化された各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。

【0926】

表40に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させた。実際には、3'末端にホスホジエステル連結GalNAc₃-1及びGalNAc₃-9共役体(ISIS 655861及びISIS 664078)ならびに5'末端に連結されたGalNAc₃-3及びGalNAc₃-8共役体(ISIS 661161及びISIS 665001)を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド(ISIS 353382)と比較して、力価の大幅な改善を示した。さらに、3'末端にGalNAc₃-9共役体を含むISIS 664078は、3'末端にGalNAc₃-1共役体を含むISIS 655861と比較して、本質的に等効力であった。それぞれ、GalNAc₃-3またはGalNAc₃-9を含む5'共役アンチセンスオリゴヌクレオチドISIS 661161及びISIS 665001は、3'共役アンチセンスオリゴヌクレオチド(ISIS 655861及びISIS 664078)と比較して、力価を増加させた。

【0927】

10

20

30

40

50

【表 2 8】

表 4 0

SRB-1を標的とするGalNAc₃-1、3、8または9を含有するASO

ISIS番号	投 与 量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA(%生理 食塩水)	共役体
生理食塩水	該当なし	100	
353382	3	88	なし
	10	68	
	30	36	
655861	0.5	98	GalNAc ₃ -1(3')
	1.5	76	
	5	31	
	15	20	
664078	0.5	88	GalNAc ₃ -9(3')
	1.5	85	
	5	46	
	15	20	
661161	0.5	92	GalNAc ₃ -3(5')
	1.5	59	
	5	19	
	15	11	
665001	0.5	100	GalNAc ₃ -8(5')
	1.5	73	
	5	29	
	15	13	

10

20

30

【 0 9 2 8】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な変化は見られなかった。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表に示される。

【 0 9 2 9】

40

50

【表 2 9】

表 4 1

ISIS番号	投与量 (mg/kg)	ALT	AST	総ビリ ルビン	BUN	共役体
生理食塩水		24	59	0.1	37.52	
353382	3	21	66	0.2	34.65	なし
	10	22	54	0.2	34.2	
	30	22	49	0.2	33.72	
655861	0.5	25	62	0.2	30.65	GalNac ₃ -1(3')
	1.5	23	48	0.2	30.97	
	5	28	49	0.1	32.92	
	15	40	97	0.1	31.62	
664078	0.5	40	74	0.1	35.3	GalNac ₃ -9(3')
	1.5	47	104	0.1	32.75	
	5	20	43	0.1	30.62	
	15	38	92	0.1	26.2	
661161	0.5	101	162	0.1	34.17	GalNac ₃ -3(5')
	1.5g	42	100	0.1	33.37	
	5g	23	99	0.1	34.97	
	15	53	83	0.1	34.8	
665001	0.5	28	54	0.1	31.32	GalNac ₃ -8(5')
	1.5	42	75	0.1	32.32	
	5	24	42	0.1	31.85	
	15	32	67	0.1	31.	

実施例 5 6 : 生体内におけるSRB - 1を標的とする3' - 共役基または5' - 共役基のい
ずれかを含むオリゴヌクレオチドの用量依存的試験 (GalNac₃ - 1、2、3、5、
6、7、及び10の比較)

【0930】

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおけるSRB
- 1のアンチセンス阻害について試験した。非共役ISIS 353382を標準物とし
て含めた。3'末端にGalNac₃共役基を結合させたISIS 655861を除いて
、さまざまなGalNac₃共役基のそれぞれは、ホスホジエステル連結2' - デオキシア
デノシンヌクレオチド(切断可能部分)によってそれぞれのオリゴヌクレオチドの5'末端
に取り付けられた。

【0931】

10

20

30

40

50

【表 3 0】

表 4 2
SRB-1 を標的とする修飾 ASO

ASO	配列(5'から3')	モチーフ	共役体	配列番号
ISIS 353382(親)	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	共役体なし	829
ISIS 655861	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAC ₃ -1 _a	5/10/5	GalNAC ₃ -1	830
ISIS 664507	GalNAC ₃ -2 _{a-o} ·A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAC ₃ -2	831
ISIS 661161	GalNAC ₃ -3 _{a-o} ·A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAC ₃ -3	831
ISIS 666224	GalNAC ₃ -5 _{a-o} ·A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAC ₃ -5	831
ISIS 666961	GalNAC ₃ -6 _{a-o} ·A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAC ₃ -6	831
ISIS 666981	GalNAC ₃ -7 _{a-o} ·A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAC ₃ -7	831
ISIS 666881	GalNAC ₃ -10 _{a-o} ·A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	5/10/5	GalNAC ₃ -10	831

10

20

【 0 9 3 2】

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部(PS)を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部(PO)を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

30

【 0 9 3 3】

GalNAC₃-1_aの構造は、先の実施例9に示される。GalNAC₃-2_aの構造は、先の実施例37に示される。GalNAC₃-3_aの構造は、先の実施例39に示される。GalNAC₃-5_aの構造は、先の実施例49に示される。GalNAC₃-6_aの構造は、先の実施例51に示される。GalNAC₃-7_aの構造は、先の実施例48に示される。GalNAC₃-10_aの構造は、先の実施例46に示される。

処理

【 0 9 3 4】

6週齢の雄Balb/cマウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)に、ISIS 353382、655861、664507、661161、666224、666961、666981、666881、または生理食塩水を、以下に示される投与量で1回皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBOGREEN(登録商標)RNA定量化試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを決定した。以下の結果は、生理食塩水(対照)に対して標準化された各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。

40

【 0 9 3 5】

50

表 4 3 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で SRB - 1 mRNA レベルを低下させた。実際には、共役アンチセンスオリゴヌクレオチドは、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド (ISIS 353382) と比較して、力価の大幅な改善を示した。5' 共役アンチセンスオリゴヌクレオチドは、3' 共役アンチセンスオリゴヌクレオチドと比較して、力価のわずかな増加を示した。

【 0 9 3 6 】

【 表 3 1 】

表 4 3

ISIS番号	投 与 量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA(%生理 食塩水)	共役体
生理食塩水	該当なし	100.0	
353382	3	96.0	なし
	10	73.1	
	30	36.1	
655861	0.5	99.4	GalNac ₃ -1(3')
	1.5	81.2	
	5	33.9	
	15	15.2	
664507	0.5	102.0	GalNac ₃ -2(5')
	1.5	73.2	
	5	31.3	
	15	10.8	
661161	0.5	90.7	GalNac ₃ -3(5')
	1.5	67.6	
	5	24.3	
	15	11.5	
666224	0.5	96.1	GalNac ₃ -5(5')
	1.5	61.6	
	5	25.6	
	15	11.7	
666961	0.5	85.5	GalNac ₃ -6(5')
	1.5	56.3	
	5	34.2	
	15	13.1	
666981	0.5	84.7	GalNac ₃ -7(5')
	1.5	59.9	
	5	24.9	
	15	8.5	
666881	0.5	100.0	GalNac ₃ -10(5')
	1.5	65.8	
	5	26.0	
	15	13.0	

【 0 9 3 7 】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を、標準のブ

10

20

30

40

50

ロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な変化は見られなかった。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表44に示される。

【0938】

【表32】

表44

ISIS番号	投与量 (mg/kg)	ALT	AST	総ビリル ビン	BUN	共役体
生理食塩水		26	57	0.2	27	
353382	3	25	92	0.2	27	なし
	10	23	40	0.2	25	
	30	29	54	0.1	28	
655861	0.5	25	71	0.2	34	GalNac ₃ -1(3')
	1.5	28	60	0.2	26	
	5	26	63	0.2	28	
	15	25	61	0.2	28	
664507	0.5	25	62	0.2	25	GalNac ₃ -2(5')
	1.5	24	49	0.2	26	
	5	21	50	0.2	26	
	15	59	84	0.1	22	
661161	0.5	20	42	0.2	29	GalNac ₃ -3(5')
	1.5g	37	74	0.2	25	
	5g	28	61	0.2	29	
	15	21	41	0.2	25	
666224	0.5	34	48	0.2	21	GalNac ₃ -5(5')
	1.5	23	46	0.2	26	
	5	24	47	0.2	23	
	15	32	49	0.1	26	
666961	0.5	17	63	0.2	26	GalNac ₃ -6(5')
	1.5	23	68	0.2	26	
	5	25	66	0.2	26	
	15	29	107	0.2	28	
666981	0.5	24	48	0.2	26	GalNac ₃ -7(5')
	1.5	30	55	0.2	24	
	5	46	74	0.1	24	
	15	29	58	0.1	26	
666881	0.5	20	65	0.2	27	GalNac ₃ -10(5')
	1.5	23	59	0.2	24	
	5	45	70	0.2	26	
	15	21	57	0.2	24	

実施例57：生体内におけるApoC IIIを標的とする3'-共役基を含むオリゴヌクレオチドの作用持続時間試験

【0939】

マウスに以下に示される用量を1回注入し、ApoC-III及び血漿トリグリセリド

(血漿TG)レベルを42日間にわたって監視した。各群におけるヒトAPOC-IIIを発現する3匹のトランスジェニックマウスを用いて、この試験を実行した。

【0940】

【表33】

表45

ApoC IIIを標的とする修飾ASO

ASO	配列(5'から3')	結合	配列番号
ISIS 304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	PS	821
ISIS 647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	PS	822
ISIS 647536	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	PO/PS	822

10

【0941】

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、^mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部(PS)を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部(PO)を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

20

【0942】

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例9に示される。

【0943】

【表34】

表46

ApoC III mRNA(1日目の生理食塩水に対する%)及び血漿TGレベル(1日目の生理食塩水に対する%)

ASO	用量	標的	3日目	7日目	14日目	35日目	42日目
生理食塩水	0mg/kg	ApoC-III	98	100	100	95	116
ISIS 304801	30mg/kg	ApoC-III	28	30	41	65	74
ISIS 647535	10mg/kg	ApoC-III	16	19	25	74	94
ISIS 647536	10mg/kg	ApoC-III	18	16	17	35	51
生理食塩水	0mg/kg	血漿TG	121	130	123	105	109
ISIS 304801	30mg/kg	血漿TG	34	37	50	69	69
ISIS 647535	10mg/kg	血漿TG	18	14	24	18	71
ISIS 647536	10mg/kg	血漿TG	21	19	15	32	35

30

40

【0944】

上の表に見られるように、作用持続時間は、非共役オリゴヌクレオチドと比較して、3'-共役基の付加によって増加した。共役完全PSオリゴヌクレオチド647535と比較して、共役混成PO/PSオリゴヌクレオチド647536の作用持続時間がさらに増加した。

実施例58:生体内におけるSRB-1を標的とする3'-共役基を含むオリゴヌクレオチドの用量依存的試験(GalNAc₃-1及びGalNAc₄-11の比較)

50

【0945】

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおけるSRB-1のアンチセンス阻害について試験した。非共役ISIS 440762を非共役標準物として含めた。共役基のそれぞれは、ホスホジエステル連結2'-デオキシアデノシンヌクレオチド(切断可能部分)によってそれぞれのオリゴヌクレオチドの3'末端に取り付けられた。

【0946】

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例9に示される。GalNAc₃-1_{1a}の構造は、先の実施例50に示される。

処理

【0947】

6週齢の雄Balb/cマウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)に、ISIS 440762、651900、663748、または生理食塩水を、以下に示される投与量で1回、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなつた。最終投与の72時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBOGRREEN(登録商標)RNA定量化試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを決定した。以下の結果は、生理食塩水(対照)に対して標準化された各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。

【0948】

表47に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させた。3'末端にホスホジエステル連結GalNAc₃-1及びGalNAc₄-1₁共役体を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド(ISIS 651900及びISIS 663748)は、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド(ISIS 440762)と比較して、力価の大幅な増加を示した。2つの共役オリゴヌクレオチド、すなわちGalNAc₃-1とGalNAc₄-1₁は、等効力であった。

【0949】

【表35】

表47
SRB-1を標的とする修飾ASO

ASO	配列(5'から3')	用量(mg/kg)	%生理食塩水(対照)	配列番号
生理食塩水			100	
ISIS 440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	0.6	73.45	823
		2	59.66	
		6	23.50	
ISIS 651900	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	0.2	62.75	824
		0.6	29.14	
		2	8.61	
ISIS 663748	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} mC _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ko} A _{do} '-GalNAc ₄ -1 _{1a}	0.2	63.99	824
		0.6	33.53	
		2	7.58	
		6	5.52	

10

20

30

40

50

【0950】

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5 - メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2' - MOE修飾ヌクレオシドを示し、「k」は、6' - (S) - C_H₃二環式ヌクレオシドを示し、「d」は、-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部(PS)を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部(PO)を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

【0951】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な変化は見られなかった。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表48に示される。

【0952】

【表36】

表48

ISIS番号	投与量 (mg/kg)	ALT	AST	総ビリル ビン	BUN	共役体
生理食塩水		30	76	0.2	40	
440762	0.60	32	70	0.1	35	なし
	2	26	57	0.1	35	
	6	31	48	0.1	39	
651900	0.2	32	115	0.2	39	GalNac ₃ -1(3')
	0.6	33	61	0.1	35	
	2	30	50	0.1	37	
	6	34	52	0.1	36	
663748	0.2	28	56	0.2	36	GalNac ₄ -11(3')
	0.6	34	60	0.1	35	
	2	44	62	0.1	36	
	6	38	71	0.1	33	

実施例59：生体内におけるFXIを標的とするGalNAc₃-1共役ASOの影響

【0953】

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、複数回投与試験においてマウスにおけるFXIのアンチセンス阻害について試験した。ISIS 404071を非共役標準物として含めた。共役基のそれぞれは、ホスホジエステル連結2'-デオキシアデノシンヌクレオチドの切断可能部分によってそれぞれのオリゴヌクレオチドの3'末端に取り付けられた。

【0954】

10

20

30

40

50

【表 3 7】

表 4 9

F X I を標的とする修飾 A S O

ASO	配列(5'から3')	結合	配列番号
ISIS 404071	T _{es} G _{es} G _{es} T _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} A _{es} G _{es} G _e	PS	832
ISIS 656172	T _{es} G _{es} G _{es} T _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} A _{es} G _{es} G _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	PS	833
ISIS 656173	T _{es} G _{eo} G _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{eo} G _{eo} A _{es} G _{es} G _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	PO/PS	833

10

【0955】

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5 - メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2' - MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、- D - 2' - デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部(PS)を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部(PO)を示し、「o'」は、- O - P (= O) (OH) - を示す。共役基は、太字で表示されている。

20

【0956】

GalNAc₃ - 1_aの構造は、先の実施例9に示される。

処理

【0957】

6週齢の雄Balb/cマウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)に、ISIS 404071、656172、656173、またはPBS処理対照を、以下に示される投与量で週2回3週間、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBOGREEN(登録商標)RNA定量化試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを決定した。ELISAを用いて血漿FXIタンパク質レベルも測定した。PBS処理対照に対して標準化する前に(RIBOGREEN(登録商標)を用いて)FXI mRNAレベルを全RNAとの比較で相対的に決定した。以下の結果は、各処理群のFXI mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。データをPBS処理対照に対して標準化し、「%PBS」で表示する。前記方法と同様の方法を用いてED50を測定し、以下に提示する。

30

【0958】

40

50

【表 3 8】

表 5 0
第 X I 因子 mRNA (%生理食塩水)

ASO	用 量 (mg/kg)	%対照	共役体	結合
生理食 塩水		100	なし	
ISIS 404071	3	92	なし	PS
	10	40		
	30	15		
ISIS 656172	0.7	74	GalNAc ₃ -1	PS
	2	33		
	6	9		
ISIS 656173	0.7	49	GalNAc ₃ -1	PO/PS
	2	22		
	6	1		

10

20

【 0 9 5 9】

表 5 0 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で F X I mRNA レベルを低下させた。3' - GalNAc₃ - 1 共役基を含むオリゴヌクレオチドは、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド (ISIS 404071) と比較して、力価の大幅な増加を示した。これら 2 つの共役オリゴヌクレオチドの間では、PS 連結部のうちのいくつかを PO (ISIS 656173) と置き換えることによって、力価がさらに増加した。

【 0 9 6 0】

表 5 0 a に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で F X I タンパク質レベルを低下させた。3' - GalNAc₃ - 1 共役基を含むオリゴヌクレオチドは、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド (ISIS 404071) と比較して、力価の大幅な増加を示した。これら 2 つの共役オリゴヌクレオチドの間では、PS 連結部のうちのいくつかを PO (ISIS 656173) と置き換えることによって、力価がさらに増加した。

30

【 0 9 6 1】

40

50

【表 3 9】

表 5 0 a

第 X I 因子タンパク質 (%生理食塩水)

ASO	用 量 (mg/kg)	タンパク質 (%対照)	共役体	結合
生理食 塩水		100	なし	
ISIS 404071	3	127	なし	PS
	10	32		
	30	3		
ISIS 656172	0.7	70	GalNAc ₃ -1	PS
	2	23		
	6	1		
ISIS 656173	0.7	45	GalNAc ₃ -1	PO/PS
	2	6		
	6	0		

10

20

【 0 9 6 2】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン、総アルブミン、CRE、及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な変化は見られなかった。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表に示される。

【 0 9 6 3】

【表 4 0】

表 5 1

ISIS番号	投 与 量 (mg/kg)	ALT	AST	総アル ブミン	総ビリ ルビン	CRE	BUN	共役体
生 理 食 塩 水		71.8	84.0	3.1	0.2	0.2	22.9	
404071	3	152.8	176.0	3.1	0.3	0.2	23.0	なし
	10	73.3	121.5	3.0	0.2	0.2	21.4	
	30	82.5	92.3	3.0	0.2	0.2	23.0	
656172	0.7	62.5	111.5	3.1	0.2	0.2	23.8	GalNAc ₃ -1(3')
	2	33.0	51.8	2.9	0.2	0.2	22.0	
	6	65.0	71.5	3.2	0.2	0.2	23.9	
656173	0.7	54.8	90.5	3.0	0.2	0.2	24.9	GalNAc ₃ -1(3')
	2	85.8	71.5	3.2	0.2	0.2	21.0	
	6	114.0	101.8	3.3	0.2	0.2	22.7	

30

40

実施例 6 0 : 生体外におけるSRB - 1を標的とする共役ASOの影響

【 0 9 6 4】

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、複数回投与試験において初代マウス肝細胞にお

50

けるSRB-1のアンチセンス阻害について試験した。ISIS 353382を非共役標準物として含めた。共役基のそれぞれは、ホスホジエステル連結2'-デオキシアデノシンヌクレオシドの切断可能部分によってそれぞれのオリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端に取り付けられた。

【0965】

【表41】

表52

SRB-1を標的とする修飾ASO

ASO	配列(5'から3')	モチーフ	共役体	配列番号
ISIS 353382	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	なし	829
ISIS 655861	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} \text{-GalNAc}_3\text{-}1_a$	5/10/5	GalNAc ₃ -1	830
ISIS 655862	$G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} \text{-GalNAc}_3\text{-}1_a$	5/10/5	GalNAc ₃ -1	830
ISIS 661161	$GalNAc_3\text{-}3_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds}$ $T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -3	831
ISIS 665001	$GalNAc_3\text{-}8_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds}$ $T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -8	831
ISIS 664078	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_{eo} A_{do} \text{-GalNAc}_3\text{-}9_a$	5/10/5	GalNAc ₃ -9	830
ISIS 666961	$GalNAc_3\text{-}6_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds}$ $T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -6	831
ISIS 664507	$GalNAc_3\text{-}2_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -2	831
ISIS 666881	$GalNAc_3\text{-}10_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -10	831
ISIS 666224	$GalNAc_3\text{-}5_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -5	831
ISIS 666981	$GalNAc_3\text{-}7_{a-o} A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}$ $^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	5/10/5	GalNAc ₃ -7	831

【0966】

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部(PS)を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部(PO)を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

【0967】

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例9に示される。GalNAc₃-3_aの構造は、先の実施例39に示される。GalNAc₃-8_aの構造は、先の実施例47に示される。GalNAc₃-9_aの構造は、先の実施例52に示される。GalNAc₃-6_aの構造は、先の実施例51に示される。GalNAc₃-2_aの構造は、先の実施例37に示される。GalNAc₃-10_aの構造は、先の実施例46に示される。GalNAc₃-5_aの構造は、先の実施例49に示される。GalNAc₃-7_aの構造は、先

10

20

30

40

50

の実施例 48 に示される。

処理

【0968】

上に列記されるオリゴヌクレオチドを、25,000細胞/ウェルの密度でプレATINGし、かつ0.03、0.08、0.24、0.74、2.22、6.67、または20nMの修飾オリゴヌクレオチドで処理した初代マウス肝細胞において生体外で試験した。約16時間の処理期間後、RNAを細胞から単離し、mRNAレベルを定量的リアルタイムPCRによって測定し、RIBOGREEN(登録商標)によって測定された総RNA含有量に従ってSRB-1 mRNAレベルを調整した。

【0969】

標準的方法を用いてIC₅₀を計算し、結果を表53に提示する。結果は、オリゴヌクレオチドの細胞への進入を人工的に促進するために試薬も電気穿孔技法も用いない自由取り込み条件下で、GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドは、GalNAc共役体を含まない親オリゴヌクレオチド(ISIS 353382)よりも肝細胞において著しく強力であったことを示す。

【0970】

【表42】

表53

ASO	IC ₅₀ (nM)	ヌクレオシド 間連結部	共役体	配列番号
ISIS 353382	190 ^a	PS	なし	829
ISIS 655861	11 ^a	PS	GalNAc ₃ -1	830
ISIS 655862	3	PO/PS	GalNAc ₃ -1	830
ISIS 661161	15 ^a	PS	GalNAc ₃ -3	831
ISIS 665001	20	PS	GalNAc ₃ -8	831
ISIS 664078	55	PS	GalNAc ₃ -9	830
ISIS 666961	22 ^a	PS	GalNAc ₃ -6	831
ISIS 664507	30	PS	GalNAc ₃ -2	831
ISIS 666881	30	PS	GalNAc ₃ -10	831
ISIS 666224	30 ^a	PS	GalNAc ₃ -5	831
ISIS 666981	40	PS	GalNAc ₃ -7	831

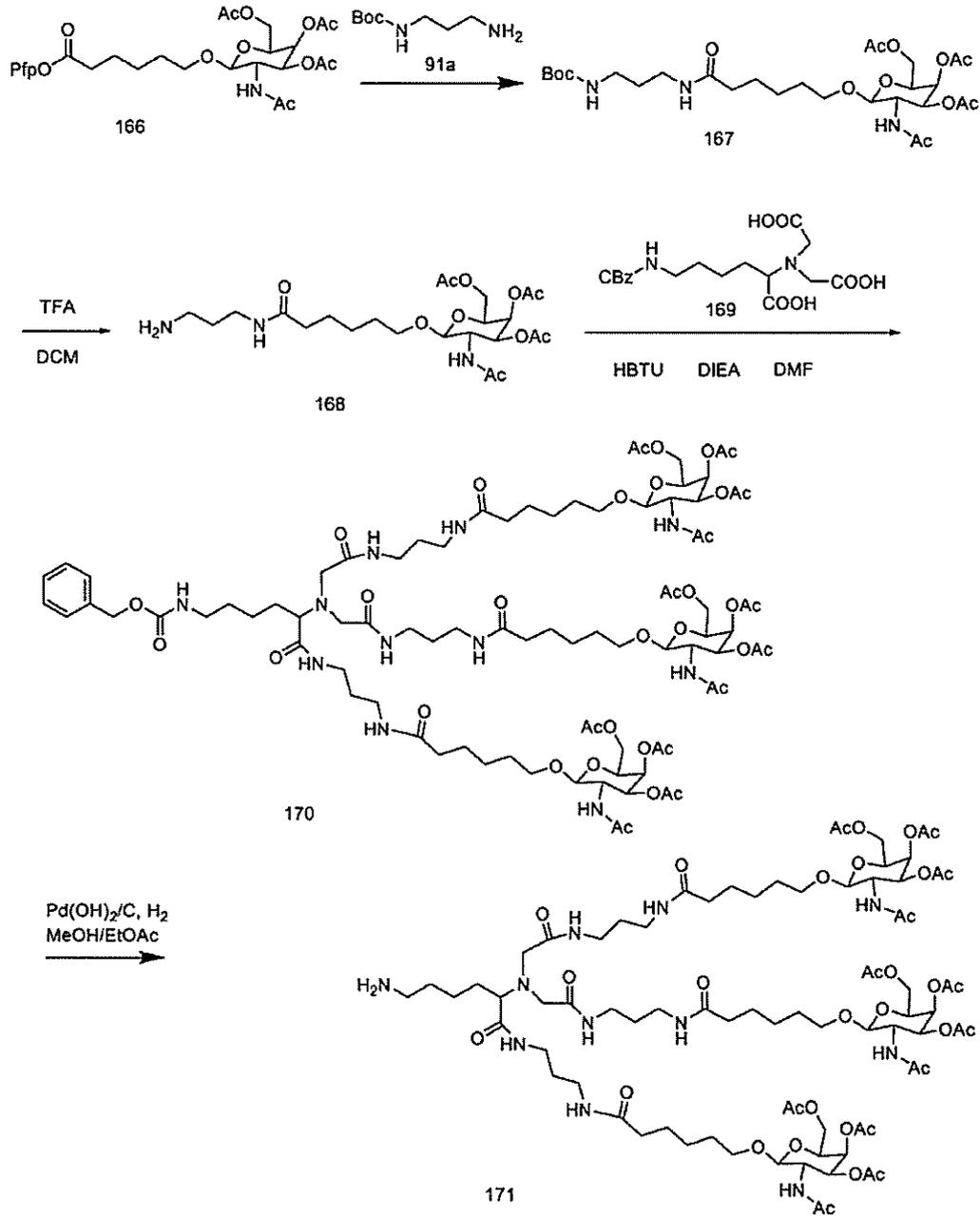
【0971】

a 複数回の実行の平均。

実施例 61 : GalNAc₃-12 を含むオリゴマー化合物 175 の調製

【 0 9 7 2 】

【 化 2 1 5 】



10

20

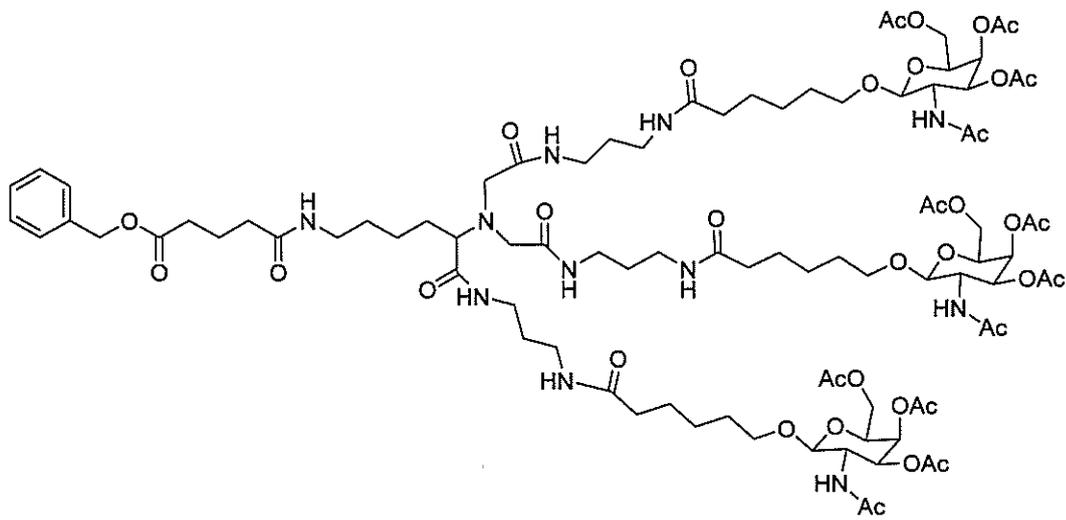
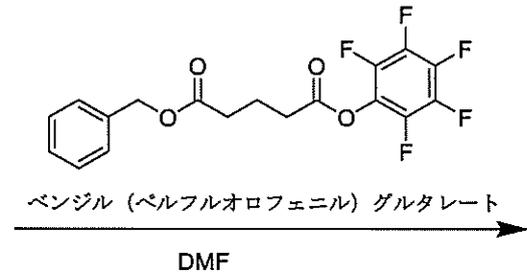
30

【 0 9 7 3 】

40

50

【化 2 1 6】



【 0 9 7 4】

10

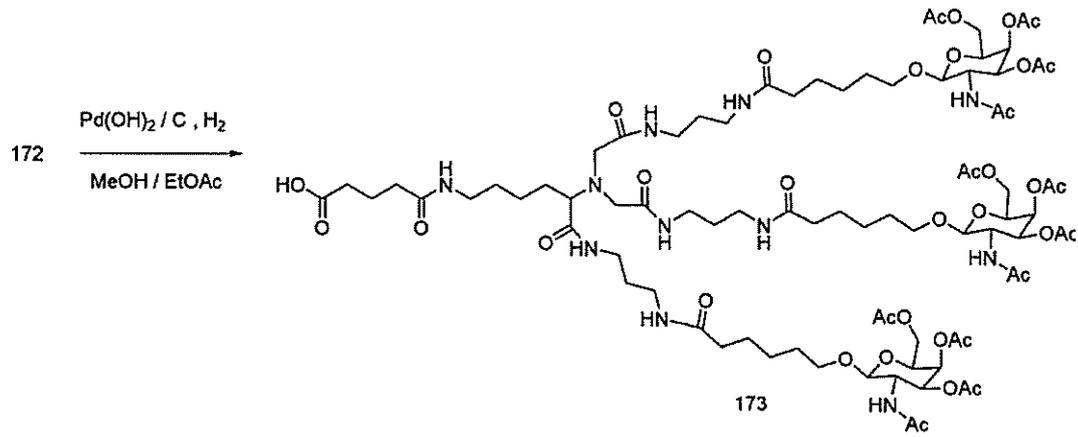
20

30

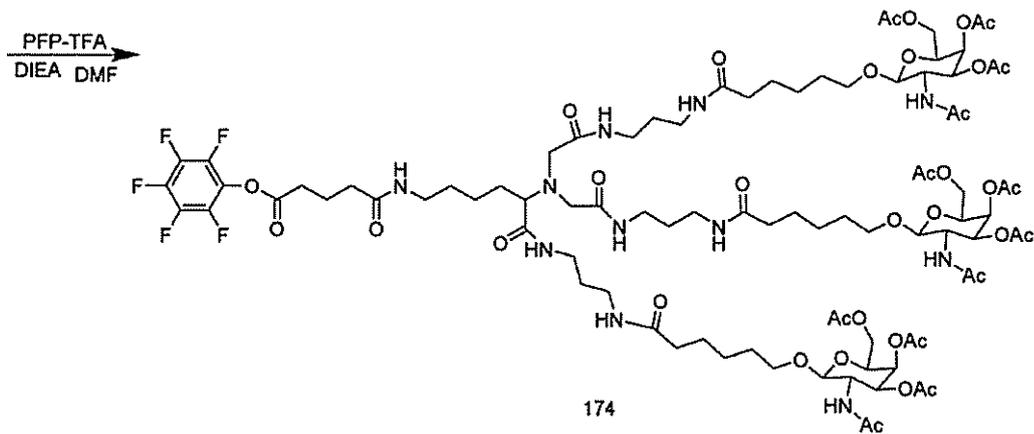
40

50

【化 2 1 7】



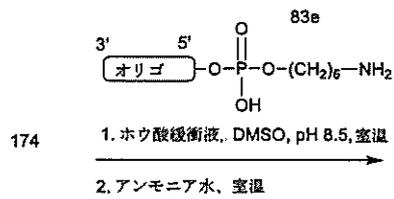
10



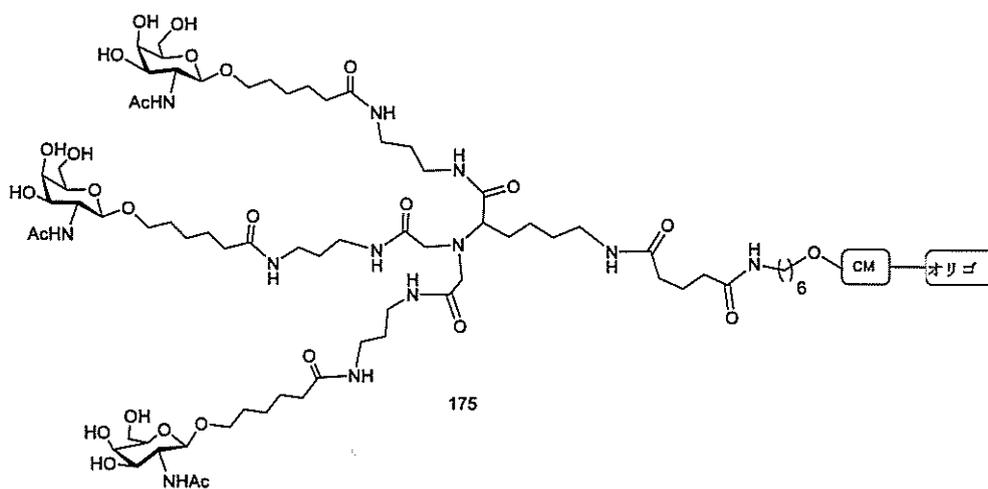
20

【 0 9 7 5】

【化 2 1 8】



30



40

50

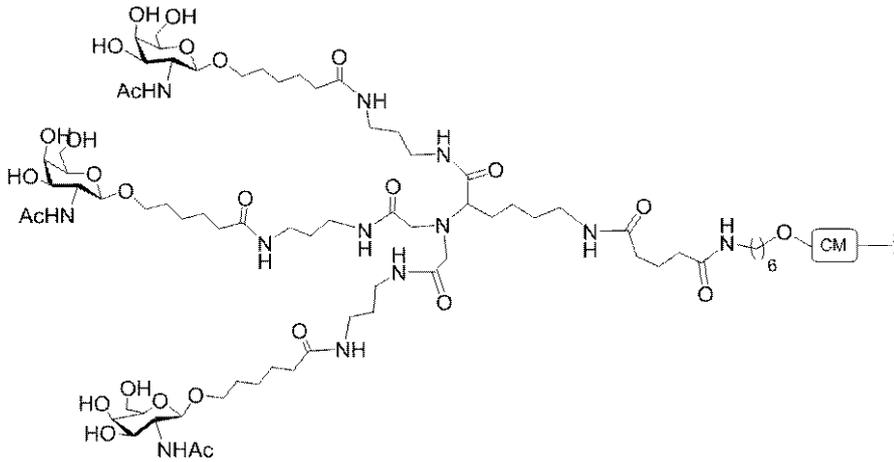
【 0 9 7 6 】

化合物 1 6 9 は、市販のものである。ベンジル（ペルフルオロフェニル）グルタレート
化合物 1 7 1 に添加することによって化合物 1 7 2 を調製した。PFP-TFA 及び D
IEA を DMF 中の 5 - （ベンジルオキシ） - 5 - オキソペンタン酸に添加することによ
って、ベンジル（ペルフルオロフェニル）グルタレート調製した。実施例 4 6 に例証さ
れる一般的手順を用いて、GalNAc₃-12 共役基を含むオリゴマー化合物 1 7 5 を
化合物 1 7 4 から調製した。共役基 GalNAc₃-12（GalNAc₃-12 a）の
GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基
を提供することができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(O
H)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-12（GalNAc₃-1
2 a-CM-）の構造は、以下に示される：

10

【 0 9 7 7 】

【 化 2 1 9 】

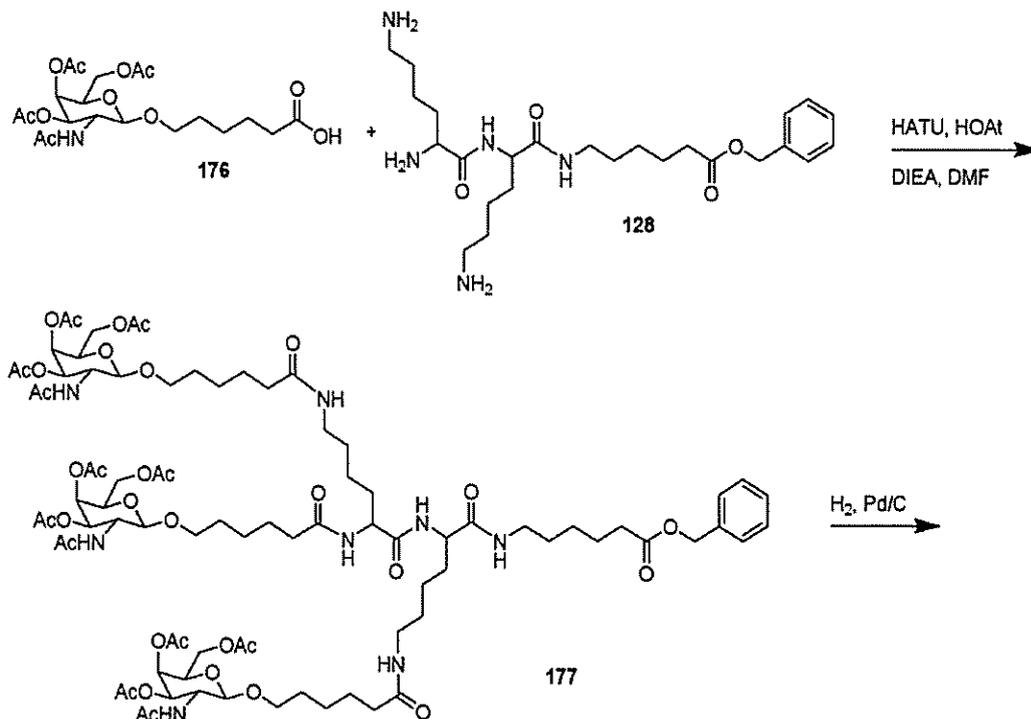


20

実施例 6 2 : GalNAc₃-13 を含むオリゴマー化合物 1 8 0 の調製

【 0 9 7 8 】

【 化 2 2 0 】



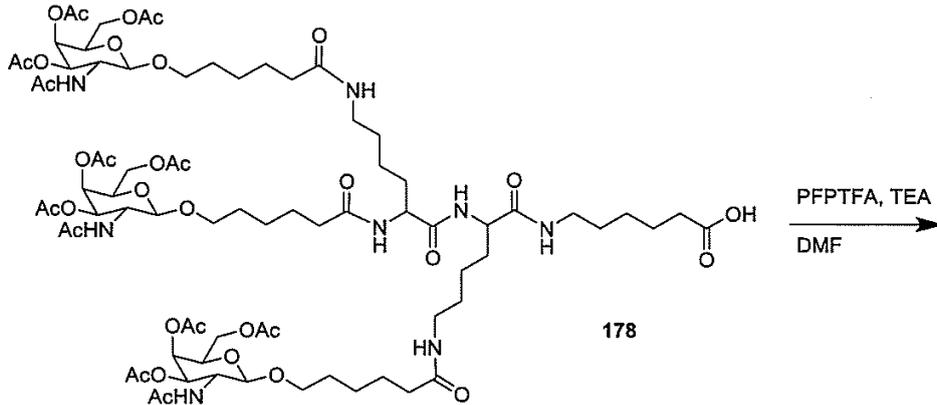
30

40

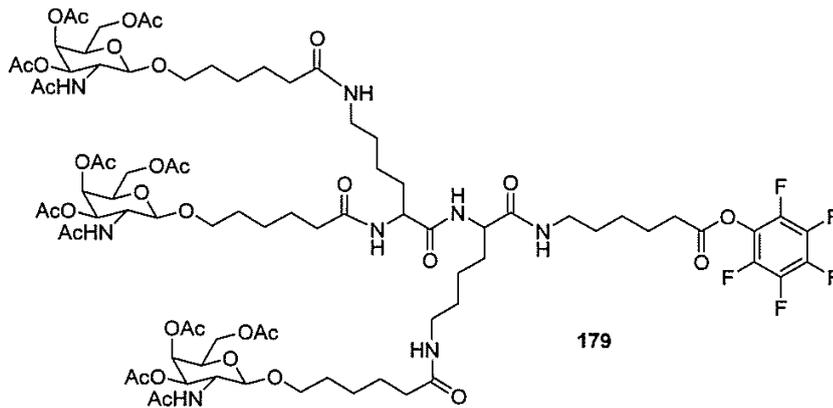
【 0 9 7 9 】

50

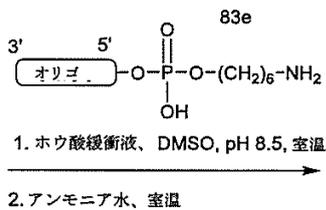
【化 2 2 1】



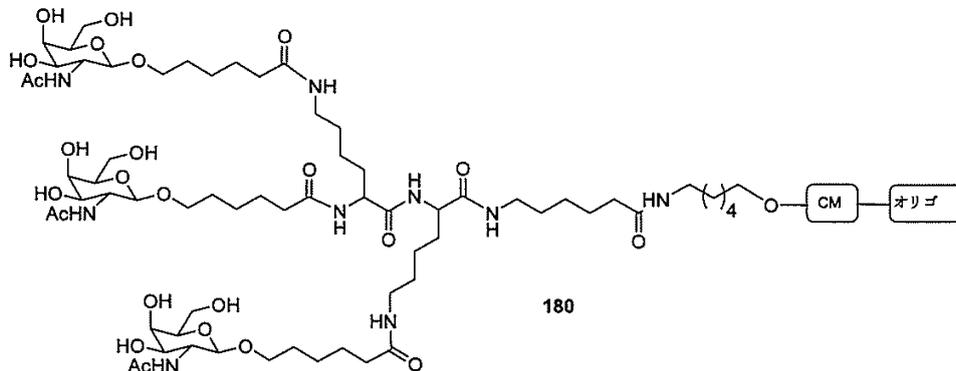
10



20



30



40

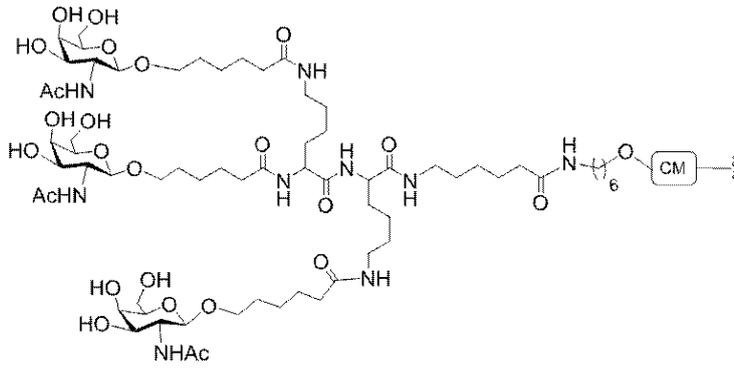
【 0 9 8 0】

実施例 2 に示される一般的手順を用いて、化合物 176 を調製した。実施例 49 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-13 共役基を含むオリゴマー化合物 180 を化合物 177 から調製した。共役基 GalNAc₃-13 (GalNAc₃-13a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-13 (GalNAc₃-13a-CM-) の構造は、以下に示される：

【 0 9 8 1】

50

【化 2 2 2】



10

実施例 63 : GalNAc₃-14 を含むオリゴマー化合物 188 の調製
【0982】

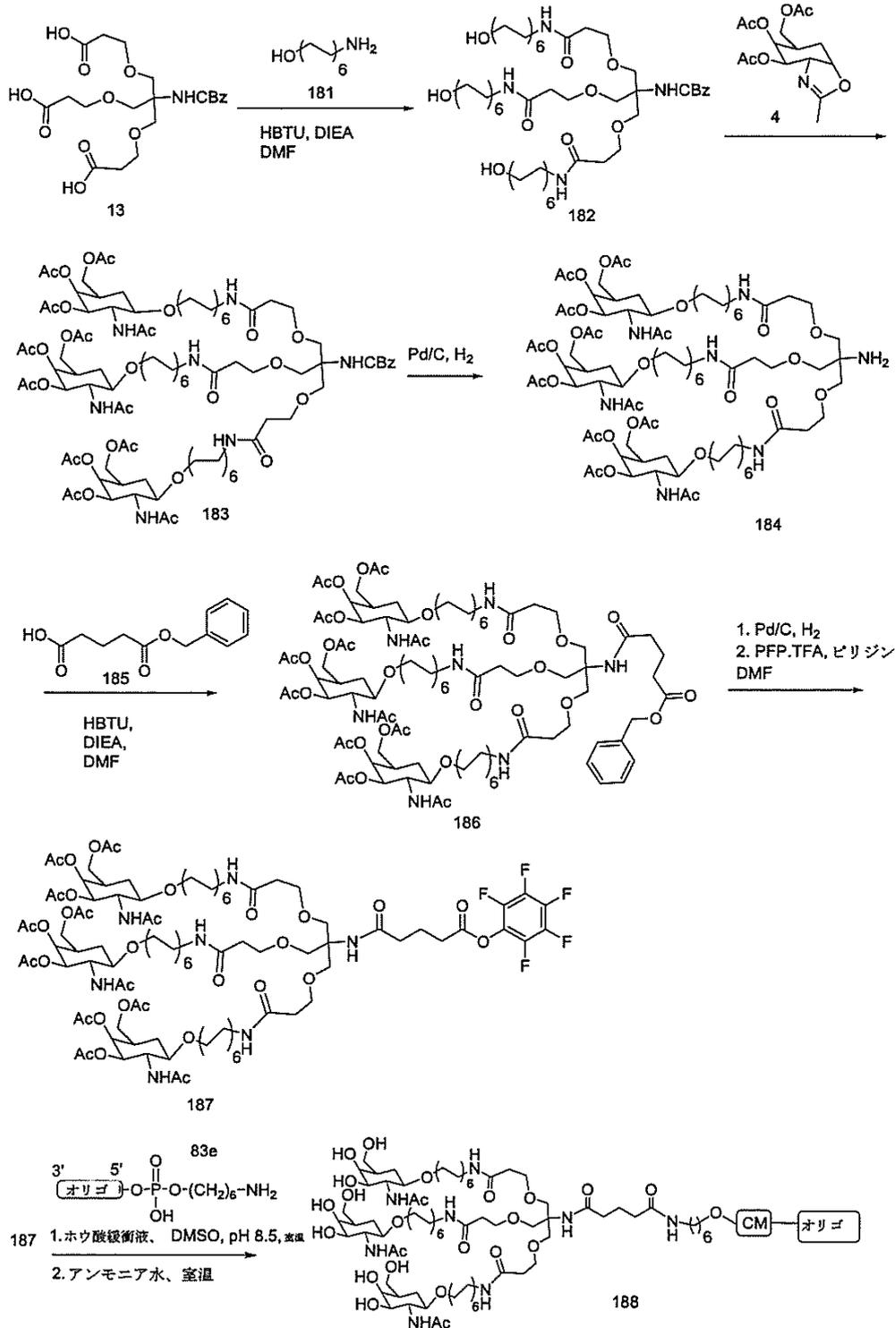
20

30

40

50

【化 2 2 3】



10

20

30

40

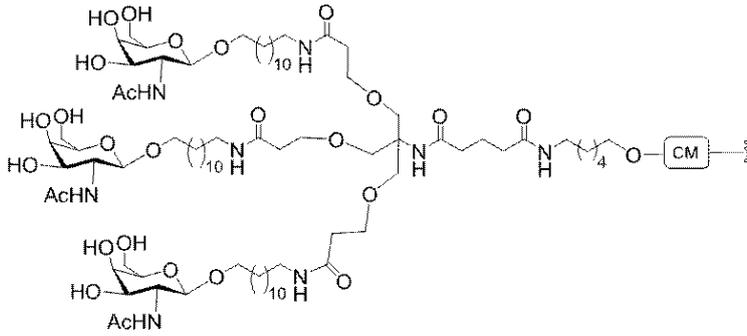
【 0 9 8 3】

化合物 181 及び 185 は、市販のものである。実施例 46 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-14 共役基を含むオリゴマー化合物 188 を化合物 187 から調製した。共役基 GalNAc₃-14 (GalNAc₃-14_a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-14 (GalNAc₃-14_a-CM-) の構造は、以下に示される：

【 0 9 8 4】

50

【化 2 2 4】

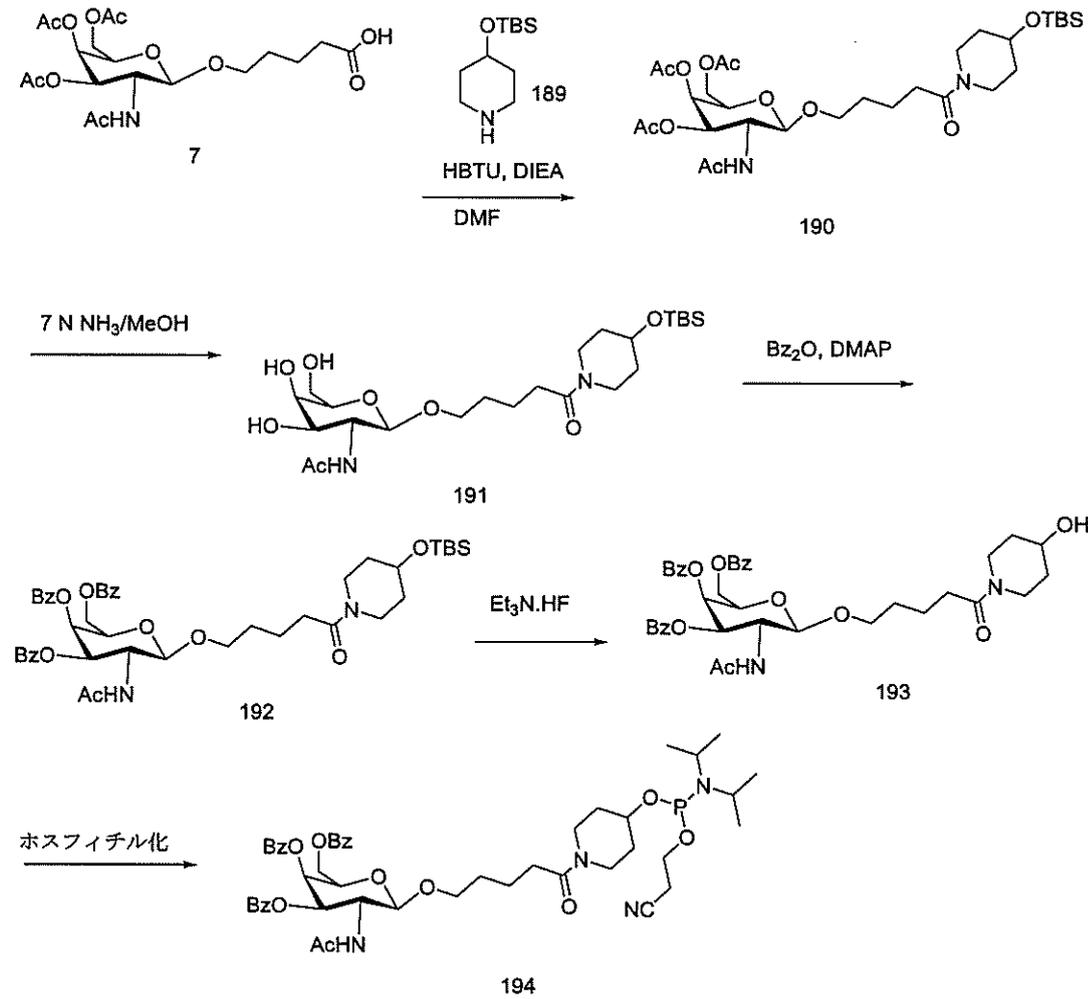


10

実施例 6 4 : GalNAc₃-15 を含むオリゴマー化合物 197 の調製

【 0 9 8 5】

【化 2 2 5】



20

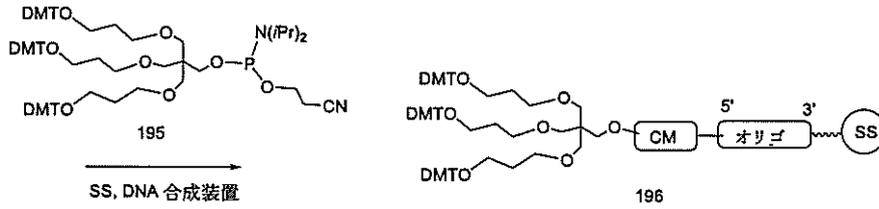
30

40

【 0 9 8 6】

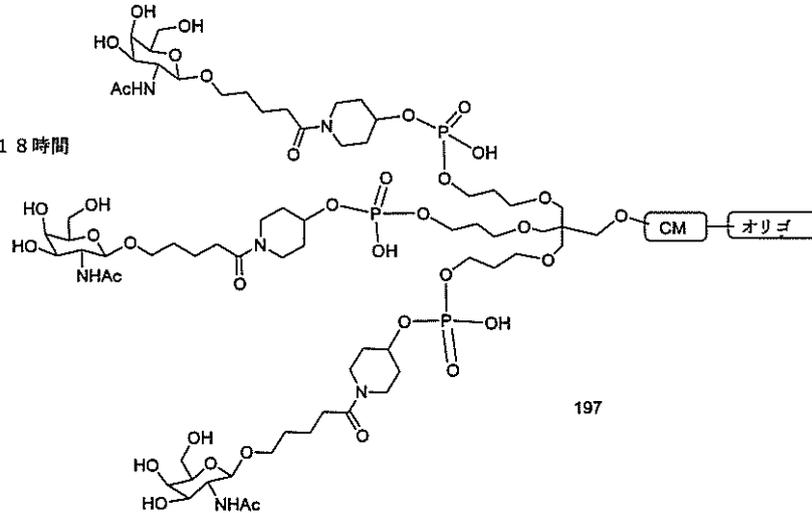
50

【化 2 2 6】



1. 194, DNA 合成装置

2. アンモニア水、55℃、18時間



10

20

【0987】

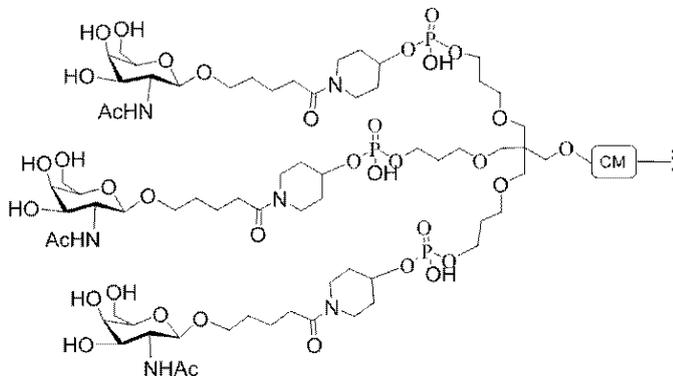
化合物 189 は、市販のものである。実施例 31 に示される一般の手順を用いて、化合物 195 を調製した。標準のオリゴヌクレオチド合成手順を用いて、GalNAc₃-15 共役基を含むオリゴマー化合物 197 を化合物 194 及び 195 から調製した。共役基 GalNAc₃-15 (GalNAc₃-15a) の GalNAc₃ クラスタ部分 を任意の切断可能部分と組み合わせ、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。

GalNAc₃-15 (GalNAc₃-15a-CM-) の構造は、以下に示される：

30

【0988】

【化 2 2 7】



40

実施例 65：生体内における SRB-1 を標的とする 5' - 共役基を含むオリゴヌクレオチドの用量依存的試験 (GalNAc₃-3、12、13、14、及び 15 の比較)

【0989】

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける SRB-1 のアンチセンス阻害について試験した。非共役 ISIS 353382 を標準物として含めた。GalNAc₃ 共役基のそれぞれは、ホスホジエステル連結 2' - デオキシ

50

アデノシヌクレオシド（切断可能部分）によってそれぞれのオリゴヌクレオチドの5'末端に取り付けられた。

【0990】

【表43】

表54

SRB-1を標的とする修飾ASO

ISIS 番号	配列(5'から3')	共役体	配列番号
353382	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es}$ $T_{es} T_e$	なし	829
661161	$GalNAC_3-3_{a-o} \cdot A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m$ $C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAC ₃ -3	831
671144	$GalNAC_3-12_{a-o} \cdot A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAC ₃ -1 2	831
670061	$GalNAC_3-13_{a-o} \cdot A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAC ₃ -1 3	831
671261	$GalNAC_3-14_{a-o} \cdot A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAC ₃ -1 4	831
671262	$GalNAC_3-15_{a-o} \cdot A_{do} G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}$ $^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAC ₃ -1 5	831

【0991】

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5-メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部（PS）を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部（PO）を示し、「o'」は、-O-P(=O)(OH)-を示す。共役基は、太字で表示されている。

【0992】

GalNAC₃-3_aの構造は、先の実施例39に示される。GalNAC₃-12_aの構造は、先の実施例61に示される。GalNAC₃-13_aの構造は、先の実施例62に示される。GalNAC₃-14_aの構造は、先の実施例63に示される。GalNAC₃-15_aの構造は、先の実施例64に示される。

処理

【0993】

6~8週齢のC57b16マウス（Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME）に、ISIS 353382、661161、671144、670061、671261、671262、または生理食塩水を、以下に示される投与量で1回または2回、皮下注入した。2回投与されたマウスは、第1の投与の3日後に第2の投与

を受けた。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBOGREEN（登録商標）RNA定量化試薬（Molecular Probes, Inc. Eugene, OR）を用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを標準プロトコルに従って決定した。以下の結果は、生理食塩水（対照）に対して標準化された各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。

【0994】

表55に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させた。単回用量を受けた動物と2回の用量を受けた動物との間で標的ノックダウンの著しい差は観察されなかった（ISIS 353382の投与量30及び2×15mg/kg、ならびにISIS 661161の投与量5及び2×2.5mg/kgを参照のこと）。ホスホジエステル連結GalNAc₃-3、12、13、14、及び15共役体を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド（ISIS 335382）と比較して、力価の大幅な増加を示した。

【0995】

10

20

30

40

50

【表 4 4】

表 5 5
SRB-1 mRNA (%生理食塩水)

ISIS番号	投与量(mg/kg)	SRB-1 mRNA(%生理食塩水)	ED ₅₀ (mg/kg)	共役体
生理食塩水	該当なし	100.0	該当なし	該当なし
353382	3	85.0	22.4	なし
	10	69.2		
	30	34.2		
	2×15	36.0		
661161	0.5	87.4	2.2	GalNAc ₃ -3
	1.5	59.0		
	5	25.6		
	2×2.5	27.5		
	15	17.4		
671144	0.5	101.2	3.4	GalNAc ₃ -12
	1.5	76.1		
	5	32.0		
	15	17.6		
670061	0.5	94.8	2.1	GalNAc ₃ -13
	1.5	57.8		
	5	20.7		
	15	13.3		
671261	0.5	110.7	4.1	GalNAc ₃ -14
	1.5	81.9		
	5	39.8		
	15	14.1		
671262	0.5	109.4	9.8	GalNAc ₃ -15
	1.5	99.5		
	5	69.2		
	15	36.1		

10

20

30

【0996】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な差は見られなかった (データ示されず)。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表 5 6 に示される。

40

【0997】

50

【表 4 5】

表 5 6

ISIS番号	投与量 (mg/kg)	ALT(U/L)	AST(U/L)	総ビリル ビ ン (mg/dL)	BUN(mg/dL)	共役体
生理食塩 水	該当なし	28	60	0.1	39	該当なし
353382	3	30	77	0.2	36	なし
	10	25	78	0.2	36	
	30	28	62	0.2	35	
	2×15	22	59	0.2	33	
661161	0.5	39	72	0.2	34	GalNAc ₃ -3
	1.5	26	50	0.2	33	
	5	41	80	0.2	32	
	2×2.5	24	72	0.2	28	
	15	32	69	0.2	36	
671144	0.5	25	39	0.2	34	GalNAc ₃ -12
	1.5	26	55	0.2	28	
	5	48	82	0.2	34	
	15	23	46	0.2	32	
670061	0.5	27	53	0.2	33	GalNAc ₃ -13
	1.5	24	45	0.2	35	
	5	23	58	0.1	34	
	15	24	72	0.1	31	
671261	0.5	69	99	0.1	33	GalNAc ₃ -14
	1.5	34	62	0.1	33	
	5	43	73	0.1	32	
	15	32	53	0.2	30	
671262	0.5	24	51	0.2	29	GalNAc ₃ -15
	1.5	32	62	0.1	31	
	5	30	76	0.2	32	
	15	31	64	0.1	32	

実施例 6 6 : 5' - GalNAc₃ クラスターを含む SRB - 1 を標的とするオリゴヌクレ
オチドによる生体内におけるアンチセンス阻害へのさまざまな切断可能部分の影響

【 0 9 9 8 】

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける SRB
- 1 のアンチセンス阻害について試験した。GalNAc₃ 共役基のそれぞれは、ホスホ
ジエステル連結ヌクレオチド（切断可能部分（CM））によってそれぞれのオリゴヌクレ
オチドの 5' 末端に取り付けられた。

【 0 9 9 9 】

10

20

30

40

50

【表 4 6】

表 5 7
SRB-1 を標的とする修飾 ASO

ISIS 番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
661161	GalNAc ₃ -3 _a -o ₁ ·A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	831
670699	GalNAc ₃ -3 _a -o ₁ ·T _{do} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	T _d	834
670700	GalNAc ₃ -3 _a -o ₁ ·A _{eo} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _e	831
670701	GalNAc ₃ -3 _a -o ₁ ·T _{eo} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	T _e	834
671165	GalNAc ₃ -13 _a -o ₁ ·A _{do} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -13a	A _d	831

10

20

【1000】

大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5 - メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2' - MOE 修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、- D - 2' - デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部 (PS) を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部 (PO) を示し、「o₁」は、- O - P (= O) (OH) - を示す。共役基は、太字で表示されている。

30

【1001】

GalNAc₃ - 3_a の構造は、先の実施例 39 に示した。GalNAc₃ - 13_a の構造は、先の実施例 62 に示した。

処理

【1002】

6 ~ 8 週齢の C57b16 マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) に、ISIS 661161、670699、670700、670701、671165、または生理食塩水を、以下に示される投与量で 1 回、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 72 時間後にマウスを殺して、リアルタイム PCR 及び RIBOGREEN (登録商標) RNA 定量化試薬 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を用いて、肝臓における SRB - 1 mRNA レベルを決定した。以下の結果は、生理食塩水 (対照) に対して標準化された各処理群の SRB - 1 mRNA レベルの平均パーセントとして提示される。

40

【1003】

表 58 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で SRB - 1 mRNA レベルを低下させた。さまざまな切断可能部分を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドはすべて、同様の力価を示した。

50

【 1 0 0 4 】

【 表 4 7 】

表 5 8

SRB-1 mRNA (%生理食塩水)

ISIS番号	投与量(mg/kg)	SRB-1 mRNA(%生理食塩水)	GalNAc ₃ クラスター	CM
生理食塩水	該当なし	100.0	該当なし	該当なし
661161	0.5	87.8	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	61.3		
	5	33.8		
	15	14.0		
670699	0.5	89.4	GalNAc ₃ -3a	T _d
	1.5	59.4		
	5	31.3		
	15	17.1		
670700	0.5	79.0	GalNAc ₃ -3a	A _c
	1.5	63.3		
	5	32.8		
	15	17.9		
670701	0.5	79.1	GalNAc ₃ -3a	T _c
	1.5	59.2		
	5	35.8		
	15	17.7		
671165	0.5	76.4	GalNAc ₃ -13a	A _d
	1.5	43.2		
	5	22.6		
	15	10.0		

10

20

30

【 1 0 0 5 】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な差は見られなかった (データ示されず)。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表 5 6 に示される。

40

【 1 0 0 6 】

50

【表 4 8】

表 5 9

ISIS番号	投与量 (mg/kg)	ALT(U /L)	AST(U /L)	総ビリル ビ ン (mg/dL)	BUN(mg /dL)	GalNAc ₃ ク ラスター	CM
生理食塩 水	該当な し	24	64	0.2	31	該当なし	該 当 なし
661161	0.5	25	64	0.2	31	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	24	50	0.2	32		
	5	26	55	0.2	28		
	15	27	52	0.2	31		
670699	0.5	42	83	0.2	31	GalNAc ₃ -3a	T _d
	1.5	33	58	0.2	32		
	5	26	70	0.2	29		
	15	25	67	0.2	29		
670700	0.5	40	74	0.2	27	GalNAc ₃ -3a	A _e
	1.5	23	62	0.2	27		
	5	24	49	0.2	29		
	15	25	87	0.1	25		
670701	0.5	30	77	0.2	27	GalNAc ₃ -3a	T _e
	1.5	22	55	0.2	30		
	5	81	101	0.2	25		
	15	31	82	0.2	24		
671165	0.5	44	84	0.2	26	GalNAc ₃ -13a	A _d
	1.5	47	71	0.1	24		
	5	33	91	0.2	26		
	15	33	56	0.2	29		

10

20

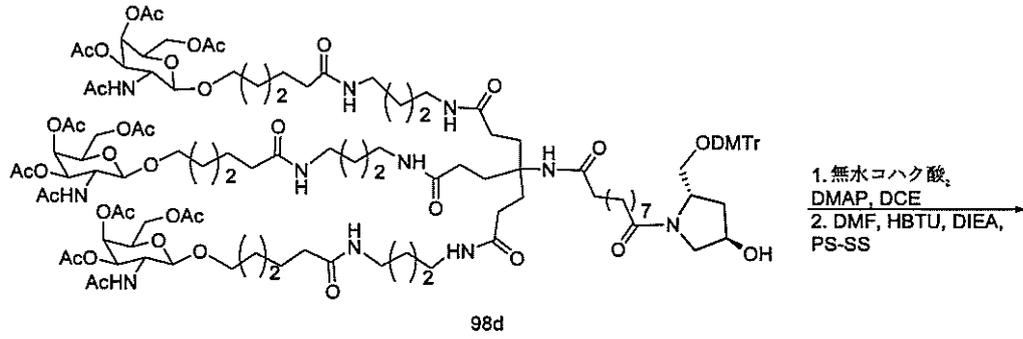
30

実施例 6 7 : GalNAc₃ - 1 6 を含むオリゴマー化合物 1 9 9 の調製
【 1 0 0 7 】

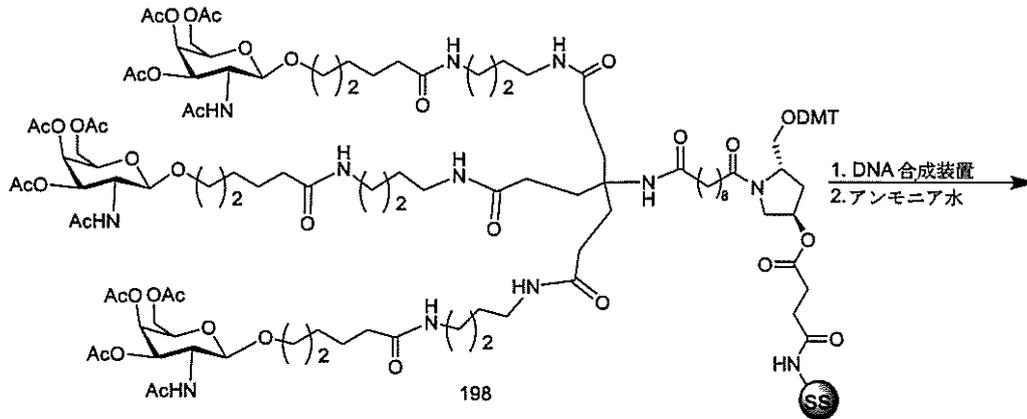
40

50

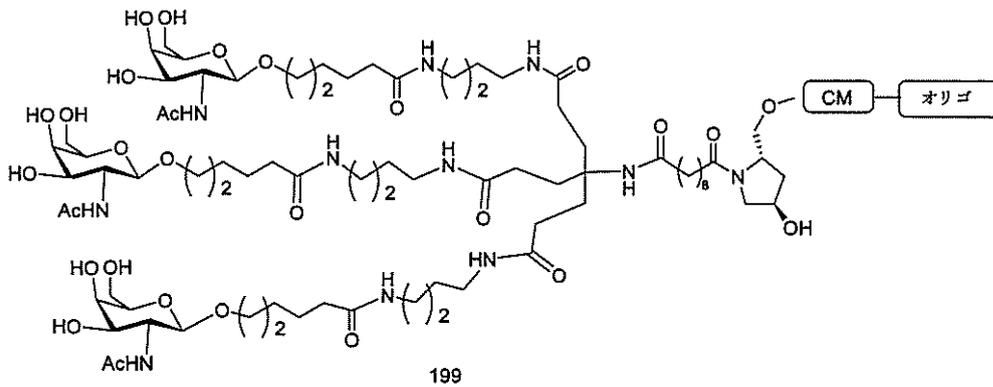
【化 2 2 8】



10



20



30

【1008】

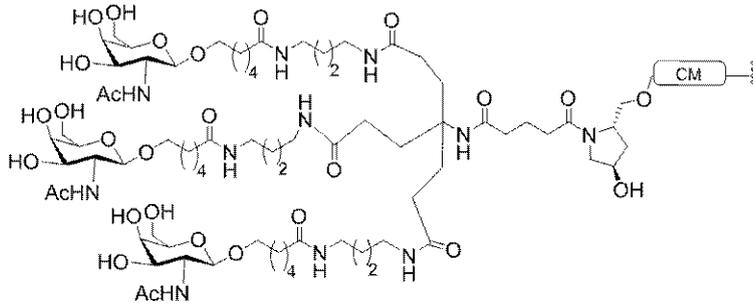
実施例7及び9に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-16共役基を含むオリゴマー化合物199を調製する。共役基GalNAc₃-16 (GalNAc₃-16 a)のGalNAc₃クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-16 (GalNAc₃-16 a-CM-)の構造は、以下に示される：

40

【1009】

50

【化 2 2 9】

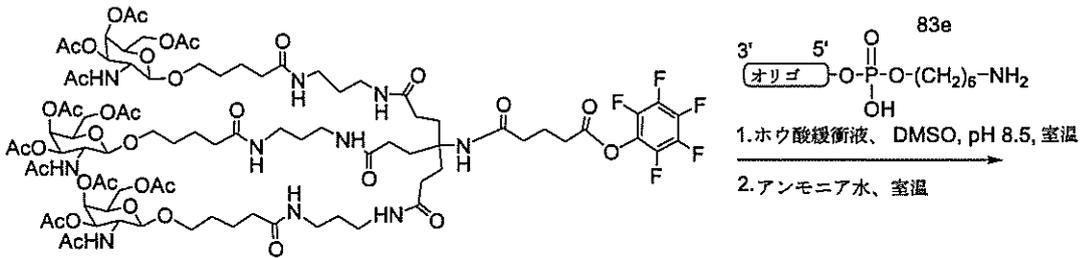


10

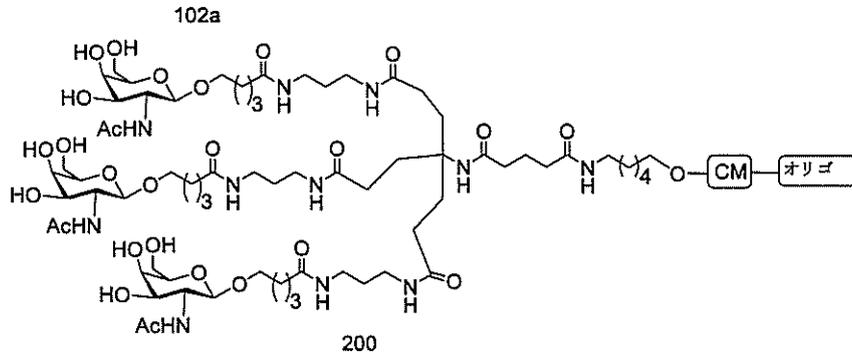
実施例 68 : GalNAc₃-17を含むオリゴマー化合物 200 の調製

【1010】

【化 2 3 0】



20



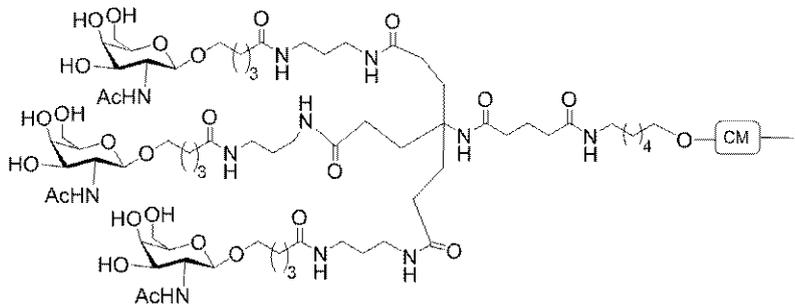
30

【1011】

実施例 46 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-17 共役基を含むオリゴマー化合物 200 を調製した。共役基 GalNAc₃-17 (GalNAc₃-17a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-17 (GalNAc₃-17a-CM-) の構造は、以下に示される：

【1012】

【化 2 3 1】



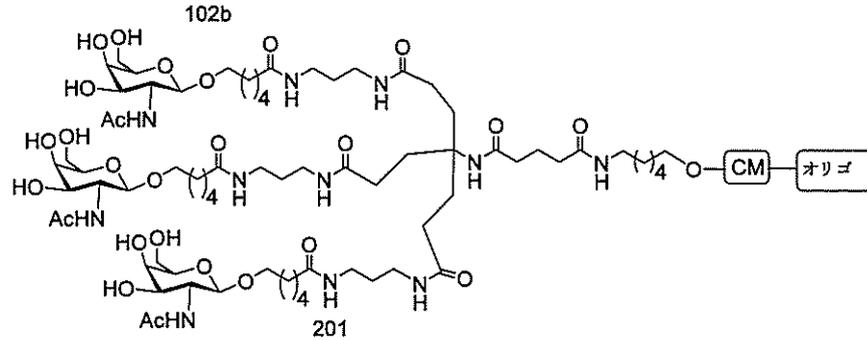
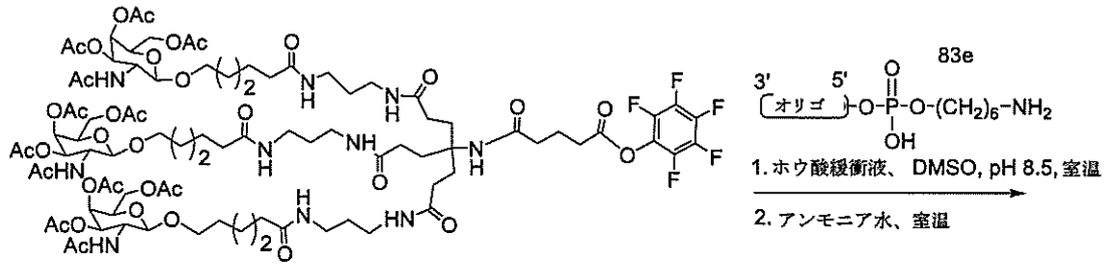
40

実施例 69 : GalNAc₃-18を含むオリゴマー化合物 201 の調製

【1013】

50

【化 2 3 2】



10

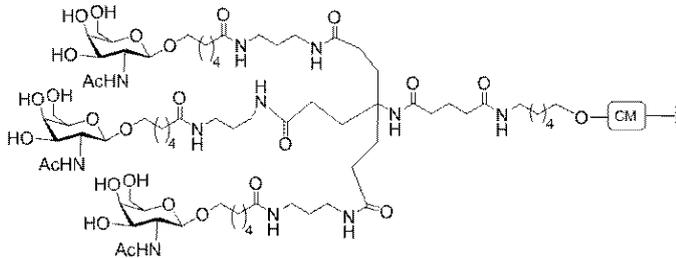
【1 0 1 4】

実施例 46 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-18 共役基を含むオリゴマー化合物 201 を調製した。共役基 GalNAc₃-18 (GalNAc₃-18a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-18 (GalNAc₃-18a-CM-) の構造は、以下に示される：

20

【1 0 1 5】

【化 2 3 3】



30

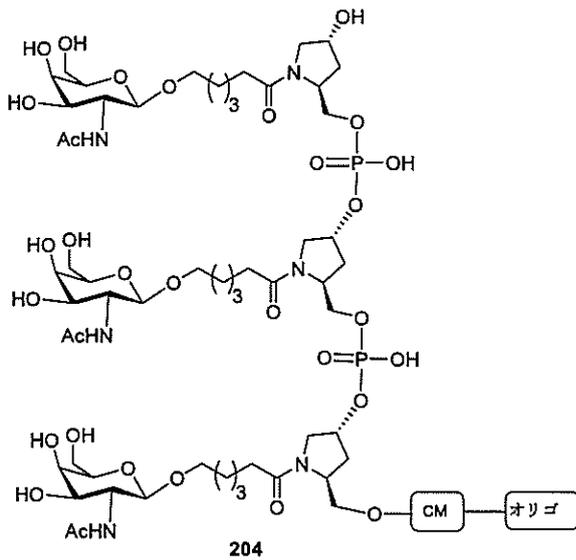
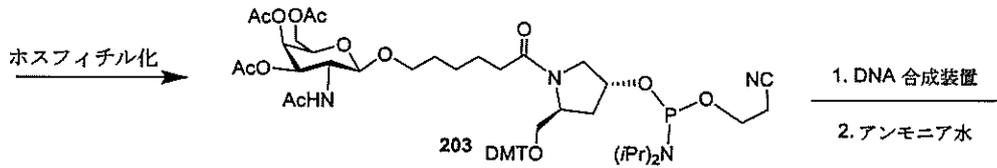
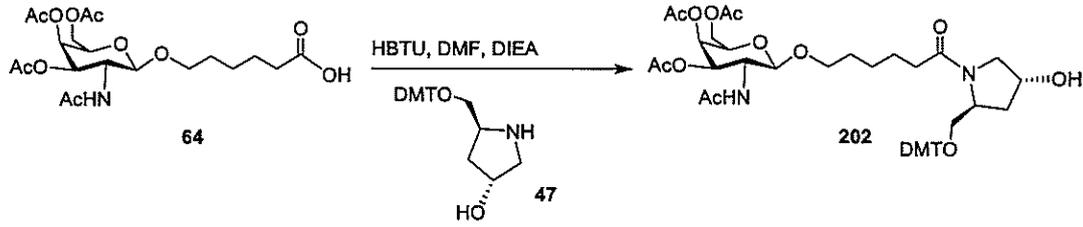
実施例 70 : GalNAc₃-19 を含むオリゴマー化合物 204 の調製

【1 0 1 6】

40

50

【化 2 3 4】

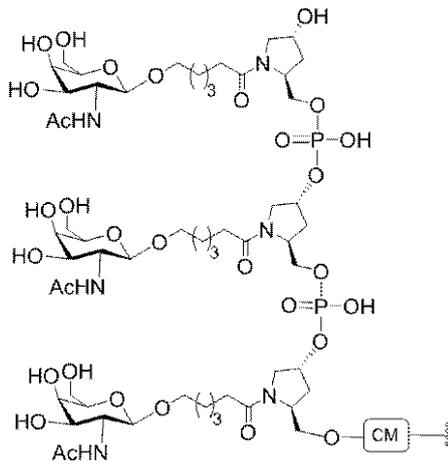


【1 0 1 7】

実施例 5 2 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-19 共役基を含むオリゴマー化合物 204 を化合物 6 4 から調製した。共役基 GalNAc₃-19 (GalNAc₃-19 a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-19 (GalNAc₃-19 a-CM-) の構造は、以下に示される：

【1 0 1 8】

【化 2 3 5】



10

20

30

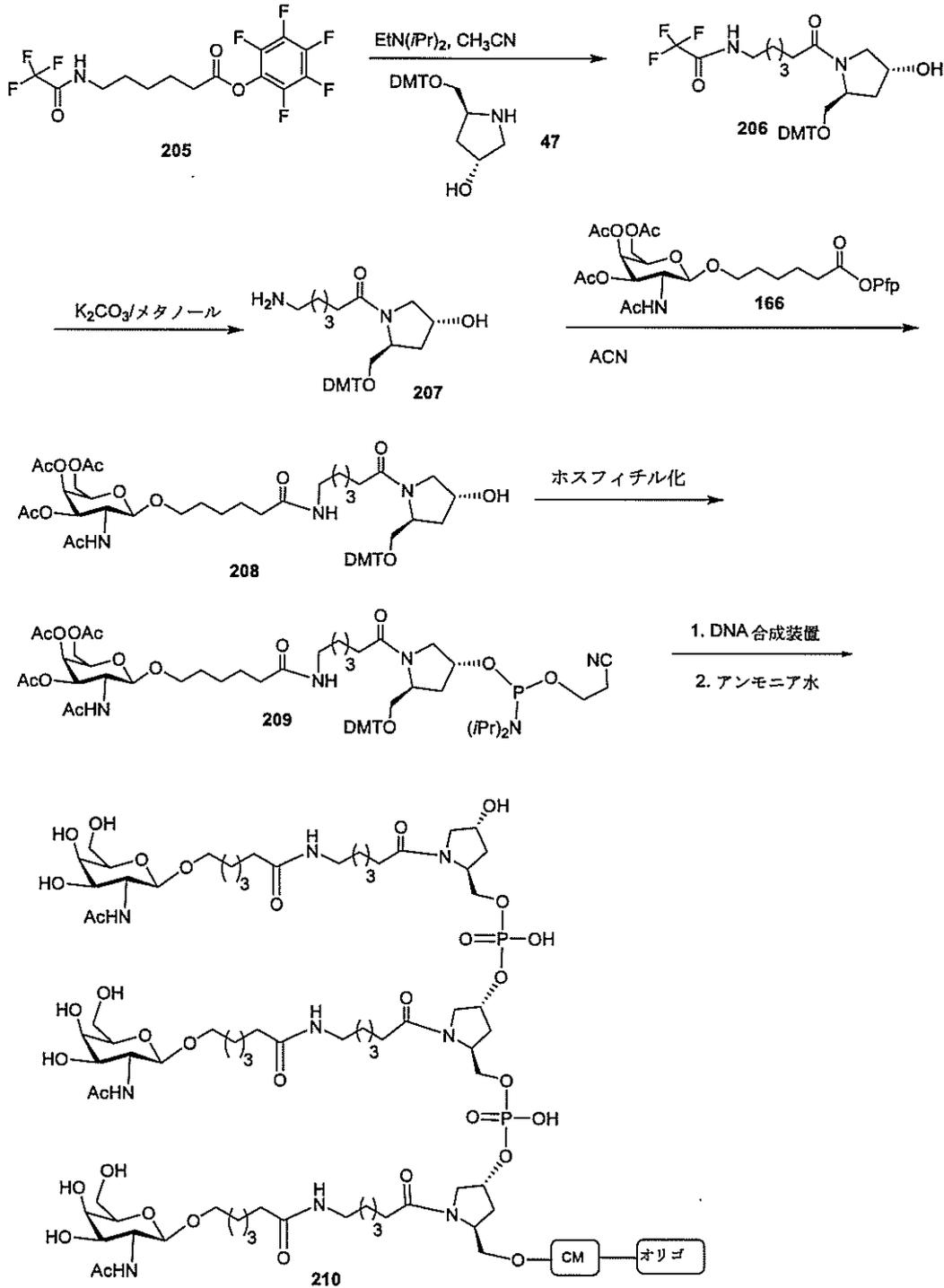
40

50

実施例 71 : GalNAc₃-20 を含むオリゴマー化合物 210 の調製

【 1 0 1 9 】

【 化 2 3 6 】



【 1 0 2 0 】

PFP-TFA及びDIEAを、トリフリン酸無水物を6-アミノヘキサン酸に添加することによって調製したアセトニトリル中の6-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)ヘキサン酸に添加することによって、化合物205を調製した。反応混合物を80に加熱し、その後、室温まで下げた。実施例52に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-20共役基を含むオリゴマー化合物210を化合物208から調製した。共役基GalNAc₃-20(GalNAc₃-20a)のGalNAc₃クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{Ad}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-$ で

10

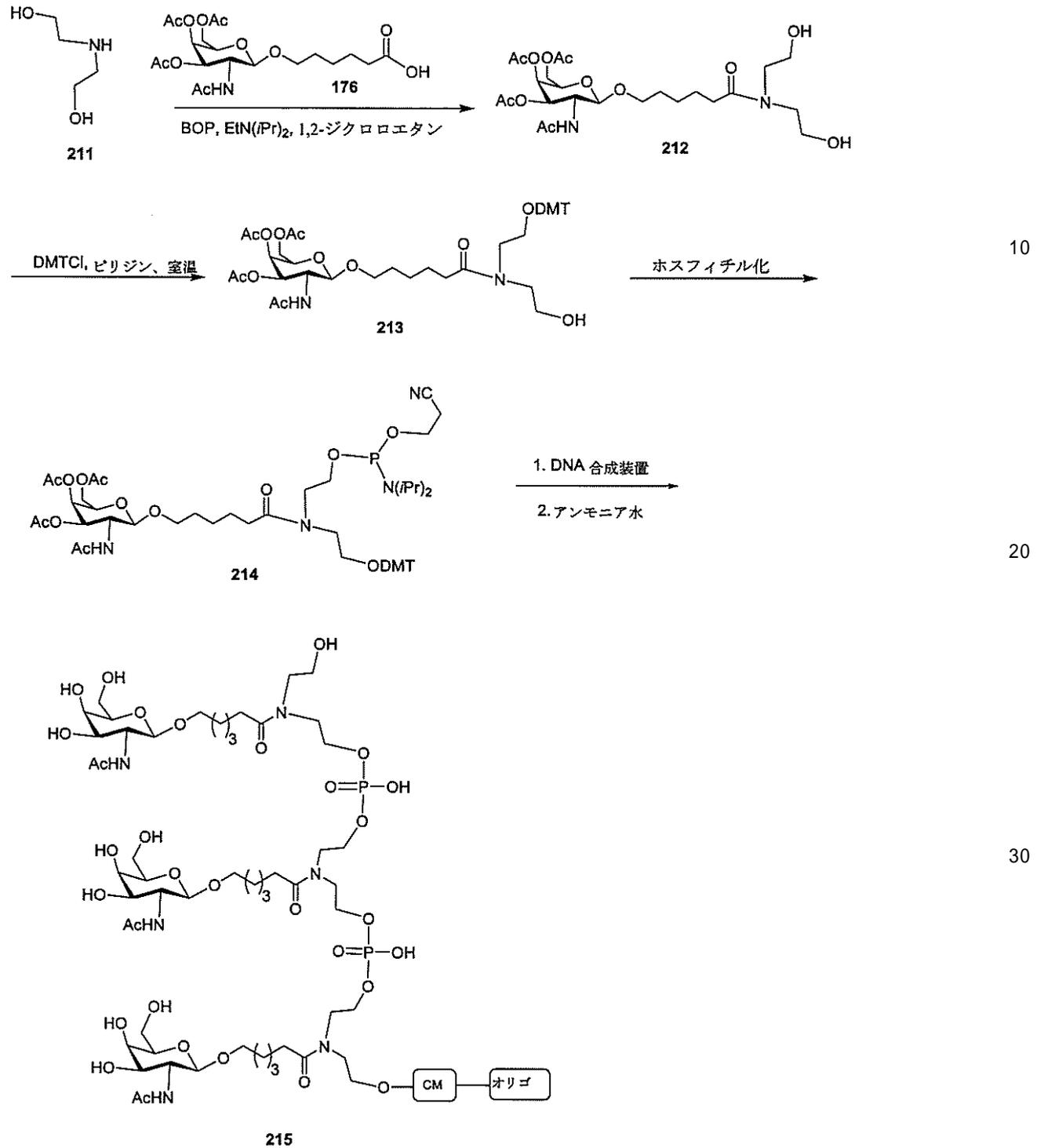
20

30

40

50

【化 2 3 8】



【1 0 2 3】

化合物 211 は、市販のものである。実施例 52 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-21 共役基を含むオリゴマー化合物 215 を化合物 213 から調製した。共役基 GalNAc₃-21 (GalNAc₃-21a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-21 (GalNAc₃-21a-CM-) の構造は、以下に示される：

【1 0 2 4】

10

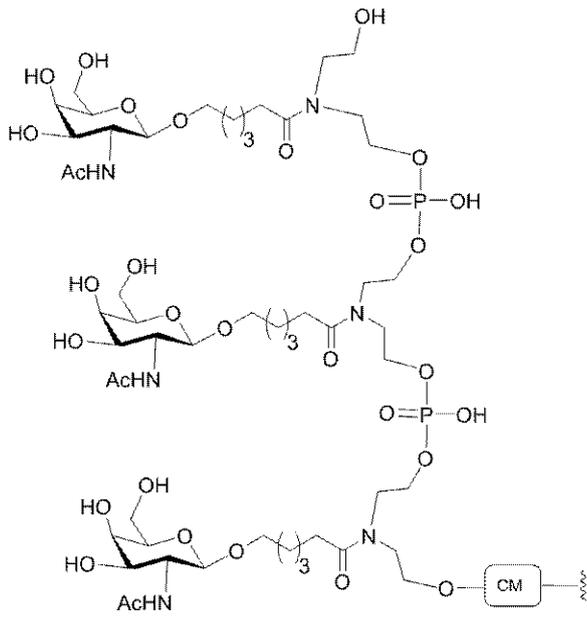
20

30

40

50

【化 2 3 9】



10

実施例 73 : GalNAc₃-22 を含むオリゴマー化合物 221 の調製
【 1 0 2 5】

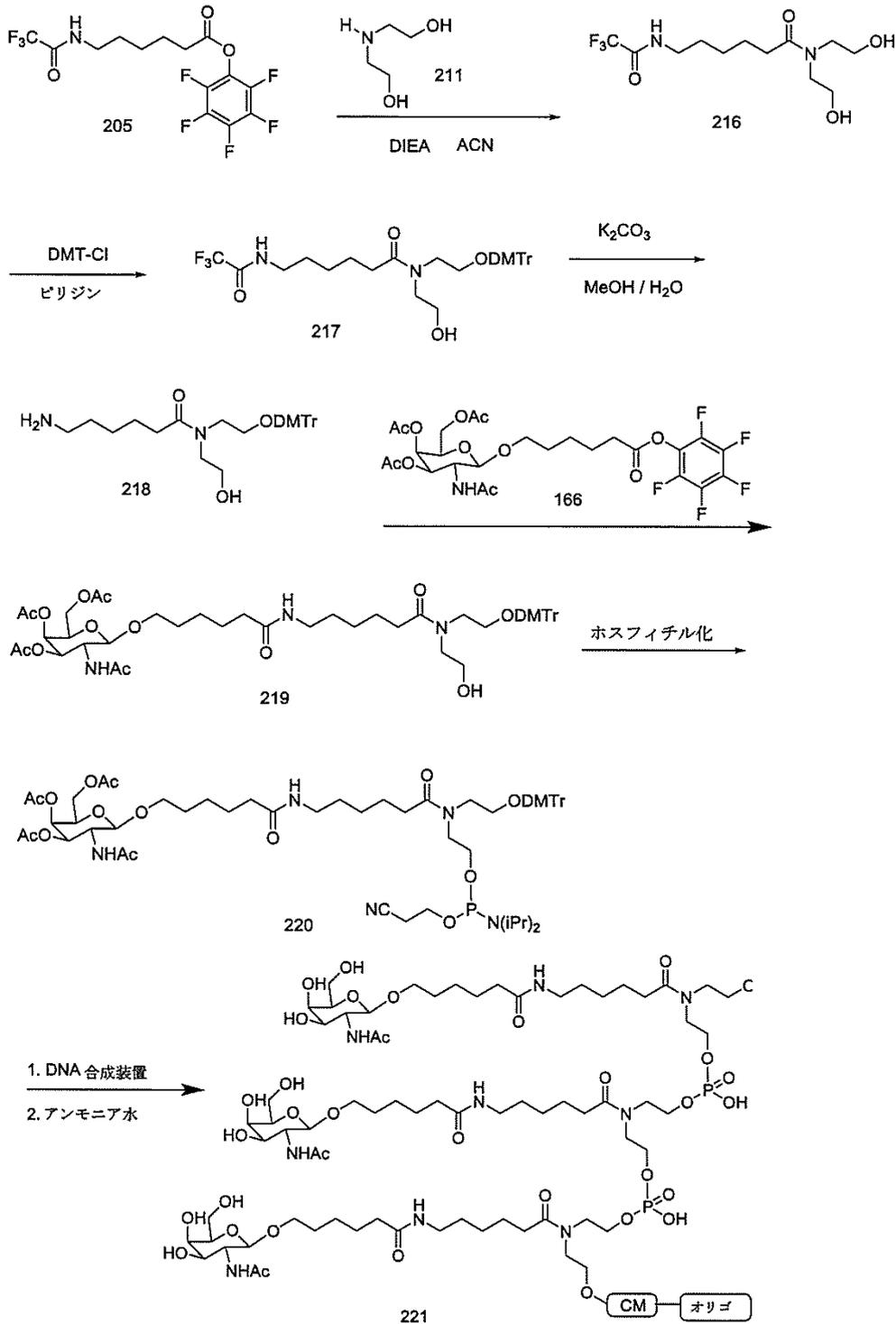
20

30

40

50

【化 2 4 0】

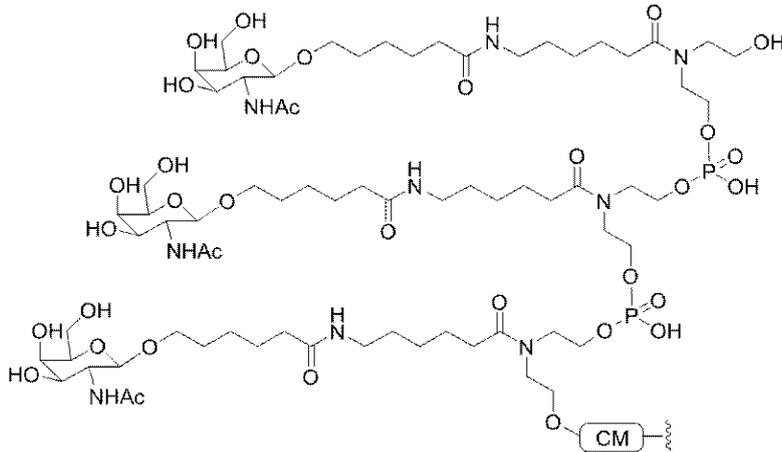


【 1 0 2 6】

ジイソプロピルアンモニウムテトラゾリドを用いて、化合物 220 を化合物 219 から調製した。実施例 5 2 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-21 共役基を含むオリゴマー化合物 221 を化合物 220 から調製する。共役基 GalNAc₃-22 (GalNAc₃-22a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせ、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、切断可能部分は、-P(=O)(OH)-Ad-P(=O)(OH)-である。GalNAc₃-22 (GalNAc₃-22a-CM-) の構造は、以下に示される：

【 1 0 2 7】

【化 2 4 1】



10

実施例 74 : 5' - GalNAc₃ 共役体を含む SRB - 1 を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害へのさまざまな切断可能部分の影響

【 1 0 2 8 】

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける SRB - 1 のアンチセンス阻害について試験した。GalNAc₃ 共役基のそれぞれは、それぞれのオリゴヌクレオチドの 5' 末端に取り付けられた。

20

【 1 0 2 9 】

【表 4 9】

表 6 0

SRB - 1 を標的とする修飾 ASO

ISIS 番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
353382	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} m ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	該当なし	該当なし	829
661161	GalNAc ₃ -3 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	831
666904	GalNAc ₃ -3 _a -o'-G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	PO	829
675441	GalNAc ₃ -17 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -17a	A _d	831
675442	GalNAc ₃ -18 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -18a	A _d	831

30

40

【 1 0 3 0 】

すべての表において、大文字は、各ヌクレオシドの核酸塩基を示し、mCは、5 - メチルシトシンを示す。下付き文字「e」は、2' - MOE 修飾ヌクレオチドを示し、「d」は、

50

- D - 2 ' - デオキシリボヌクレオシドを示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部 (P S) を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部 (P O) を示し、「o'」は、 - O - P (= O) (O H) - を示す。共役基は、太字で表示されている。

【 1 0 3 1 】

G a l N A c ₃ - 3 a の構造は、先の実施例 3 9 に示した。G a l N A c ₃ - 1 7 a の構造は、先の実施例 6 8 に示し、G a l N A c ₃ - 1 8 a の構造は、実施例 6 9 に示した。

処理

【 1 0 3 2 】

6 ~ 8 週齢の C 5 7 B L / 6 マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r y , B a r H a r b o r , M E) に、表 6 0 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは生理食塩水を、以下に示される投与量で 1 回、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 7 2 時間後にマウスを 殺して、リアルタイム P C R 及び R I B O G R E E N (登録商標) R N A 定量化試薬 (M o l e c u l a r P r o b e s , I n c . E u g e n e , O R) を用いて、肝臓における S R B - 1 m R N A レベルを決定した。以下の結果は、生理食塩水 (対照) に対して標準化された各処理群の S R B - 1 m R N A レベルの平均パーセントとして提示される。

【 1 0 3 3 】

表 6 1 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で S R B - 1 m R N A レベルを低下させた。G a l N A c 共役体を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、同様の力価を示し、G a l N A c 共役体を欠く親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であった。

【 1 0 3 4 】

10

20

30

40

50

【表 5 0】

表 6 1

SRB-1 mRNA (%生理食塩水)

ISIS番号	投与量(mg/kg)	SRB-1 mRNA(%生理食塩水)	GalNAc ₃ クラスター	CM
生理食塩水	該当なし	100.0	該当なし	該当なし
353382	3	79.38	該当なし	該当なし
	10	68.67		
	30	40.70		
661161	0.5	79.18	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	75.96		
	5	30.53		
	15	12.52		
666904	0.5	91.30	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	57.88		
	5	21.22		
	15	16.49		
675441	0.5	76.71	GalNAc ₃ -17a	A _d
	1.5	63.63		
	5	29.57		
	15	13.49		
675442	0.5	95.03	GalNAc ₃ -18a	A _d
	1.5	60.06		
	5	31.04		
	15	19.40		

10

20

30

【1035】

血清における肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を、標準のプロトコルを用いて、生理食塩水を注入したマウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な変化は見られなかった(データ示されず)。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表62に示される。

【1036】

40

50

【表 5 1】

表 6 2

ISIS番号	投与量 (mg/kg)	ALT(U /L)	AST(U /L)	総ビリル ビ ン (mg/dL)	BUN(mg /dL)	GalNAc ₃ ク ラスター	CM
生理食塩 水	該当な し	26	59	0.16	42	該当なし	該 当 なし
353382	3	23	58	0.18	39	該当なし	該 当 なし
	10	28	58	0.16	43		
	30	20	48	0.12	34		
661161	0.5	30	47	0.13	35	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	23	53	0.14	37		
	5	26	48	0.15	39		
	15	32	57	0.15	42		
666904	0.5	24	73	0.13	36	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	21	48	0.12	32		
	5	19	49	0.14	33		
	15	20	52	0.15	26		
675441	0.5	42	148	0.21	36	GalNAc ₃ -17a	A _d
	1.5	60	95	0.16	34		
	5	27	75	0.14	37		
	15	24	61	0.14	36		
675442	0.5	26	65	0.15	37	GalNAc ₃ -18a	A _d
	1.5	25	64	0.15	43		
	5	27	69	0.15	37		
	15	30	84	0.14	37		

実施例 7 5 : 5' - 共役基を含むオリゴヌクレオチドの薬物動態分析

【 1 0 3 7 】

実施例 6 5、6 6、及び 7 4 に記載される処理手順に従って得た肝臓試料を用いて、上の表 5 4、5 7、及び 6 0 における ASO の PK を評価した。肝臓試料を切り刻み、標準のプロトコルを用いて抽出し、内部標準とともに IP - HPLC - MS によって分析した。適切な UV ピークを統合することによってすべての代謝物の合わせた組織レベル (µg/g) を測定し、適切な抽出イオンクロマトグラム (EIC) を用いて、共役体を欠く全長 ASO (この場合、ISIS 番号 3 5 3 3 8 2 の「親」) の組織レベルを測定した。

【 1 0 3 8 】

10

20

30

40

50

【表 5 2】

表 6 3
肝臓におけるPK分析

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	UVによる全組織レベル(μg/g)	EICによる親ASO組織レベル(μg/g)	GalNAc ₃ クラスター	CM
353382	3	8.9	8.6	該当なし	該当なし
	10	22.4	21.0		
	30	54.2	44.2		
661161	5	32.4	20.7	GalNAc ₃ -3a	A _d
	15	63.2	44.1		
671144	5	20.5	19.2	GalNAc ₃ -12a	A _d
	15	48.6	41.5		
670061	5	31.6	28.0	GalNAc ₃ -13a	A _d
	15	67.6	55.5		
671261	5	19.8	16.8	GalNAc ₃ -14a	A _d
	15	64.7	49.1		
671262	5	18.5	7.4	GalNAc ₃ -15a	A _d
	15	52.3	24.2		
670699	5	16.4	10.4	GalNAc ₃ -3a	T _d
	15	31.5	22.5		
670700	5	19.3	10.9	GalNAc ₃ -3a	A _e
	15	38.1	20.0		
670701	5	21.8	8.8	GalNAc ₃ -3a	T _e
	15	35.2	16.1		
671165	5	27.1	26.5	GalNAc ₃ -13a	A _d
	15	48.3	44.3		
666904	5	30.8	24.0	GalNAc ₃ -3a	PO
	15	52.6	37.6		
675441	5	25.4	19.0	GalNAc ₃ -17a	A _d
	15	54.2	42.1		
675442	5	22.2	20.7	GalNAc ₃ -18a	A _d
	15	39.6	29.0		

【1039】

上の表 6 3 における結果は、特に GalNAc₃ 共役基を有するオリゴヌクレオチドと GalNAc₃ 共役基を有しないオリゴヌクレオチドとの間の投薬の違いを考慮に入れた場合、オリゴヌクレオチド投与の 72 時間後に、GalNAc₃ 共役基を含むオリゴヌクレオチドの肝臓組織レベルが、GalNAc₃ 共役基を含まない親オリゴヌクレオチド (ISIS 353382) の肝臓組織レベルよりも高かったことを示す。さらに、72 時間までに、GalNAc₃ 共役基を含む各オリゴヌクレオチドの 40 ~ 98 % が親化合物に代謝され、GalNAc₃ 共役基がオリゴヌクレオチドから切断されたことを示す。

実施例 76 : GalNAc₃ - 23 を含むオリゴマー化合物 230 の調製

【1040】

10

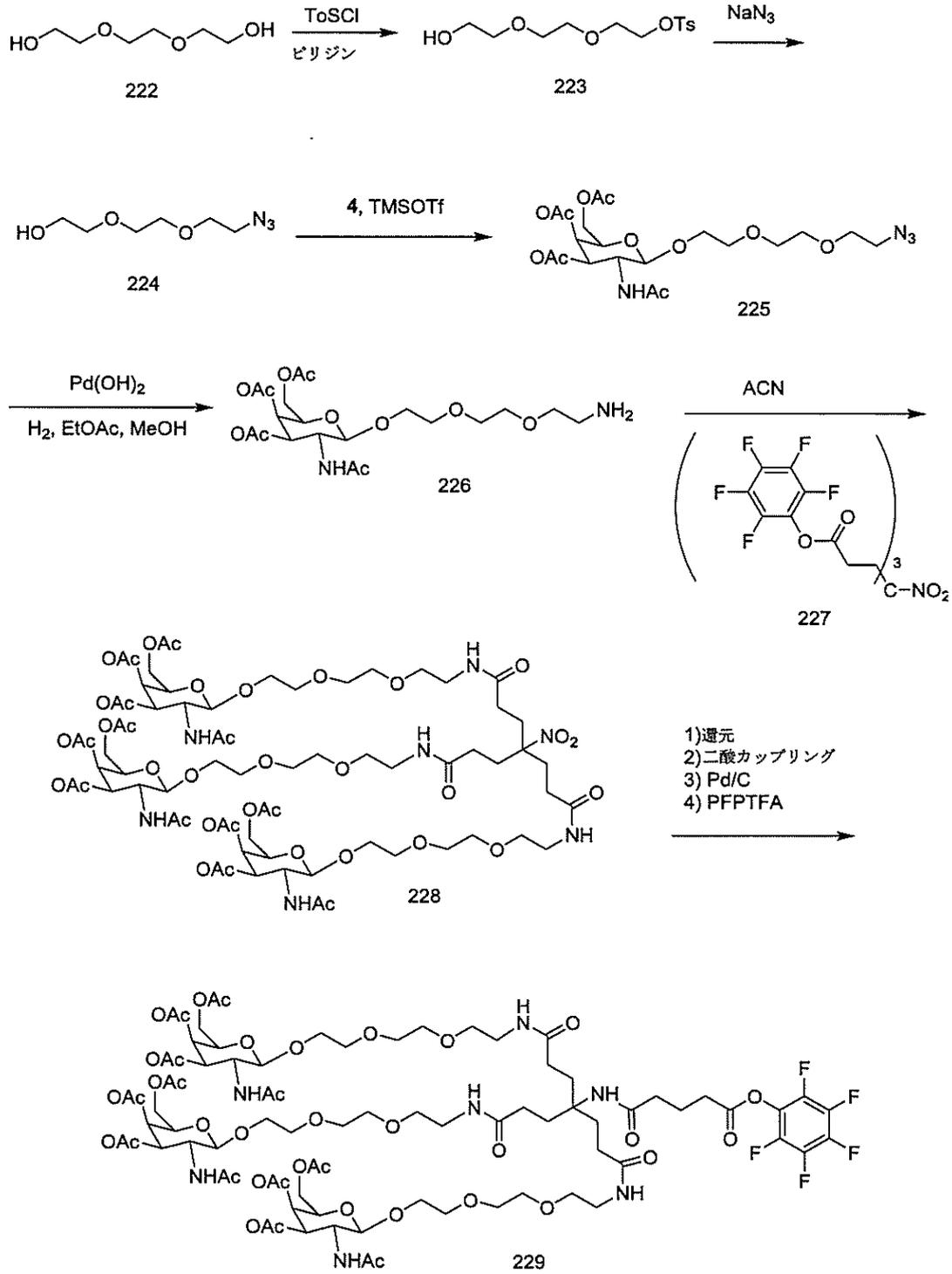
20

30

40

50

【化 2 4 2】



10

20

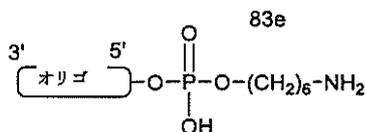
30

40

【 1 0 4 1 】

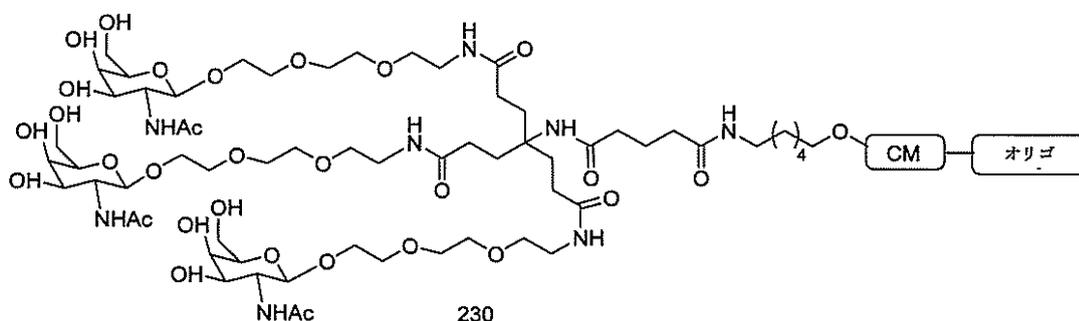
50

【化 2 4 3】



1. ホウ酸緩衝液、DMSO, pH 8.5, 室温

2. アンモニア水、室温



10

【1042】

化合物 222 は、市販のものである。44.48 mL (0.33 mol) の化合物 222 をピリジン (500 mL) 中の塩化トシル (25.39 g, 0.13 mol) で 16 時間処理した。その後、反応物を蒸発させて油状物とし、EtOAc 中に溶解し、水、飽和 NaHCO₃、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄ 上で乾燥させた。酢酸エチルを濃縮乾固させ、カラムクロマトグラフィーによって精製し、EtOAc/ヘキサン (1:1)、続いて、CH₂Cl₂ 中の 10% メタノールで溶出して、無色の油状物として化合物 223 を得た。LCMS 及び NMR は、その構造と一致した。10 g (32.86 mmol) の 1-トシルトリエチレングリコール (化合物 223) を、DMSO (100 mL) 中のアジ化ナトリウム (10.68 g, 164.28 mmol) で、室温で 17 時間処理した。その後、反応混合物を水上に注ぎ、EtOAc で抽出した。有機層を水で 3 回洗浄し、Na₂SO₄ 上で乾燥させた。有機層を濃縮乾固させて、5.3 g の化合物 224 (92%) を得た。LCMS 及び NMR は、その構造と一致した。1-アジドトリエチレングリコール (化合物 224, 5.53 g, 23.69 mmol) 及び化合物 4 (6 g, 18.22 mmol) を、4A モレキュラーシーブ (5 g) 及びジクロロメタン (100 mL) 中の TMSOTf (1.65 mL, 9.11 mmol) で、不活性雰囲気下で処理した。14 時間後、反応物を濾過して前記モレキュラーシーブを除去し、有機層を飽和 NaHCO₃、水、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄ 上で乾燥させた。有機層を濃縮乾固させ、カラムクロマトグラフィーによって精製し、ジクロロメタン中の 2~4% メタノールの勾配で溶出して、化合物 225 を得た。LCMS 及び NMR は、その構造と一致した。化合物 225 (11.9 g, 23.59 mmol) をパールマン触媒上で、EtOAc/メタノール (4:1, 250 mL) 中で水素化した。8 時間後、触媒を濾去し、溶媒を除去乾固して、化合物 226 を得た。LCMS 及び NMR は、その構造と一致した。

20

30

40

【1043】

化合物 227 を生成するために、DMF (100 mL) 中のニトロメタントリスプロピオン酸 (4.17 g, 15.04 mmol) 及びヒューニツヒ塩基 (10.3 mL, 60.17 mmol) の溶液をペンタフルオロトリフルオロアセテート (9.05 mL, 52.65 mmol) で液滴処理した。30 分間後、反応物を氷水上に注ぎ、EtOAc で抽出した。有機層を水、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄ 上で乾燥させた。有機層を濃縮乾固させ、その後、ヘプタンから再結晶化して、白色の固体として化合物 227 を得た。LCMS 及び NMR は、その構造と一致した。化合物 227 (1.5 g, 1.93 mmol)

50

及び化合物 226 (3.7 g、7.74 mmol) をアセトニトリル (15 mL) 中で、室温で 2 時間撹拌した。その後、反応物を蒸発乾固し、カラムクロマトグラフィーによって精製し、ジクロロメタン中の 2 ~ 10 % メタノールの勾配で溶出して、化合物 228 を得た。LCMS 及び NMR は、その構造と一致した。化合物 228 (1.7 g、1.02 mmol) をエタノール (100 mL) 中のラーネーニッケル (約 2 g、湿性) で、水素雰囲気下で処理した。12 時間後、触媒を濾去し、有機層を蒸発させて固体にし、これを次のステップで直接使用した。LCMS 及び NMR は、その構造と一致した。この固体 (0.87 g、0.53 mmol) を DMF (5 mL) 中のベンジルグルタル酸 (0.18 g、0.8 mmol)、HBTU (0.3 g、0.8 mmol)、及び DIEA (273.7 μ L、1.6 mmol) で処理した。16 時間後、DMF を減圧下で 65 $^{\circ}$ C で除去して油状物とし、この油状物をジクロロメタン中に溶解した。有機層を飽和 NaHCO₃、ブラインで洗浄し、Na₂SO₄ 上で乾燥させた。有機層を蒸発させた後、化合物をカラムクロマトグラフィーによって精製し、ジクロロメタン中の 2 ~ 20 % メタノールの勾配で溶出して、カップリング生成物を得た。LCMS 及び NMR は、その構造と一致した。ベンジルエステルをパールマン触媒で、水素雰囲気下で 1 時間脱保護した。その後、この触媒を濾去し、溶媒を除去乾固して、酸を得た。LCMS 及び NMR は、その構造と一致した。酸 (486 mg、0.27 mmol) を乾燥 DMF (3 mL) 中に溶解した。ピリジン (53.61 μ L、0.66 mmol) を添加し、反応物をアルゴンでパージした。ペンタフルオロトリフルオロアセテート (46.39 μ L、0.4 mmol) を反応混合物に緩徐に添加した。反応物の色が淡黄色からワイン色に変化し、少しの煙を発生し、この煙をアルゴン流で吹き飛ばした。反応物を室温で 1 時間撹拌させた (反応の完了を LCMS によって確認した)。この溶媒を減圧下 (回転蒸発) で 70 $^{\circ}$ C で除去した。残渣を DCM で希釈し、1 N NaHSO₄、ブライン、飽和重炭酸ナトリウム、及び再度ブラインで洗浄した。有機物を Na₂SO₄ 上で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させて、黄色の脆い泡状物として 225 mg の化合物 229 を得た。LCMS 及び NMR は、その構造と一致した。

10

20

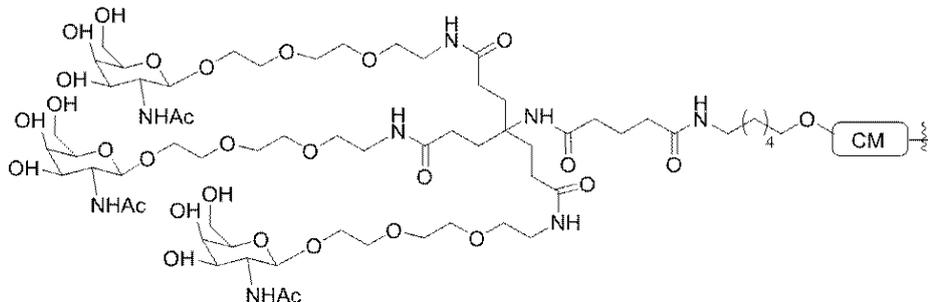
【1044】

実施例 46 に例証される一般的手順を用いて、GalNAc₃-23 共役基を含むオリゴマー化合物 230 を化合物 229 から調製した。GalNAc₃-23 共役基 (GalNAc₃-23a) の GalNAc₃ クラスター部分を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。GalNAc₃-23 (GalNAc₃-23a-CM) の構造は、以下に示される：

30

【1045】

【化 244】



40

実施例 77 : GalNAc₃ 共役体を含む SRB-1 を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

【1046】

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける SRB-1 のアンチセンス阻害について試験した。

【1047】

50

【表 5 3】

表 6 4

SRB-1 を標的とする修飾 ASO

ISIS 番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
66116 1	GalNAc ₃ -3 _{a-o} -A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _d s _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	831
66690 4	GalNAc ₃ -3 _{a-o} -G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	PO	829
67350 2	GalNAc ₃ -10 _{a-o} -A _{do} G _{es} ^m C _{co} T _{co} T _{co} ^m C _{co} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -10a	A _d	831
67784 4	GalNAc ₃ -9 _{a-o} -A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _d s _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -9a	A _d	831
67784 3	GalNAc ₃ -23 _{a-o} -A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₃ -23a	A _d	831
65586 1	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1a	A _d	830
67784 1	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -19 _a	GalNAc ₃ -19a	A _d	830
67784 2	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -20 _a	GalNAc ₃ -20a	A _d	830

10

20

30

【1048】

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例9に示され、GalNAc₃-3_aは、実施例39に示され、GalNAc₃-9_aは、実施例52に示され、GalNAc₃-10_aは、実施例46に示され、GalNAc₃-19_aは、実施例70に示され、GalNAc₃-20_aは、実施例71に示され、GalNAc₃-23_aは、実施例76に示される。

40

処理

【1049】

6~8週齢のC57BL/6マウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)のそれぞれに、表64に列記されるオリゴヌクレオチドまたは生理食塩水を、以下に示される投与量で1回、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBOGR

50

EEN (登録商標) RNA定量化試薬 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを決定した。以下の結果は、生理食塩水 (対照) に対して標準化された各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。

【1050】

表65に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させた。

【1051】

【表54】

表65
SRB-1 mRNA (%生理食塩水)

ISIS番号	投与量(mg/kg)	SRB-1 mRNA(%生理食塩水)	GalNAc ₃ クラスター	CM
生理食塩水	該当なし	100.0	該当なし	該当なし
661161	0.5	89.18	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	77.02		
	5	29.10		
	15	12.64		
666904	0.5	93.11	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	55.85		
	5	21.29		
	15	13.43		
673502	0.5	77.75	GalNAc ₃ -10a	A _d
	1.5	41.05		
	5	19.27		
	15	14.41		
677844	0.5	87.65	GalNAc ₃ -9a	A _d
	1.5	93.04		
	5	40.77		
	15	16.95		
677843	0.5	102.28	GalNAc ₃ -23a	A _d
	1.5	70.51		
	5	30.68		
	15	13.26		
655861	0.5	79.72	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1.5	55.48		
	5	26.99		
	15	17.58		
677841	0.5	67.43	GalNAc ₃ -19a	A _d
	1.5	45.13		
	5	27.02		
	15	12.41		
677842	0.5	64.13	GalNAc ₃ -20a	A _d
	1.5	53.56		
	5	20.47		
	15	10.23		

【1052】

10

20

30

40

50

標準のプロトコルを用いて、血清中の肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）も測定した。総ビリルビン及びBUNも評価した。体重の変化を評価したが、生理食塩水群との有意な変化は見られなかった（データ示されず）。ALT、AST、総ビリルビン、及びBUN値が、以下の表66に示される。

【1053】

【表55】

表66

ISIS番号	投与量 (mg/kg)	ALT(U /L)	AST(U /L)	総ビリル ビン (mg/dL)	BUN(mg /dL)	GalNAc ₃ ク ラスター	CM
生理食塩 水	該当な し	21	45	0.13	34	該当なし	該 当 なし
661161	0.5	28	51	0.14	39	GalNAc ₃ -3a	A _d
	1.5	23	42	0.13	39		
	5	22	59	0.13	37		
	15	21	56	0.15	35		
666904	0.5	24	56	0.14	37	GalNAc ₃ -3a	PO
	1.5	26	68	0.15	35		
	5	23	77	0.14	34		
	15	24	60	0.13	35		
673502	0.5	24	59	0.16	34	GalNAc ₃ -10a	A _d
	1.5	20	46	0.17	32		
	5	24	45	0.12	31		
	15	24	47	0.13	34		
677844	0.5	25	61	0.14	37	GalNAc ₃ -9a	A _d
	1.5	23	64	0.17	33		
	5	25	58	0.13	35		
	15	22	65	0.14	34		
677843	0.5	53	53	0.13	35	GalNAc ₃ -23a	A _d
	1.5	25	54	0.13	34		
	5	21	60	0.15	34		
	15	22	43	0.12	38		
655861	0.5	21	48	0.15	33	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1.5	28	54	0.12	35		
	5	22	60	0.13	36		
	15	21	55	0.17	30		
677841	0.5	32	54	0.13	34	GalNAc ₃ -19a	A _d
	1.5	24	56	0.14	34		
	5	23	92	0.18	31		
	15	24	58	0.15	31		
677842	0.5	23	61	0.15	35	GalNAc ₃ -20a	A _d
	1.5	24	57	0.14	34		
	5	41	62	0.15	35		
	15	24	37	0.14	32		

実施例78：GalNAc₃共役体を含むアンギオテンシノーゲンを標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

【1054】

10

20

30

40

50

以下に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験において正常血圧の Sprague Dawley ラットにおけるアンギオテンシノーゲン (AGT) のアンチセンス阻害について試験した。

【1055】

【表56】

表67

AGTを標的とする修飾ASO

ISIS 番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
552668	^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds^mC_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds} _{ds}A_{cs}G_{cs}G_{cs}A_{cs}T_c}	該当なし	該当なし	835
669509	^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds^mC_{ds}^mC_{ds}^mC_{ds} _{ds}A_{cs}G_{cs}G_{cs}A_{cs}T_{co}A_{do}'-GalNAc₃-1_a}	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	836

10

【1056】

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例9に示した。

処理

【1057】

6週齢の雄 Sprague Dawley ラットのそれぞれに、表67に列記されるオリゴヌクレオチドまたはPBSを、以下に示される投与量で週1回、合計3回の投与で、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にラットを殺した。リアルタイムPCR及びRIBOGREEN(登録商標)RNA定量化試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、肝臓におけるAGT mRNAレベルを決定した。全アンギオテンシノーゲンELISA(カタログ番号JP27412、IBL International, Toronto, ON)を用いて、1:20,000で希釈したAGT血漿タンパク質レベルを測定した。以下の結果は、PBS対照に対して標準化された各処理群の肝臓におけるAGT mRNAレベルまたは血漿におけるAGTタンパク質レベルの平均パーセントとして提示される。

20

【1058】

表68に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で肝臓におけるAGT mRNA及び血漿タンパク質レベルを低下させ、GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドは、GalNAc共役体を欠く親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であった。

30

【1059】

40

50

【表 5 7】

表 6 8

肝臓における AGT mRNA 及び血漿タンパク質レベル

ISIS 番号	投与量(mg/kg)	肝臓における AGT mRNA(%PBS)	AGT 血漿タンパク質(%PBS)	GalNAc ₃ クラスタ	CM
PBS	該当なし	100	100	該当なし	該当なし
552668	3	95	122	該当なし	該当なし
	10	85	97		
	30	46	79		
	90	8	11		
669509	0.3	95	70	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1	95	129		
	3	62	97		
	10	9	23		

10

【1060】

標準のプロトコルを用いて、殺時に血漿中の肝臓トランスアミナーゼレベル、すなわちアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、ならびに体重も測定した。結果が以下の表 6 9 に示される。

20

【1061】

【表 5 8】

表 6 9

肝臓トランスアミナーゼレベル及びラット体重

ISIS番号	投与量 (mg/kg)	ALT(U/L)	AST(U/L)	体重(%ベースライン)	GalNAc ₃ クラスタ	CM
PBS	該当なし	51	81	186	該当なし	該当なし
552668	3	54	93	183	該当なし	該当なし
	10	51	93	194		
	30	59	99	182		
	90	56	78	170		
669509	0.3	53	90	190	GalNAc ₃ -1a	A _d
	1	51	93	192		
	3	48	85	189		
	10	56	95	189		

30

40

実施例 7 9 : GalNAc₃ 共役体を含む APOC - III を標的とするオリゴヌクレオチドの生体内における作用持続時間

【1062】

以下の表 7 0 に列記されるオリゴヌクレオチドを、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。

【1063】

50

【表 5 9】

表 7 0

APOC-III を標的とする修飾 ASO

ISIS 番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	該当なし	該当なし	821
647535	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1a	A _d	822
663083	GalNAc ₃ -3 _{a-o} ·A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	837
674449	GalNAc ₃ -7 _{a-o} ·A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -7a	A _d	837
674450	GalNAc ₃ -10 _{a-o} ·A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -10a	A _d	837
674451	GalNAc ₃ -13 _{a-o} ·A _{do} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -13a	A _d	837

10

20

【1064】

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例9に示され、GalNAc₃-3_aは、実施例39に示され、GalNAc₃-7_aは、実施例48に示され、GalNAc₃-10_aは、実施例46に示され、GalNAc₃-13_aは、実施例62に示される。

処理

【1065】

ヒトAPOC-IIIを発現する6~8週齢のトランスジェニックマウスのそれぞれに、表70に列記されるオリゴヌクレオチドまたはPBSを1回皮下注入した。各処理群は、3匹の動物からなった。投薬前に血液を採取して、ベースライン、ならびに投与後72時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、及び6週間時点のレベルを決定した。実施例20に記載されるように、血漿トリグリセリド及びAPOC-IIIタンパク質レベルを測定した。以下の結果は、ベースラインレベルに対して標準化された各処理群の血漿トリグリセリド及びAPOC-IIIレベルの平均パーセントとして提示され、親オリゴヌクレオチドの投与量がGalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドの投与量の3倍であったにもかかわらず、GalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドが共役基を有しない親オリゴヌクレオチド(ISIS 304801)よりも長い作用持続時間を示したことを示す。

30

【1066】

40

50

【表 60 - 1】

表 7 1

トランスジェニックマウスにおける血漿トリグリセリド及びAPOC-IIIタンパク質レベル

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	時点(投与後の日数)	トリグリセリド(%ベースライン)	APOC-III タンパク質(%ベースライン)	GalNAc ₃ クラスタ	CM
PBS	該当なし	3	97	102	該当なし	該当なし
		7	101	98		
		14	108	98		
		21	107	107		
		28	94	91		
		35	88	90		
		42	91	105		
304801	30	3	40	34	該当なし	該当なし
		7	41	37		
		14	50	57		
		21	50	50		
		28	57	73		
		35	68	70		
		42	75	93		
647535	10	3	36	37	GalNAc ₃ -1a	A _d
		7	39	47		
		14	40	45		
		21	41	41		
		28	42	62		
		35	69	69		
		42	85	102		
663083	10	3	24	18	GalNAc ₃ -3a	A _d
		7	28	23		
		14	25	27		
		21	28	28		
		28	37	44		
		35	55	57		
		42	60	78		

10

20

30

40

【 1 0 6 7 】

50

【表 6 0 - 2】

674449	10	3	29	26	GalNAc ₃ -7a	A _d
		7	32	31		
		14	38	41		
		21	44	44		
		28	53	63		
		35	69	77		
		42	78	99		
674450	10	3	33	30	GalNAc ₃ -10a	A _d
		7	35	34		
		14	31	34		
		21	44	44		
		28	56	61		
		35	68	70		
		42	83	95		
674451	10	3	35	33	GalNAc ₃ -13a	A _d
		7	24	32		
		14	40	34		
		21	48	48		
		28	54	67		
		35	65	75		
		42	74	97		

10

20

実施例 80 : GalNAc₃ 共役体を含む - 1 抗トリプシン (A1AT) を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

【1068】

以下の表 7 2 に列記されるオリゴヌクレオチドを、マウスにおける A1AT の用量依存的阻害試験において試験した。

30

【1069】

40

50

【表 6 1】

表 7 2

A1ATを標的とする修飾ASO

ISIS 番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
476366	A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _c	該当なし	該当なし	838
656326	A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _{co} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1a	A _d	839
678381	GalNAc ₃ -3 _a -o'-A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _c	GalNAc ₃ -3a	A _d	840
678382	GalNAc ₃ -7 _a -o'-A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _c	GalNAc ₃ -7a	A _d	840
678383	GalNAc ₃ -10 _a -o'-A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _c	GalNAc ₃ -10a	A _d	840
678384	GalNAc ₃ -13 _a -o'-A _{do} A _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{es} A _{es} G _{es} G _{es} A _c	GalNAc ₃ -13a	A _d	840

10

20

【1070】

GalNAc₃-1aの構造は、先の実施例9に示され、GalNAc₃-3aは、実施例39に示され、GalNAc₃-7aは、実施例48に示され、GalNAc₃-10aは、実施例46に示され、GalNAc₃-13aは、実施例62に示される。

処理

【1071】

6週齢の雄C57BL/6マウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)のそれぞれに、表72に列記されるオリゴヌクレオチドまたはPBSを、以下に示される投与量で週1回、合計3回の投与で、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺した。リアルタイムPCR及びRIBOGREEN(登録商標)RNA定量化試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、肝臓におけるA1AT mRNAレベルを決定した。マウス1-抗トリプシンELISA(カタログ番号41-A1AMS-E01、Alpco, Salem, NH)を用いて、A1AT血漿タンパク質レベルを決定した。以下の結果は、PBS対照に対して標準化された各処理群の肝臓におけるA1AT mRNA及び血漿タンパク質レベルの平均パーセントとして提示される。

30

【1072】

表73に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で肝臓におけるA1AT mRNA及びA1AT血漿タンパク質レベルを低下させた。GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドは、親(ISIS 476366)よりも著しく強力であった。

40

【1073】

50

【表 6 2】

表 7 3

肝臓における A 1 A T mRNA 及び血漿タンパク質レベル

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	肝臓における A1AT mRNA(%PBS)	A1AT 血漿タンパク質 (%PBS)	GalNAc ₃ クラスタ	CM
PBS	該当なし	100	100	該当なし	該当なし
476366	5	86	78	該当なし	該当なし
	15	73	61		
	45	30	38		
656326	0.6	99	90	GalNAc ₃ -1a	A _d
	2	61	70		
	6	15	30		
	18	6	10		
678381	0.6	105	90	GalNAc ₃ -3a	A _d
	2	53	60		
	6	16	20		
	18	7	13		
678382	0.6	90	79	GalNAc ₃ -7a	A _d
	2	49	57		
	6	21	27		
	18	8	11		
678383	0.6	94	84	GalNAc ₃ -10a	A _d
	2	44	53		
	6	13	24		
	18	6	10		
678384	0.6	106	91	GalNAc ₃ -13a	A _d
	2	65	59		
	6	26	31		
	18	11	15		

10

20

30

【1074】

標準のプロトコルを用いて、殺時に血漿中の肝臓トランスアミナーゼ及び BUN レベルを測定した。体重及び臓器重量も測定した。結果が以下の表 7 4 に示される。体重は、ベースラインと比較した%として示される。臓器重量は、PBS 対照群と比較した体重の%として示される。

40

【1075】

50

【表 6 3】

表 7 4

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	体重 (% ベースライン)	肝臓重量 (体重の相対%)	腎臓重量 (体重の相対%)	脾臓重量 (体重の相対%)
PBS	該当なし	25	51	37	119	100	100	100
476366	5	34	68	35	116	91	98	106
	15	37	74	30	122	92	101	128
	45	30	47	31	118	99	108	123
656326	0.6	29	57	40	123	100	103	119
	2	36	75	39	114	98	111	106
	6	32	67	39	125	99	97	122
	18	46	77	36	116	102	109	101
678381	0.6	26	57	32	117	93	109	110
	2	26	52	33	121	96	106	125
	6	40	78	32	124	92	106	126
	18	31	54	28	118	94	103	120
678382	0.6	26	42	35	114	100	103	103
	2	25	50	31	117	91	104	117
	6	30	79	29	117	89	102	107
	18	65	112	31	120	89	104	113
678383	0.6	30	67	38	121	91	100	123
	2	33	53	33	118	98	102	121
	6	32	63	32	117	97	105	105
	18	36	68	31	118	99	103	108
678384	0.6	36	63	31	118	98	103	98
	2	32	61	32	119	93	102	114
	6	34	69	34	122	100	100	96
	18	28	54	30	117	98	101	104

10

20

30

実施例 8 1 : 生体内における GalNAc₃ クラスターを含む A1AT を標的とするオリゴヌクレオチドの作用持続時間

【1076】

表 7 2 に列記されるオリゴヌクレオチドを、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。

処理

【1077】

6 週齢の雄 C57BL/6 マウスのそれぞれに、表 7 2 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは PBS を 1 回皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。投薬の前日に血液を採取して、ベースライン、ならびに投与後 5、12、19、及び 25 日時点のレベルを決定した。ELISA を用いて血漿 A1AT タンパク質レベルを測定した (実施例 8 0 を参照のこと)。以下の結果は、ベースラインレベルに対して標準化された各処理群の血漿 A1AT タンパク質レベルの平均パーセントとして提示される。結果は、GalNAc

40

50

共役体を含むオリゴヌクレオチドがGalNAc共役体を欠く親(ISIS 476366)よりも強力であり、かつより長い作用持続時間を有したことを示す。さらに、5'-GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチド(ISIS 678381、678382、678383、及び678384)は、概して、3'-GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチド(ISIS 656326)よりもさらに強力であり、さらに長い作用持続時間を有した。

【1078】

【表64】

表75

マウスにおける血漿A1ATタンパク質レベル

ISIS番号	投与量 (mg/kg)	時点(投与後の日数)	A1AT(% ベースライン)	GalNAc ₃ クラスター	CM
PBS	該当なし	5	93	該当なし	該当なし
		12	93		
		19	90		
		25	97		
476366	100	5	38	該当なし	該当なし
		12	46		
		19	62		
		25	77		
656326	18	5	33	GalNAc ₃ -1a	A _d
		12	36		
		19	51		
		25	72		
678381	18	5	21	GalNAc ₃ -3a	A _d
		12	21		
		19	35		
		25	48		
678382	18	5	21	GalNAc ₃ -7a	A _d
		12	21		
		19	39		
		25	60		
678383	18	5	24	GalNAc ₃ -10a	A _d
		12	21		
		19	45		
		25	73		
678384	18	5	29	GalNAc ₃ -13a	A _d
		12	34		
		19	57		
		25	76		

実施例82: GalNAc₃共役体を含むSRB-1を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体外におけるアンチセンス阻害

【1079】

処理の2時間前に、初代マウス肝細胞を15,000細胞/ウェルで96ウェルプレート

10

20

30

40

50

に播種した。表76に列記されるオリゴヌクレオチドをウィリアムE培地に2、10、50、または250nMで添加し、細胞を37℃、5%CO₂で一晩インキュベートした。オリゴヌクレオチド添加の16時間後に細胞を溶解し、RNeasy 3000 BioRobot (Qiagen)を用いて全RNAを精製した。リアルタイムPCR及びRIBOGREEN (登録商標) RNA定量化試薬 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、SRB-1 mRNAレベルを標準のプロトコルに従って決定した。Prism 4ソフトウェア (GraphPad)を用いて、IC₅₀値を決定した。結果は、さまざまな異なるGalNAc共役基及びさまざまな異なる切断可能部分を含むオリゴヌクレオチドが、生体外自由取り込み実験において、GalNAc共役基を欠く親オリゴヌクレオチド (ISIS 353382及び666841) よりも著しく強力であることを示す。

【1080】

10

20

30

40

50

【表 6 5 - 1】

表 7 6
生体外におけるSRB-1発現の阻害

ISIS 番号	配列(5'から3')	結合	GalNAc クラスタ	CM	IC ₅₀ (nM)	配列番号
353382	G ^m _{cs} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	該当なし	該当なし	250	829
655861	G ^m _{cs} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{eo} A ^m _{do} -GalNAc _{3-1a}	PS	GalNAc _{3-1a}	A _d	40	830
661161	GalNAc _{3-3a-o} A ^m _{do} G ^m _{cs} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNAc _{3-3a}	A _d	40	831
661162	GalNAc _{3-3a-o} A ^m _{do} G ^m _{cs} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{eo} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{eo} C ^m _{eo} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PO/PS	GalNAc _{3-3a}	A _d	8	831
664078	G ^m _{cs} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{eo} A ^m _{do} -GalNAc _{3-9a}	PS	GalNAc _{3-9a}	A _d	20	830
665001	GalNAc _{3-8a-o} A ^m _{do} G ^m _{cs} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNAc _{3-8a}	A _d	70	831
666224	GalNAc _{3-5a-o} A ^m _{do} G ^m _{cs} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _{es} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{es} C ^m _{es} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PS	GalNAc _{3-5a}	A _d	80	831
666841	G ^m _{cs} C ^m _{eo} T ^m _{eo} T ^m _{eo} C ^m _{es} A ^m _{ds} G ^m _{ds} T ^m _{ds} C ^m _{ds} A ^m _{ds} T ^m _{ds} G ^m _{ds} A ^m _{ds} C ^m _{ds} T ^m _{ds} T ^m _{eo} C ^m _{eo} C ^m _{es} T ^m _{es} T ^m _e	PO/PS	該当なし	該当なし	>250	829

10

20

30

40

【 1 0 8 1 】

50

【表 6 5 - 2】

666881	GalNAC ₃ -10 _a -o·A _{do} G ^m _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS	GalNAC ₃ -10 _a	A _d	30	831
666904	GalNAC ₃ -3 _a -o·G ^m _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS	GalNAC ₃ -3 _a	PO	9	829
666924	GalNAC ₃ -3 _a -o·T _{do} G ^m _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS	GalNAC ₃ -3 _a	T _d	15	834
666961	GalNAC ₃ -6 _a -o·A _{do} G ^m _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS	GalNAC ₃ -6 _a	A _d	150	831
666981	GalNAC ₃ -7 _a -o·A _{do} G ^m _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS	GalNAC ₃ -7 _a	A _d	20	831
670061	GalNAC ₃ -13 _a -o·A _{do} G ^m _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS	GalNAC ₃ -13 _a	A _d	30	831
670699	GalNAC ₃ -3 _a -o·T _{do} G ^m _{es} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	PO/PS	GalNAC ₃ -3 _a	T _d	15	834
670700	GalNAC ₃ -3 _a -o·A _{eo} G ^m _{es} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	PO/PS	GalNAC ₃ -3 _a	A _e	30	831

10

20

30

40

【 1 0 8 2 】

【表 6 5 - 3】

670701	GalNAC ₃ -3 _a -o'-T _{eo} G _{es} ^m C _{co} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds}	PO/PS	GalNAC ₃ -3 _a	T _e	25	834
671144	GalNAC ₃ -12 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds}	PS	GalNAC ₃ -12 _a	A _d	40	831
671165	GalNAC ₃ -13 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{co} T _{co} T _{co} ^m C _{co} A _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds}	PO/PS	GalNAC ₃ -13 _a	A _d	8	831
671261	GalNAC ₃ -14 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds}	PS	GalNAC ₃ -14 _a	A _d	>250	831
671262	GalNAC ₃ -15 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds}	PS	GalNAC ₃ -15 _a	A _d	>250	831
673501	GalNAC ₃ -7 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	PO/PS	GalNAC ₃ -7 _a	A _d	30	831
673502	GalNAC ₃ -10 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{co} T _{co} T _{co} ^m C _{co} A _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds}	PO/PS	GalNAC ₃ -10 _a	A _d	8	831

10

20

30

40

【 1 0 8 3】

【表 6 5 - 4】

675441	GalNAc ₃ -17 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS	GalNAc ₃ -17 _a	A _d	30	831
675442	GalNAc ₃ -18 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS	GalNAc ₃ -18 _a	A _d	20	831
677841	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -19 _a	PS	GalNAc ₃ -19 _a	A _d	40	830
677842	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -20 _a	PS	GalNAc ₃ -20 _a	A _d	30	830
677843	GalNAc ₃ -23 _a -o'-A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	PS	GalNAc ₃ -23 _a	A _d	40	831

10

20

【 1 0 8 4 】

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例9に示され、GalNAc₃-3_aは、実施例39に示され、GalNAc₃-5_aは、実施例49に示され、GalNAc₃-6_aは、実施例51に示され、GalNAc₃-7_aは、実施例48に示され、GalNAc₃-8_aは、実施例47に示され、GalNAc₃-9_aは、実施例52に示され、GalNAc₃-10_aは、実施例46に示され、GalNAc₃-12_aは、実施例61に示され、GalNAc₃-13_aは、実施例62に示され、GalNAc₃-14_aは、実施例63に示され、GalNAc₃-15_aは、実施例64に示され、GalNAc₃-17_aは、実施例68に示され、GalNAc₃-18_aは、実施例69に示され、GalNAc₃-19_aは、実施例70に示され、GalNAc₃-20_aは、実施例71に示され、GalNAc₃-23_aは、実施例76に示される。

30

実施例83：GalNAc₃クラスターを含む、第XI因子を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

40

【 1 0 8 5 】

以下の表77に列記されるオリゴヌクレオチドを、マウスにおける第XI因子の用量依存的阻害試験において試験した。

【 1 0 8 6 】

50

【表 6 6】

表 7 7

第 X I 因子を標的とする修飾オリゴヌクレオチド

ISIS 番号	配列(5'から3')	GalNAc クラスタ	CM	配列番号
40407 1	T _{es} G _{es} G _{es} T _{es} A _{es} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{es} G _{es} A _{es} G _{es} G _e	該当なし	該当なし	833
65617 3	T _{es} G _{co} G _{co} T _{co} A _{co} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{co} G _{co} A _{es} G _{es} G _{co} A _{do} -GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	841
66308 6	GalNAc ₃ -3 _a -o'-A _{do} T _{es} G _{co} G _{co} T _{co} A _{co} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{co} G _{co} A _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -3 _a	A _d	841
67834 7	GalNAc ₃ -7 _a -o'-A _{do} T _{es} G _{co} G _{co} T _{co} A _{co} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{co} G _{co} A _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -7 _a	A _d	841
67834 8	GalNAc ₃ -10 _a -o'-A _{do} T _{es} G _{co} G _{co} T _{co} A _{co} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{co} G _{co} A _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -10 _a	A _d	841
67834 9	GalNAc ₃ -13 _a -o'-A _{do} T _{es} G _{co} G _{co} T _{co} A _{co} A _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{co} G _{co} A _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -13 _a	A _d	841

10

20

【 1 0 8 7 】

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例 9 に示され、GalNAc₃-3_aは、実施例 3 9 に示され、GalNAc₃-7_aは、実施例 4 8 に示され、GalNAc₃-10_aは、実施例 4 6 に示され、GalNAc₃-13_aは、実施例 6 2 に示される。

処理

【 1 0 8 8 】

6 ~ 8 週齢のマウスのそれぞれに、以下に列記されるオリゴヌクレオチドまたは P B S を、以下に示される投与量で週 1 回、合計 3 回の投与で、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 7 2 時間後にマウスを 殺した。リアルタイム P C R を用いて肝臓における第 X I 因子 m R N A レベルを測定し、標準のプロトコルに従ってシクロフィリンに対して標準化した。肝臓トランスアミナーゼ、B U N、及びビリルビンも測定した。以下の結果は、P B S 対照に対して標準化された各処理群の平均パーセントとして提示される。

30

【 1 0 8 9 】

表 7 8 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存の様式で肝臓における第 X I 因子 m R N A を低下させた。結果は、GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドが、GalNAc 共役体を欠く親 (I S I S 4 0 4 0 7 1) よりも強力であったことを示す。さらに、5' - GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチド (I S I S 6 6 3 0 8 6、6 7 8 3 4 7、6 7 8 3 4 8、及び 6 7 8 3 4 9) は、3' - GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチド (I S I S 6 5 6 1 7 3) よりもさらに強力であった。

40

【 1 0 9 0 】

50

【表 6 7】

表 7 8

肝臓における第 X I 因子 mRNA、肝臓トランスアミナーゼ、BUN、及びビリルビンレベル

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	第 XI 因子 mRNA(%PBS)	ALT(U/L)	AST(U/L)	BUN(mg/dL)	ビリルビン (mg/dL)	GalNAc ₃ クラスタ	配列番号
PBS	該当なし	100	63	70	21	0.18	該当なし	該当なし
4040 71	3	65	41	58	21	0.15	該当なし	832
	10	33	49	53	23	0.15		
	30	17	43	57	22	0.14		
6561 73	0.7	43	90	89	21	0.16	GalNAc ₃ -1a	833
	2	9	36	58	26	0.17		
	6	3	50	63	25	0.15		
6630 86	0.7	33	91	169	25	0.16	GalNAc ₃ -3a	841
	2	7	38	55	21	0.16		
	6	1	34	40	23	0.14		
6783 47	0.7	35	28	49	20	0.14	GalNAc ₃ -7a	841
	2	10	180	149	21	0.18		
	6	1	44	76	19	0.15		
6783 48	0.7	39	43	54	21	0.16	GalNAc ₃ -10a	841
	2	5	38	55	22	0.17		
	6	2	25	38	20	0.14		
6783 49	0.7	34	39	46	20	0.16	GalNAc ₃ -13a	841
	2	8	43	63	21	0.14		
	6	2	28	41	20	0.14		

10

20

30

実施例 8 4 : GalNAc₃ 共役体を含む第 X I 因子を標的とするオリゴヌクレオチドの生体内における作用持続時間

【 1 0 9 1】

表 7 7 に列記されるオリゴヌクレオチドを、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。

処理

【 1 0 9 2】

6 ~ 8 週齢のマウスのそれぞれに、表 7 7 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは P B S を 1 回皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。投薬の前日に尾採血によって血液を採取して、ベースライン、ならびに投与後 3、10、及び 17 日間時点のレベルを決定した。R & D Systems (Minneapolis, MN) の第 X I 因子捕捉及びビオチン化検出抗体 (それぞれ、カタログ番号 A F 2 4 6 0 及び B A F 2 4 6 0)、ならびに O p t E I A 試薬セット B (カタログ番号 5 5 0 5 3 4、B D B i o s c i e n c e s, S a n J o s e, C A) を用いて、第 X I 因子血漿タンパク質レベルを E L I S A によって測定した。以下の結果は、ベースラインレベルに対して標準化された各処理群の第 X I 因子血漿タンパク質レベルの平均パーセントとして提示される。結果は、GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドが、GalNAc 共役体を欠く親 (I S I S 4 0 4 0 7 1) よりも強力であり、より長い作用持続時間を有したことを示す。さら

40

50

に、5'-GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチド(ISIS 663086、678347、678348、及び678349)は、3'-GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチド(ISIS 656173)よりもさらに強力であり、さらに長い作用持続時間を有した。

【1093】

【表68】

表79

マウスにおける第XI因子血漿タンパク質レベル

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	時点(投与後の日数)	第XI因子(%ベースライン)	GalNAc ₃ クラスター	CM	配列番号
PBS	該当なし	3	123	該当なし	該当なし	該当なし
		10	56			
		17	100			
404071	30	3	11	該当なし	該当なし	832
		10	47			
		17	52			
656173	6	3	1	GalNAc ₃ -1a	A _d	833
		10	3			
		17	21			
663086	6	3	1	GalNAc ₃ -3a	A _d	841
		10	2			
		17	9			
678347	6	3	1	GalNAc ₃ -7a	A _d	841
		10	1			
		17	8			
678348	6	3	1	GalNAc ₃ -10a	A _d	841
		10	1			
		17	6			
678349	6	3	1	GalNAc ₃ -13a	A _d	841
		10	1			
		17	5			

実施例85: GalNAc₃共役体を含む、SRB-1を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

【1094】

表76に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおけるSRB-1のアンチセンス阻害について試験した。

処理

【1095】

6~8週齢のC57BL/6マウスのそれぞれに、表76に列記されるオリゴヌクレオチドまたは生理食塩水を、以下に示される投与量で週1回、合計3回の投与で、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の48時間後にマウスを殺して、リアルタイムPCR及びRIBOGREEN(登録商標)RNA定量化試薬(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)を用いて、SRB-1 mRNAレベルを決定した。以下の結果は、生理食塩水(対照)に対して標準化された各処理群の肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。

【 1 0 9 6 】

表 8 0 及び 8 1 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で SRB - 1 mRNA レベルを低下させた。

【 1 0 9 7 】

【表 6 9 】

表 8 0

肝臓における SRB - 1 mRNA

ISIS番号	投与量(mg/kg)	SRB-1 mRNA(%生理食塩水)	GalNAc ₃ クラスター	CM
生理食塩水	該当なし	100	該当なし	該当なし
655861	0.1	94	GalNAc ₃ -1a	A _d
	0.3	119		
	1	68		
	3	32		
661161	0.1	120	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0.3	107		
	1	68		
	3	26		
666881	0.1	107	GalNAc ₃ -10a	A _d
	0.3	107		
	1	69		
	3	27		
666981	0.1	120	GalNAc ₃ -7a	A _d
	0.3	103		
	1	54		
	3	21		
670061	0.1	118	GalNAc ₃ -13a	A _d
	0.3	89		
	1	52		
	3	18		
677842	0.1	119	GalNAc ₃ -20a	A _d
	0.3	96		
	1	65		
	3	23		

【 1 0 9 8 】

10

20

30

40

50

【表 7 0】

表 8 1

肝臓におけるSRB-1 mRNA

ISIS番号	投与量(mg/kg)	SRB-1 mRNA(%生理食塩水)	GalNAc ₃ クラスター	CM
661161	0.1	107	GalNAc ₃ -3a	A _d
	0.3	95		
	1	53		
	3	18		
677841	0.1	110	GalNAc ₃ -19a	A _d
	0.3	88		
	1	52		
	3	25		

10

【1099】

標準のプロトコルを用いて、肝臓トランスアミナーゼレベル、総ビリルビン、BUN、及び体重も測定した。各処理群の平均値が以下の表 8 2 に示される。

20

【1100】

30

40

50

【表 7 1】

表 8 2

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ビリルビン (mg/dL)	BUN (mg/dL)	体重 (%ベースライン)	GalNAc ₃ クラスタ	CM
生理食塩水	該当なし	19	39	0.17	26	118	該当なし	該当なし
655861	0.1	25	47	0.17	27	114	GalNAc ₃ -1 a	A _d
	0.3	29	56	0.15	27	118		
	1	20	32	0.14	24	112		
	3	27	54	0.14	24	115		
661161	0.1	35	83	0.13	24	113	GalNAc ₃ -3 a	A _d
	0.3	42	61	0.15	23	117		
	1	34	60	0.18	22	116		
	3	29	52	0.13	25	117		
666881	0.1	30	51	0.15	23	118	GalNAc ₃ -1 0a	A _d
	0.3	49	82	0.16	25	119		
	1	23	45	0.14	24	117		
	3	20	38	0.15	21	112		
666981	0.1	21	41	0.14	22	113	GalNAc ₃ -7 a	A _d
	0.3	29	49	0.16	24	112		
	1	19	34	0.15	22	111		
	3	77	78	0.18	25	115		
670061	0.1	20	63	0.18	24	111	GalNAc ₃ -1 3a	A _d
	0.3	20	57	0.15	21	115		
	1	20	35	0.14	20	115		
	3	27	42	0.12	20	116		
677842	0.1	20	38	0.17	24	114	GalNAc ₃ -2 0a	A _d
	0.3	31	46	0.17	21	117		
	1	22	34	0.15	21	119		
	3	41	57	0.14	23	118		

10

20

30

実施例 8 6 : GalNAc₃ クラスタを含む、TTR を標的とするオリゴヌクレオチドの生体内におけるアンチセンス阻害

【 1 1 0 1 】

以下の表 8 3 に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてヒト TTR 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスにおけるヒトトランスサイレチン (TTR) のアンチセンス阻害について試験した。

処理

【 1 1 0 2 】

8 週齢の TTR トランスジェニックマウスのそれぞれに、以下の表に列記されるオリゴヌクレオチド及び投与量または PBS を、週 1 回 3 週間、合計 3 回の投与で、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。最終投与の 7 2 時間後にマウスを殺した。この実験を通してさまざまな時点で尾採血を実行し、血漿 TTR タンパク質、ALT、及び AST レベルを測定し、表 8 5 ~ 8 7 に報告した。動物を殺した後、血漿 ALT、AST

40

50

、及びヒトTTRレベルを測定し、体重、臓器重量、及び肝臓におけるヒトTTR mRNAレベルも測定した。臨床分析器（AU480、Beckman Coulter, CA）を用いて、TTRタンパク質レベルを測定した。標準のプロトコルに従ってリアルタイムPCR及びRIBOGREEN（登録商標）RNA定量化試薬（Molecular Probes, Inc. Eugene, OR）を用いて、肝臓におけるヒトTTR mRNAレベルを決定した。表84～87に提示される結果は、各処理群の平均値である。mRNAレベルは、PBS群の平均と比較した平均値である。血漿タンパク質レベルは、ベースラインでのPBS群の平均値と比較した平均値である。体重は、個々の処理群それぞれを殺するまでのベースラインからの平均体重変化率である。示される臓器重量は、動物の体重に対して標準化されており、各処理群の平均標準化臓器重量は、PBS群の平均標準化臓器重量との比較で提示される。

10

【1103】

表84～87において、「BL」は、第1の投与の直前に測定したベースラインを示す。表84及び85に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式でTTR発現レベルを低下させた。GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドは、GalNAc共役体を欠く親（ISIS 420915）よりも強力であった。さらに、GalNAc共役体及び混成PS/POヌクレオシド間連結部を含むオリゴヌクレオチドは、GalNAc共役体及び完全PS連結部を含むオリゴヌクレオチドよりもさらに強力であった。

20

【1104】

【表72】

表83

ヒトTTRを標的とするオリゴヌクレオチド

ISIS番号	配列5'から3'	結合	GalNAc クラスタ	CM	配列番号
420915	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _d _s A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS	該当なし	該当なし	842
660261	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _d _s A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	PS	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	843
682883	GalNAc ₃ -3 _{a-o} 'T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -3 _a	PO	842
682884	GalNAc ₃ -7 _{a-o} 'T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -7 _a	PO	842
682885	GalNAc ₃ -10 _{a-o} 'T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _d _s A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -10 _a	PO	842
682886	GalNAc ₃ -13 _{a-o} 'T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _d _s A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -13 _a	PO	842
684057	T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -19 _a	PS/PO	GalNAc ₃ -19 _a	A _d	843

30

40

【1105】

表85の説明文を実施例74で見つけることができる。GalNAc₃-1の構造は、実施例9に示される。GalNAc₃-3_aの構造は、実施例39に示される。GalNAc₃-7_aの構造は、実施例48に示される。GalNAc₃-10_aの構造は、実施例46に示される。GalNAc₃-13_aの構造は、実施例62に示される。GalNAc₃-19_aの構造は、実施例70に示される。

【1106】

50

【表 7 3】

表 8 4

生体内におけるヒトTTRのアンチセンス阻害

ISIS番号	投与量(mg/kg)	TTR mRNA(%PBS)	血漿TTRタンパク質(%PBS)	GalNAcクラスター	CM	配列番号
PBS	該当なし	100	100	該当なし	該当なし	
420915	6	99	95	該当なし	該当なし	842
	20	48	65			
	60	18	28			
660261	0.6	113	87	GalNAc ₃ -1a	A _d	843
	2	40	56			
	6	20	27			
	20	9	11			

10

【 1 1 0 7 】

20

30

40

50

【表 7 4】

表 8 5

生体内におけるヒトTTRのアンチセンス阻害

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	TTR mRNA(%PBS)	血漿TTRタンパク質(BLでの%PBS)				GalNAcクラスタ	CM	配列番号
			BL	3日目	10日目	17日目(屠殺後)			
PBS	該当なし	100	100	96	90	114	該当なし	該当なし	
420915	6	74	106	86	76	83	該当なし	該当なし	842
	20	43	102	66	61	58			
	60	24	92	43	29	32			
682883	0.6	60	88	73	63	68	GalNAc ₃ -3a	PO	842
	2	18	75	38	23	23			
	6	10	80	35	11	9			
682884	0.6	56	88	78	63	67	GalNAc ₃ -7a	PO	842
	2	19	76	44	25	23			
	6	15	82	35	21	24			
682885	0.6	60	92	77	68	76	GalNAc ₃ -10a	PO	842
	2	22	93	58	32	32			
	6	17	85	37	25	20			
682886	0.6	57	91	70	64	69	GalNAc ₃ -13a	PO	842
	2	21	89	50	31	30			
	6	18	102	41	24	27			
684057	0.6	53	80	69	56	62	GalNAc ₃ -19a	A _d	843
	2	21	92	55	34	30			
	6	11	82	50	18	13			

10

20

30

【 1 1 0 8 】

40

50

【表 7 5】

表 8 6

トランスアミナーゼレベル、体重変化、及び相対臓器重量

ISIS 番号	投 与 量 (mg /kg)	ALT(U/L)				AST(U/L)				体 重 (%B L)	肝 臓 (%P BS)	脾 臓 (%P BS)	腎 臓 (% PB S)	配 列 番 号
		BL	3日 目	10 日 目	17 日 目	BL	3日 目	10 日 目	17 日 目					
PBS	該 当 な し	33	34	33	24	58	62	67	52	105	100	100	100	該 当 な し
420 915	6	34	33	27	21	64	59	73	47	115	99	89	91	842
	20	34	30	28	19	64	54	56	42	111	97	83	89	
	60	34	35	31	24	61	58	71	58	113	102	98	95	
660 261	0.6	33	38	28	26	70	71	63	59	111	96	99	92	843
	2	29	32	31	34	61	60	68	61	118	100	92	90	
	6	29	29	28	34	58	59	70	90	114	99	97	95	
	20	33	32	28	33	64	54	68	95	114	101	106	92	

10

20

【 1 1 0 9】

30

40

50

【表 7 6】

表 8 7

トランスアミナーゼレベル、体重変化、及び相対臓器重量

ISI S 番号	投 与 量 (mg /kg)	ALT(U/L)				AST(U/L)				体 重 (%B L)	肝 臓 (%P BS)	脾 臓 (%PB S)	腎 臓 (%P BS)	配 列 番 号
		BL	3日 目	10 日 目	17 日 目	BL	3日 目	10 日 目	17 日 目					
PB S	該 当 な し	32	34	37	41	62	78	76	77	104	100	100	100	該 当 な し
42	6	32	30	34	34	61	71	72	66	102	103	102	105	84 2
09	20	41	34	37	33	80	76	63	54	106	107	135	101	
15	60	36	30	32	34	58	81	57	60	106	105	104	99	
68	0.6	32	35	38	40	53	81	74	76	104	101	112	95	84 2
28	2	38	39	42	43	71	84	70	77	107	98	116	99	
83	6	35	35	41	38	62	79	103	65	105	103	143	97	
68	0.6	33	32	35	34	70	74	75	67	101	100	130	99	84 2
28	2	31	32	38	38	63	77	66	55	104	103	122	100	
84	6	38	32	36	34	65	85	80	62	99	105	129	95	
68	0.6	39	26	37	35	63	63	77	59	100	109	109	112	84 2
28	2	30	26	38	40	54	56	71	72	102	98	111	102	
85	6	27	27	34	35	46	52	56	64	102	98	113	96	
68	0.6	30	40	34	36	58	87	54	61	104	99	120	101	84 2
28	2	27	26	34	36	51	55	55	69	103	91	105	92	
86	6	40	28	34	37	107	54	61	69	109	100	102	99	
68	0.6	35	26	33	39	56	51	51	69	104	99	110	102	84 3
40	2	33	32	31	40	54	57	56	87	103	100	112	97	
57	6	39	33	35	40	67	52	55	92	98	104	121	108	

実施例 8 7 : GalNAc3 クラスタを含む TTR を標的とするオリゴヌクレオチドの単回投与による生体内における作用持続時間

【 1 1 1 0 】

ISIS 番号 4 2 0 9 1 5 及び 6 6 0 2 6 1 (表 8 3 を参照のこと) を、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。ISIS 番号 4 2 0 9 1 5、6 8 2 8 8 3、及び 6 8 2 8 8 5 (表 8 3 を参照のこと) も、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。

処理

【 1 1 1 1 】

ヒト TTR を発現する 8 週齢の雄トランスジェニックマウスのそれぞれに、1 0 0 mg / kg の ISIS 番号 4 2 0 9 1 5 または 1 3 . 5 mg / kg の ISIS 番号 6 6 0 2 6 1 を 1 回皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。投薬前に尾採血を実行して、ベースライン、ならびに投与後 3、7、1 0、1 7、2 4、及び 3 9 日目のレベルを決定した。実施例 8 6 に記載されるように、血漿 TTR タンパク質レベルを測定した。以下の

結果は、ベースラインレベルに対して標準化された各処理群の血漿TTRレベルの平均パーセントとして提示される。

【1112】

【表77】

表88

血漿TTRタンパク質レベル

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	時点(投与後の日数)	TTR(%ベースライン)	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
420915	100	3	30	該当なし	該当なし	842
		7	23			
		10	35			
		17	53			
		24	75			
		39	100			
660261	13.5	3	27	GalNAc ₃ -1a	A _d	843
		7	21			
		10	22			
		17	36			
		24	48			
		39	69			

10

20

処理

【1113】

ヒトTTRを発現する雌トランスジェニックマウスのそれぞれに、100mg/kgのISIS番号420915、10.0mg/kgのISIS番号682883、または10.0mg/kgの682885を1回皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。投薬前に尾採血を実行して、ベースライン、ならびに投与後3、7、10、17、24、及び39日目のレベルを決定した。実施例86に記載されるように、血漿TTRタンパク質レベルを測定した。以下の結果は、ベースラインレベルに対して標準化された各処理群の血漿TTRレベルの平均パーセントとして提示される。

30

【1114】

40

50

【表 7 8】

表 8 9
血漿 TTR タンパク質レベル

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	時点(投与後の日数)	TTR(%ベースライン)	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
420915	100	3	48	該当なし	該当なし	842
		7	48			
		10	48			
		17	66			
		31	80			
682883	10.0	3	45	GalNAc ₃ -3a	PO	842
		7	37			
		10	38			
		17	42			
		31	65			
682885	10.0	3	40	GalNAc ₃ -10a	PO	842
		7	33			
		10	34			
		17	40			
		31	64			

10

20

【 1 1 1 5】

表 8 8 及び 8 9 における結果は、GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドが、共役体を欠く親オリゴヌクレオチド (ISIS 420915) よりも強力であり、より長い作用持続時間を有することを示す。

実施例 8 8 : GalNAc₃ 共役体を含む SMN を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるスプライシング調節

30

【 1 1 1 6】

表 9 0 に列記されるオリゴヌクレオチドを、マウスにおけるヒト運動ニューロン生存 (SMN) のスプライシング調節について試験した。

【 1 1 1 7】

40

50

【表 7 9】

表 9 0
SMNを標的とする修飾ASO

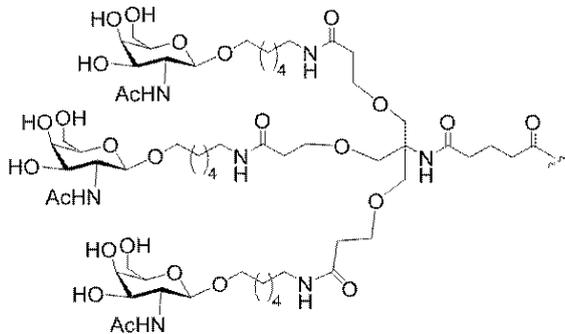
ISIS 番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
387954	A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _e	該当なし	該当なし	844
699819	GalNAc ₃ -7 _a -o'-A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -7a	PO	844
699821	GalNAc ₃ -7 _a -o'-A _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{eo} T _{eo} A _{eo} A _{eo} T _{eo} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} G _{es} G _e	GalNAc ₃ -7a	PO	844
700000	A _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{es} A _{es} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} G _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -I _a	GalNAc ₃ -Ia	A _d	845
703421	X-ATT ^m CA ^m CTTT ^m CATAATG ^m CTGG	該当なし	該当なし	844
703422	GalNAc ₃ -7 _b -X-ATT ^m CA ^m CTTT ^m CATAATG ^m CTGG	GalNAc ₃ -7b	該当なし	844

【1118】

GalNAc₃-7_aの構造は、先の実施例48に示した。「X」は、Gene Tools (Philomath, OR)によって生成された5'-一次アミンを示し、GalNAc₃-7_bは、以下に示すように、リンカーの-NH-C₆-O部分を欠くGalNAc₃-7_aの構造を示す。

【1119】

【化245】



【1120】

ISIS番号703421及び703422は、モルホリノオリゴヌクレオチドであり、これら2つのオリゴヌクレオチドの各ヌクレオチドは、モルホリノヌクレオチドである。
処理

【1121】

ヒトSMNを発現する6週齢のトランスジェニックマウスに、表91に列記されるオリゴ

ヌクレオチドまたは生理食塩水を1回皮下注入した。各処理群は、2匹の雄及び2匹の雌からなった。投与の3日後にマウスを殺して、標準のプロトコルに従ってリアルタイムPCRを用いて、エキソン7を有する場合とエキソン7を有しない場合の肝臓におけるヒトSMN mRNAレベルを決定した。Ribogreen試薬を用いて総RNAを測定した。SMN mRNAレベルを総mRNAに対して標準化し、さらに生理食塩水処理群の平均に対して標準化した。結果として生じたエキソン7を含むSMN mRNAとエキソン7を欠くSMN mRNAとの平均比が、表91に示される。結果は、スプライシングを調節し、かつGalNAc共役体を含む完全修飾オリゴヌクレオチドが、GalNAc共役体を欠く親オリゴヌクレオチドよりも肝臓におけるスプライシングの改変に著しく強力であることを示す。さらに、この傾向は、2'-MOE及びモルホリノ修飾オリゴヌクレオチドを含む複数の修飾化学でも維持される。

10

【1122】

【表80】

表91

生体内におけるヒトSMNを標的とするオリゴヌクレオチドの影響

ISIS 番号	用量(mg/kg)	エキソン7あり/エキソン7なし	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
生理食塩水	該当なし	1.00	該当なし	該当なし	該当なし
387954	32	1.65	該当なし	該当なし	844
387954	288	5.00	該当なし	該当なし	844
699819	32	7.84	GalNAc ₃ -7a	PO	844
699821	32	7.22	GalNAc ₃ -7a	PO	844
700000	32	6.91	GalNAc ₃ -1a	A _d	845
703421	32	1.27	該当なし	該当なし	844
703422	32	4.12	GalNAc ₃ -7b	該当なし	844

20

30

40

実施例89：GalNAc₃共役体を含むアポリポタンパク質A (Apo(a))を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

【1123】

以下の表92に列記されるオリゴヌクレオチドを、トランスジェニックマウスにおけるApo(a)の用量依存的阻害に関する試験で試験した。

【1124】

50

【表 8 1】

表 9 2

Apo (a) を標的とする修飾ASO

ISIS 番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
494372	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	該当なし	該当なし	847
681257	GalNAc ₃ -7 _a -o ¹ T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	847

10

【 1 1 2 5】

GalNAc₃-7_aの構造は、実施例 4 8 に示される。

処理

【 1 1 2 6】

8 週齢の雌 C 5 7 B L / 6 マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r y , B a r H a r b o r , M E) のそれぞれに、表 9 2 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは P B S を、以下に示される投与量で週 1 回、合計 6 回の投与で、皮下注入した。各処理群は、3 ~ 4 匹の動物からなった。第 1 の投与の前日に、かつ各投与後週 1 回、尾採血を実行して、血漿 Apo (a) タンパク質レベルを決定した。最終投与の 2 日後にマウスを 殺した。リアルタイム P C R 及び R I B O G R E E N (登録商標) R N A 定量化試薬 (M o l e c u l a r P r o b e s , I n c . E u g e n e , O R) を用いて、肝臓における Apo (a) m R N A レベルを決定した。E L I S A を用いて Apo (a) 血漿タンパク質レベルを決定し、肝臓トランスアミナーゼレベルを決定した。表 9 3 における m R N A 及び血漿タンパク質の結果は、P B S 処理群と比較した処理群の平均パーセントとして提示される。血漿タンパク質レベルをさらに P B S 群のベースライン (B L) 値に対して標準化した。平均絶対トランスアミナーゼレベル及び体重 (ベースライン平均と比較した %) が表 9 4 に報告される。

20

30

【 1 1 2 7】

表 9 3 に例証されるように、オリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で肝臓における Apo (a) m R N A 及び血漿タンパク質レベルを低下させた。さらに、GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドは、GalNAc 共役体を欠く親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であり、より長い作用持続時間を有した。表 9 4 に例証されるように、トランスアミナーゼレベル及び体重はオリゴヌクレオチドの影響を受けず、オリゴヌクレオチドが良好な耐容性を示したことを示す。

【 1 1 2 8】

40

50

【表 8 2】

表 9 3

肝臓におけるApo(a) mRNA及び血漿タンパク質レベル

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	Apo(a)mRNA(%PBS)	Apo(a)血漿タンパク質(%PBS)						
			BL	1 週目	2 週目	3 週目	4 週目	5 週目	6 週目
PBS	該当なし	100	100	120	119	113	88	121	97
494372	3	80	84	89	91	98	87	87	79
	10	30	87	72	76	71	57	59	46
	30	5	92	54	28	10	7	9	7
681257	0.3	75	79	76	89	98	71	94	78
	1	19	79	88	66	60	54	32	24
	3	2	82	52	17	7	4	6	5
	10	2	79	17	6	3	2	4	5

10

【 1 1 2 9】

【表 8 3】

表 9 4

ISIS番号	投与量(mg/kg)	ALT(U/L)	AST(U/L)	体重(%ベースライン)
PBS	該当なし	37	54	103
494372	3	28	68	106
	10	22	55	102
	30	19	48	103
681257	0.3	30	80	104
	1	26	47	105
	3	29	62	102
	10	21	52	107

20

30

実施例 9 0 : GalNAc3 クラスタを含む TTR を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

【 1 1 3 0】

以下の表 9 5 に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてヒト TTR 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスにおけるヒトトランスサイレチン (TTR) のアンチセンス阻害について試験した。

40

処理

【 1 1 3 1】

TTR トランスジェニックマウスのそれぞれに、表 9 6 に列記されるオリゴヌクレオチド及び投与量または PBS を、週 1 回 3 週間、合計 3 回の投与で、皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。第 1 の投与の前に、尾採血を実行して、ベースライン (BL) での血漿 TTR タンパク質レベルを決定した。最終投与の 72 時間後にマウスを殺した。臨床分析器 (AU480、Beckman Coulter, CA) を用いて、TTR タンパク質レベルを測定した。標準のプロトコルに従ってリアルタイム PCR 及び RIBOGREEN (登録商標) RNA 定量化試薬 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) を用いて、肝臓におけるヒト TTR mRNA レベルを決定

50

した。表 9 6 に提示される結果は、各処理群の平均値である。mRNA レベルは、PBS 群の平均と比較した平均値である。血漿タンパク質レベルは、ベースラインでの PBS 群の平均値と比較した平均値である。「BL」は、第 1 の投与の直前に測定したベースラインを示す。表 9 6 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で TTR 発現レベルを低下させた。GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドは、GalNAc 共役体を欠く親 (ISIS 420915) よりも強力であり、ホスホジエステルまたはデオキシアデノシンの切断可能部分を含むオリゴヌクレオチドは、共役体を欠く親と比較して、力価の著しい改善を示した (ISIS 番号 682883 及び 666943 対 420915、ならびに実施例 86 及び 87 を参照のこと)。

【 1 1 3 2 】

【表 8 4】

10

表 9 5

ヒト TTR を標的とするオリゴヌクレオチド

ISIS 番号	配列5'から3'	結合	GalNAc クラスタ	CM	配列番号
420915	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS	該当なし	該当なし	842
682883	GalNAc ₃ -3 _{a-o} ·T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _d sA _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -3a	PO	842
666943	GalNAc ₃ -3 _{a-o} ·A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -3a	A _d	846
682887	GalNAc ₃ -7 _{a-o} ·A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -7a	A _d	846
682888	GalNAc ₃ -10 _{a-o} ·A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -10a	A _d	846
682889	GalNAc ₃ -13 _{a-o} ·A _{do} T _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} G _{eo} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{eo} T _{eo} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	PS/PO	GalNAc ₃ -13a	A _d	846

20

30

【 1 1 3 3 】

表 9 5 の説明文を実施例 7 4 で見つけることができる。GalNAc₃-3a の構造は、実施例 3 9 に示される。GalNAc₃-7a の構造は、実施例 4 8 に示される。GalNAc₃-10a の構造は、実施例 4 6 に示される。GalNAc₃-13a の構造は、実施例 6 2 に示される。

【 1 1 3 4 】

40

50

【表 8 5】

表 9 6
生体内におけるヒト TTR のアンチセンス阻害

ISIS 番号	投与量(mg/kg)	TTR mRNA(%PBS)	TTR タンパク質(%BL)	GalNAc クラスタ	CM
PBS	該当なし	100	124	該当なし	該当なし
420915	6	69	114	該当なし	該当なし
	20	71	86		
	60	21	36		
682883	0.6	61	73	GalNAc ₃ -3a	PO
	2	23	36		
	6	18	23		
666943	0.6	74	93	GalNAc ₃ -3a	A _d
	2	33	57		
	6	17	22		
682887	0.6	60	97	GalNAc ₃ -7a	A _d
	2	36	49		
	6	12	19		
682888	0.6	65	92	GalNAc ₃ -10a	A _d
	2	32	46		
	6	17	22		
682889	0.6	72	74	GalNAc ₃ -13a	A _d
	2	38	45		
	6	16	18		

実施例 9 1 : 非ヒト霊長類における GalNAc₃ 共役体を含む第 V I I 因子を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

【 1 1 3 5】

以下の表 9 7 に列記されるオリゴヌクレオチドを、非終末用量増加試験 (non-terminal, dose escalation study) においてサルにおける第 V I I 因子のアンチセンス阻害について試験した。

処理

【 1 1 3 6】

処置した (non-naive) サルのそれぞれに、増加用量の表 9 7 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは PBS を、0、15、及び 29 日目に皮下注入した。各処理群は、4 匹の雄及び 1 匹の雌からなった。第 1 の投与の前とその後のさまざまな時点で、血液採取を実行して、血漿第 V I I 因子タンパク質レベルを決定した。E L I S A によって第 V I I 因子タンパク質レベルを測定した。表 9 8 に提示される結果は、第 1 の投与の直前に測定したベースライン (BL) での PBS 群の平均値と比較した各処理群の平均値である。表 9 8 に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存的様式で第 V I I 因子の発現レベルを低下させ、GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドは、サルにおいて GalNAc 共役体を欠くオリゴヌクレオチドよりも著しく強力であった。

【 1 1 3 7】

10

20

30

40

50

【表 8 6】

表 9 7

第VII因子を標的とするオリゴヌクレオチド

ISIS 番号	配列5'から3'	結合	GalNAc クラスタ	CM	配列番号
407935	A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _e	PS	該当なし	該当なし	848
686892	GalNAc ₃ -10 _{a-o'} A _{es} T _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{es} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} T _{es} G _{es} A _e	PS	GalNAc ₃ -10a	PO	848

10

【1138】

表 9 7 の説明文を実施例 7 4 で見つけることができる。GalNAc₃-10_aの構造は、実施例 4 6 に示される。

【1139】

【表 8 7】

表 9 8

第VII因子血漿タンパク質レベル

ISIS番号	日数	用量(mg/kg)	第VII因子(%BL)
407935	0	該当なし	100
	15	10	87
	22	該当なし	92
	29	30	77
	36	該当なし	46
	43	該当なし	43
686892	0	3	100
	15	10	56
	22	該当なし	29
	29	30	19
	36	該当なし	15
	43	該当なし	11

20

30

実施例 9 2 : GalNAc₃ 共役体を含む Apo - C I I I を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドによる初代肝細胞におけるアンチセンス阻害

【1140】

初代マウス肝細胞を 15,000 細胞/ウェルで 96 ウェルプレートに播種し、マウス ApoC - I I I を標的とする表 9 9 に列記されるオリゴヌクレオチドを、0.46、1.37、4.12、または 12.35、37.04、111.11、もしくは 333.33 nM または 1.00 μm で添加した。オリゴヌクレオチドとともに 24 時間インキュベートした後、細胞を溶解し、RNeasy (Qiagen) を用いて全 RNA を精製した。標準のプロトコルに従ってリアルタイム PCR 及び RIBOGREEN (登録商標) RNA 定量化試薬 (Molecular Probes, Inc.) を用いて、ApoC - I I I mRNA レベルを決定した。Prism 4 ソフトウェア (GraphPad) を用いて、IC₅₀ 値を決定した。結果は、切断可能部分がホスホジエステルであるかホスホジエステル連結デオキシアデノシンであるかにかかわらず、GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドが、共役体を欠く親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であったことを示す。

40

50

【 1 1 4 1 】

【 表 8 8 】

表 9 9

マウス初代肝細胞におけるマウスAPOC-III発現の阻害

ISIS番号	配列(5'から3')	CM	IC ₅₀ (nM)	配列番号
440670	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	該当なし	13.20	849
661180	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	A _d	1.40	830
680771	GalNAc ₃ -3 _{a-o} ' ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	0.70	849
680772	GalNAc ₃ -7 _{a-o} ' ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	1.70	849
680773	GalNAc ₃ -10 _{a-o} ' ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	2.00	849
680774	GalNAc ₃ -13 _{a-o} ' ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	1.50	849
681272	GalNAc ₃ -3 _{a-o} ' ^m C _{es} A _{eo} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{eo} A _{eo} G _{es} ^m C _{es} A _e	PO	<0.46	849
681273	GalNAc ₃ -3 _{a-o} 'A _{do} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _e	A _d	1.10	851
683733	^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{ds} T _{ds} A _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} G _{ds} G _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _{es} A _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -19 _a	A _d	2.50	830

10

20

【 1 1 4 2 】

GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例9に示され、GalNAc₃-3_aは、実施例39に示され、GalNAc₃-7_aは、実施例48に示され、GalNAc₃-10_aは、実施例46に示され、GalNAc₃-13_aは、実施例62に示され、GalNAc₃-19_aは、実施例70に示される。

30

実施例93：混成ウイング及び5'-GalNAc₃共役体を含むSRB-1を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

【 1 1 4 3 】

表100に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおけるSRB-1のアンチセンス阻害について試験した。

【 1 1 4 4 】

40

50

【表 8 9】

表 1 0 0

SRB-1を標的とする修飾ASO

ISIS番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスター	CM	配列番号
44909 3	T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	該当なし	該当なし	852
69980 6	GalNAc ₃ -3 _{a-o} 'T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -3a	PO	852
69980 7	GalNAc ₃ -7 _{a-o} 'T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	852
69980 9	GalNAc ₃ -7 _{a-o} 'T _{ks} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	852
69981 1	GalNAc ₃ -7 _{a-o} 'T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	852
69981 3	GalNAc ₃ -7 _{a-o} 'T _{ks} T _{ds} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7a	PO	852
69981 5	GalNAc ₃ -7 _{a-o} 'T _{es} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _{ks} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	852

10

20

【 1 1 4 5 】

GalNAc₃-3_aの構造は、先の実施例39に示され、GalNAc₃-7_aの構造は、先の実施例48に示される。下付き文字「e」は、2'-MOE修飾ヌクレオシドを示し、「d」は、-D-2'-デオキシリボヌクレオシドを示し、「k」は、6'-(S)-CH₃二環式ヌクレオシド(cEt)を示し、「s」は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部(PS)を示し、「o」は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部(PO)を示す。上付き文字「m」は、5-メチルシトシンを示す。

30

処理

【 1 1 4 6 】

6~8週齢のC57BL/6マウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)に、表100に列記されるオリゴヌクレオチドまたは生理食塩水を、以下に示される投与量で1回、皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺した。リアルタイムPCRを用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを測定した。標準のプロトコルに従って、SRB-1 mRNAレベルをシクロフィリンmRNAレベルに対して標準化した。結果は、生理食塩水対照群と比較した各処理群のSRB-1 mRNAレベルの平均パーセントとして提示される。表101に例証されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、用量依存の様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させ、GalNAc共役体を含み、かつ完全cEtまたは混成糖修飾のいずれかのウイングを有するギャップマーオリゴヌクレオチドは、共役体を欠き、かつ完全cEt修飾ウイングを含む親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であった。

40

【 1 1 4 7 】

体重、肝臓トランスアミナーゼ、総ビリルビン、及びBUNも測定し、各処理群の平均値が表101に示される。体重は、オリゴヌクレオチド投与の直前に測定したベースライン体重(%BL)と比較した平均体重率として示される。

【 1 1 4 8 】

50

【表 90】

表 101

SRB-1 mRNA、ALT、AST、BUN、及び総ビリルビンレベル、ならびに体重

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	SRB-1 mRNA(%PBS)	ALT(U/L)	AST(U/L)	Bil	BUN	体重 (%BL)
PBS	該当なし	100	31	84	0.15	28	102
449093	1	111	18	48	0.17	31	104
	3	94	20	43	0.15	26	103
	10	36	19	50	0.12	29	104
699806	0.1	114	23	58	0.13	26	107
	0.3	59	21	45	0.12	27	108
	1	25	30	61	0.12	30	104
699807	0.1	121	19	41	0.14	25	100
	0.3	73	23	56	0.13	26	105
	1	24	22	69	0.14	25	102
699809	0.1	125	23	57	0.14	26	104
	0.3	70	20	49	0.10	25	105
	1	33	34	62	0.17	25	107
699811	0.1	123	48	77	0.14	24	106
	0.3	94	20	45	0.13	25	101
	1	66	57	104	0.14	24	107
699813	0.1	95	20	58	0.13	28	104
	0.3	98	22	61	0.17	28	105
	1	49	19	47	0.11	27	106
699815	0.1	93	30	79	0.17	25	105
	0.3	64	30	61	0.12	26	105
	1	24	18	41	0.14	25	106

10

20

30

実施例 94 : 2' - 糖修飾及び 5' - GalNA₃共役体を含む SRB - 1 を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

【 1149】

表 102 に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける SRB - 1 のアンチセンス阻害について試験した。

【 1150】

40

50

【表 9 1】

表 1 0 2

SRB-1 を標的とする修飾 ASO

ISIS 番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスター	CM	配列番号
353382	$G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	該当なし	該当なし	829
700989	$G_{ms} C_{ms} U_{ms} U_{ms} C_{ms} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} U_{ms} C_{ms} C_{ms} U_{ms} U_m$	該当なし	該当なし	853
666904	$GalNAc_3-3a-O^m G_{es}^m C_{es} T_{es} T_{es}^m C_{es} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{es}^m C_{es}^m C_{es} T_{es} T_e$	GalNAc ₃ -3a	PO	829
700991	$GalNAc_3-7a-O^m G_{ms} C_{ms} U_{ms} U_{ms} C_{ms} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds} G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} U_{ms} C_{ms} C_{ms} U_{ms} U_m$	GalNAc ₃ -7a	PO	853

10

20

【 1 1 5 1】

下付き文字「m」は、2'-O-メチル修飾ヌクレオシドを示す。完全な表の説明文については、実施例 7 4 を参照されたい。GalNAc₃-3a の構造は、先の実施例 3 9 に示し、GalNAc₃-7a の構造は、先の実施例 4 8 に示した。

処理

【 1 1 5 2】

実施例 9 3 に記載されるプロトコルを用いて試験を完了した。結果が以下の表 1 0 3 に示され、GalNAc 共役体を含む 2'-MOE 修飾オリゴヌクレオチドと 2'-OMe 修飾オリゴヌクレオチドとが両方ともに、共役体を欠くそれぞれの親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であったことを示す。体重、肝臓トランスアミナーゼ、総ビリルビン、及び BUN の測定結果は、これらの化合物がすべて良好な耐容性を示したことを示す。

30

【 1 1 5 3】

40

50

【表 9 2】

表 1 0 3

SRB-1 mRNA

ISIS番号	投与量(mg/kg)	SRB-1 mRNA(%PBS)
PBS	該当なし	100
353382	5	116
	15	58
	45	27
700989	5	120
	15	92
	45	46
666904	1	98
	3	45
	10	17
700991	1	118
	3	63
	10	14

10

20

実施例 9 5 : 二環式ヌクレオシド及び 5' - GalNA₃ 共役体を含む SRB - 1 を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

【 1 1 5 4 】

表 1 0 4 に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおける SRB - 1 のアンチセンス阻害について試験した。

【 1 1 5 5 】

30

40

50

【表 9 3】

表 1 0 4

SRB-1 を標的とする修飾 ASO

ISIS番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	該当なし	該当なし	823
666905	GalNAc ₃ -3 _a -o'-T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _d G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -3 _a	PO	823
699782	GalNAc ₃ -7 _a -o'-T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -7 _a	PO	823
699783	GalNAc ₃ -3 _a -o'-T _{ls} ^m C _{ls} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ls} ^m C _l	GalNAc ₃ -3 _a	PO	823
653621	T _{ls} ^m C _{ls} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ls} ^m C _{lo} A _{do} '-GalNAc ₃ -1 _a	GalNAc ₃ -1 _a	A _d	824
439879	T _{gs} ^m C _{gs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _d G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{gs} ^m C _g	該当なし	該当なし	823
699789	GalNAc ₃ -3 _a -o'-T _{gs} ^m C _{gs} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _d G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{gs} ^m C _g	GalNAc ₃ -3 _a	PO	823

10

20

【 1 1 5 6 】

下付き文字「g」は、フルオロ - HNAヌクレオシドを示し、下付き文字「l」は、2' - O - CH₂ - 4' 橋を含むロックドヌクレオシドを示す。他の省略形については、実施例 7 4 の表の説明文を参照されたい。GalNAc₃-1_aの構造は、先の実施例 9 に示し、GalNAc₃-3_aの構造は、先の実施例 3 9 に示し、GalNAc₃-7_aの構造は、先の実施例 4 8 に示した。

30

処理

【 1 1 5 7 】

実施例 9 3 に記載されるプロトコルを用いて試験を完了した。結果が以下の表 1 0 5 に示され、GalNAc 共役体及びさまざまな二環式ヌクレオシド修飾を含むオリゴヌクレオチドが、共役体を欠くが二環式ヌクレオシド修飾を含む親オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であったことを示す。さらに、GalNAc 共役体及びフルオロ - HNA 修飾を含むオリゴヌクレオチドは、共役体を欠くがフルオロ - HNA 修飾を含む親よりも著しく強力であった。体重、肝臓トランスアミナーゼ、総ビリルビン、及びBUNの測定結果は、これらの化合物がすべて良好な耐容性であったことを示した。

40

【 1 1 5 8 】

50

【表 9 4】

表 1 0 5

SRB-1 mRNA、ALT、AST、BUN、及び総ビリルビンレベル、ならびに体重

ISIS番号	投与量(mg/kg)	SRB-1 mRNA(%PBS)
PBS	該当なし	100
440762	1	104
	3	65
	10	35
666905	0.1	105
	0.3	56
	1	18
699782	0.1	93
	0.3	63
	1	15
699783	0.1	105
	0.3	53
	1	12
653621	0.1	109
	0.3	82
	1	27
439879	1	96
	3	77
	10	37
699789	0.1	82
	0.3	69
	1	26

10

20

30

実施例 9 6 : GalNAc₃ 共役基を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドの血漿タンパク質結合

【 1 1 5 9 】

ApoC-IIIを標的とする表 7 0 に列記されるオリゴヌクレオチド及びApo(a)を標的とする表 1 0 6 におけるオリゴヌクレオチドを限外濾過アッセイにおいて試験して、血漿タンパク質結合を評価した。

【 1 1 6 0 】

40

50

【表 9 5】

表 1 0 6

Apo (a) を標的とする修飾オリゴヌクレオチド

ISIS番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
49437 2	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	該当なし	該当なし	847
69340 1	T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	該当なし	該当なし	847
68125 1	GalNAc ₃ -7 _a -o'-T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	847
68125 7	GalNAc ₃ -7 _a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7 _a	PO	847

10

【 1 1 6 1】

表の説明文については、実施例 7 4 を参照されたい。GalNAc₃-7 a の構造は、先の実施例 4 8 に示される。

20

【 1 1 6 2】

Ultrafree - MC 限外濾過ユニット (3 0 , 0 0 0 NMWL、低結合再生セルロース膜、Millipore, Bedford, MA) を 3 0 0 μ L の 0 . 5 % Tween 8 0 で事前に条件付け、2 0 0 0 g で 1 0 分間遠心分離し、その後、H₂O 中の 3 0 0 μ L の 3 0 0 μ g / m L 対照オリゴヌクレオチド溶液で事前に条件付け、2 0 0 0 g で 1 6 分間遠心分離した。これらの試験で用いる表 7 0 及び 1 0 6 の各試験オリゴヌクレオチドのフィルターへの非特異的結合を評価するために、3 0 0 μ L の H₂O 中の 2 5 0 n g / m L 溶液オリゴヌクレオチド (pH 7 . 4) を事前に条件付けたフィルターに設置し、2 0 0 0 g で 1 6 分間遠心分離した。ELISA アッセイによって濾過していない試料及び濾過した試料を分析して、オリゴヌクレオチド濃度を決定した。3 つの複製物を用いて各試料の平均濃度を得た。濾過していない試料と比較した濾過した試料の平均濃度を用いて、血漿の不在下でフィルターによって回収されたオリゴヌクレオチドの割合 (% 回収) を決定する。

30

【 1 1 6 3】

薬物を使用していない健常なヒト志願者、カニクイザル、及び CD - 1 マウス由来の K 3 - EDTA 中に収集された凍結全血漿試料を Bioreclamation LLC (Westbury, NY) から購入した。試験オリゴヌクレオチドを、2 つの濃度 (5 μ g / m L 及び 1 5 0 μ g / m L) で血漿の 1 . 2 m L の一定分量に添加した。各スパイクした血漿試料の一定分量 (3 0 0 μ L) を事前に条件付けられたフィルターユニット内に設置し、3 7 ° C で 3 0 分間インキュベートした直後に 2 0 0 0 g で 1 6 分間遠心分離した。ELISA によって、濾過してスパイクした血漿試料及び濾過していないスパイクした血漿試料の一定分量を分析して、各試料中のオリゴヌクレオチドの濃度を決定した。1 つの濃度ごとに 3 つの複製物を用いて、各試料中の結合オリゴヌクレオチド及び非結合オリゴヌクレオチドの平均割合を決定した。濾過していない試料の濃度と比較した濾過した試料の平均濃度を用いて、血漿タンパク質に結合されていない血漿中のオリゴヌクレオチドの割合 (% 非結合) を決定する。各オリゴヌクレオチドの % 非結合を % 回収で割ることによって、最終非結合オリゴヌクレオチド値を非特異的結合に対して補正する。最終 % 非結合値を 1 0 0 から差し引くことによって、最終 % 結合オリゴヌクレオチド値を決定する。各種の血漿において試験した 2 つの濃度のオリゴヌクレオチド (5 μ g / m L 及び 1 5 0

40

50

$\mu\text{g}/\text{mL}$)の結果が表107に示される。結果は、GalNAc共役基が血漿タンパク質結合に大きな影響を与えないことを示す。さらに、完全PSヌクレオシド間連結部を有するオリゴヌクレオチドも混成PO/PS連結部を有するオリゴヌクレオチドも血漿タンパク質に結合し、完全PS連結部を有するオリゴヌクレオチドは、混合PO/PS連結部を有するオリゴヌクレオチドよりも若干高い程度に血漿タンパク質に結合する。

【1164】

【表96】

表107

血漿タンパク質に結合される修飾オリゴヌクレオチドの割合

ISIS 番号	ヒト血漿		サル血漿		マウス血漿	
	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	150 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	150 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	150 $\mu\text{g}/\text{mL}$
304801	99.2	98.0	99.8	99.5	98.1	97.2
663083	97.8	90.9	99.3	99.3	96.5	93.0
674450	96.2	97.0	98.6	94.4	94.6	89.3
494372	94.1	89.3	98.9	97.5	97.2	93.6
693401	93.6	89.9	96.7	92.0	94.6	90.2
681251	95.4	93.9	99.1	98.2	97.8	96.1
681257	93.4	90.5	97.6	93.7	95.6	92.7

実施例97：GalNAc₃共役基を含むTTRを標的とする修飾オリゴヌクレオチド

【1165】

GalNAc共役体を含む表108に示されるオリゴヌクレオチドを、TTRを標的とするように設計した。

【1166】

10

20

30

40

50

【表 9 7】

表 1 0 8

T T R を標的とする修飾オリゴヌクレオチド

ISIS 番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
666941	GalNAc ₃ -3 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3	A _d	846
666942	T _{es} ^m C _{co} T _{co} T _{co} G _{co} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{co} T _{co} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{co} A _{do'} -GalNAc ₃ -3 _a	GalNAc ₃ -1	A _d	843
682876	GalNAc ₃ -3 _{a-o'} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3	PO	842
682877	GalNAc ₃ -7 _{a-o'} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7	PO	842
682878	GalNAc ₃ -10 _{a-o'} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -10	PO	842
682879	GalNAc ₃ -13 _{a-o'} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -13	PO	842
682880	GalNAc ₃ -7 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7	A _d	846
682881	GalNAc ₃ -10 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -10	A _d	846
682882	GalNAc ₃ -13 _{a-o'} A _{do} T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -13	A _d	846
684056	T _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} G _{es} G _{ds} T _{ds} T _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} A _{ds} A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{co} A _{do'} -GalNAc ₃ -19 _a	GalNAc ₃ -19	A _d	846

10

20

【 1 1 6 7】

表 1 0 8 の説明文を実施例 7 4 で見つけることができる。GalNAc₃-1 の構造は、実施例 9 に示した。GalNAc₃-3_a の構造は、実施例 3 9 に示した。GalNAc₃-7_a の構造は、実施例 4 8 に示した。GalNAc₃-10_a の構造は、実施例 4 6 に示した。GalNAc₃-13_a の構造は、実施例 6 2 に示した。GalNAc₃-19_a の構造は、実施例 7 0 に示した。

実施例 9 8 : h P M B C アッセイにおける GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドの炎症誘発作用の評価

【 1 1 6 8】

表 1 0 9 に列記されるオリゴヌクレオチドを、実施例 2 3 及び 2 4 に記載されるように h P M B C アッセイにおいて炎症誘発作用について試験した(オリゴヌクレオチドの説明については、表 3 0、8 3、9 5、及び 1 0 8 を参照のこと)。ISIS 3 5 3 5 1 2 は、正の対照として用いられる高レスポンドであり、他のオリゴヌクレオチドは、表 8 3、9 5、及び 1 0 8 に記載されるものである。1 人の志願ドナー由来の血液を用いて表 1 0 9 に示される結果を得た。結果は、混合 P O / P S ヌクレオシド間連結部を含むオリゴヌクレオチドが、完全 P S 連結部を有する同一のオリゴヌクレオチドと比較して、著しく低い炎症誘発応答をもたらしたことを示す。さらに、GalNAc 共役基は、このアッセイにおいて大きく影響しなかった。

【 1 1 6 9】

30

40

50

【表 9 8】

表 1 0 9

ISIS番号	E_{max}/EC_{50}	GalNAc ₃ クラスター	結合	CM
353512	3630	該当なし	PS	該当なし
420915	802	該当なし	PS	該当なし
682881	1311	GalNAc ₃ -10	PS	A _d
682888	0.26	GalNAc ₃ -10	PO/PS	A _d
684057	1.03	GalNAc ₃ -19	PO/PS	A _d

10

実施例 9 9 : アシアロ糖タンパク質受容体に対する GalNAc 共役体を含むオリゴヌクレオチドの結合親和性

【 1 1 7 0 】

アシアロ糖タンパク質受容体に対する表 1 1 0 に列記されるオリゴヌクレオチド (オリゴヌクレオチドの説明については、表 7 6 を参照のこと) の結合親和性を、競合的受容体結合アッセイにおいて試験した。競合相手のリガンドである 1 - 酸性糖タンパク質 (AGP) を、5 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5) 中で 1 U ノイラミニダーゼ - アガロースとともに 3 7 °C で 1 6 時間インキュベートし、シアル酸アッセイまたはサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) のいずれかで 9 0 % を超える脱シアル化を確認した。Atsma et al. (J Lipid Res. 1991 Jan; 32 (1): 173 - 81 を参照のこと) の手順に従って、一塩化ヨウ素を用いて AGP をヨウ素化した。この方法において、脱シアル化 1 - 酸性糖タンパク質 (de-AGP) を、1 0 m M 塩化ヨウ素、Na¹²⁵I、及び 0 . 2 5 M NaOH 中の 1 M グリシンに添加した。室温で 1 0 分間インキュベートした後、3 K D M W C O スピカラムを利用してこの混合物を 2 回濃縮することによって、¹²⁵I 標識 de-AGP を遊離 ¹²⁵I から分離した。このタンパク質を、Agilent SEC-3 カラム (7 . 8 × 3 0 0 m m) 及び ³H-RAM カウンタを装備した HPLC システムにおいて標識効率及び純度について試験した。¹²⁵I 標識 de-AGP 及び ASO を含有するさまざまな GalNAc クラスターを利用した競合実験を以下のとおり実行した。ヒト HepG2 細胞 (1 0 ⁶ 細胞 / m L) を、2 m L の適切な成長培地中の 6 ウェルプレートにプレATINGした。1 0 % ウシ胎児血清 (FBS)、2 m M L - グルタミン、及び 1 0 m M HEPES を補充した MEM 培地を用いた。細胞を、それぞれ、5 % 及び 1 0 % CO₂ で、3 7 °C で 1 6 ~ 2 0 時間インキュベートした。実験前に細胞を FBS を有しない培地で洗浄した。細胞を、2 % FBS を有する適切な成長培地を含有する 1 m L の競合混合物、1 0 - 8 M ¹²⁵I 標識 de-AGP、及び 1 0 - 1 ¹ ~ 1 0 - 5 M の範囲の濃度の ASO を含有する GalNAc クラスターとともに、3 7 °C で 3 0 分間インキュベートした。1 0 - 2 M GalNAc 糖の存在下で非特異的結合を決定した。細胞を FBS を有しない培地で 2 回洗浄して、非結合 ¹²⁵I 標識 de-AGP 及び競合相手である GalNAc ASO を除去した。1 % ³H-メルカプトエタノールを含有する Qiagen の RLT 緩衝液を用いて、細胞を溶解した。1 0 分間の短時間凍結 / 解凍サイクル後に溶解物を丸底アッセイチューブに移し、³H-カウンタでアッセイした。非特異的結合を差し引いた後に、¹²⁵I タンパク質カウントを最も低い GalNAc - ASO 濃度カウントの値で割った。非線形回帰アルゴリズムを用いた単一部位競合結合等式に従って阻害曲線を当てはめて、結合親和性 (K_D) を計算した。

20

30

40

【 1 1 7 1 】

表 1 1 0 における結果を 5 つの異なる日に実行した実験から得た。上付き文字「a」の付いたオリゴヌクレオチドの結果は、2 つの異なる日に実行した実験の平均である。結果は、5 ' 末端に GalNAc 共役基を含むオリゴヌクレオチドがヒト HepG2 細胞上のアシ

50

アロ糖タンパク質受容体に結合し、3'末端にGalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドよりも1.5~16倍高い親和性を有することを示す。

【1172】

【表99】

表110

アシアロ糖タンパク質受容体結合アッセイの結果

ISIS番号	GalNAc共役体	GalNAc共役体が結合するオリゴヌクレオチド末端	K _D (nM)
661161 ^a	GalNAc ₃ -3	5'	3.7
666881 ^a	GalNAc ₃ -10	5'	7.6
666981	GalNAc ₃ -7	5'	6.0
670061	GalNAc ₃ -13	5'	7.4
655861 ^a	GalNAc ₃ -1	3'	11.6
677841 ^a	GalNAc ₃ -19	3'	60.8

10

実施例100：生体内におけるApo(a)を標的とするGalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

20

【1173】

以下の表111aに列記されるオリゴヌクレオチドを、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。

【1174】

【表100】

表111a

APO(a)を標的とする修飾ASO

ISIS番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
681251	GalNAc ₃ -7 _a -o'-T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	847
681257	GalNAc ₃ -7 _a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	847

30

【1175】

GalNAc₃-7aの構造は、実施例48に示した。

処理

【1176】

ヒトApo(a)を発現する雌トランスジェニックマウスのそれぞれに、表111bに列記されるオリゴヌクレオチド及び投与量またはPBSを、週1回、合計6回の投与で、皮下注入した。各処理群は、3匹の動物からなった。投薬の前日に血液を採取して、血漿中のApo(a)タンパク質のベースラインレベル、ならびに第1の投与後72時間、1週間、及び2週間時点のレベルを決定した。第1の投与後3週間、4週間、5週間、及び6週間時点でさらに血液を採取する。ELISAを用いて血漿Apo(a)タンパク質レベルを測定した。表111bにおける結果は、ベースラインレベル(%BL)に対して標準化された各処理群の血漿Apo(a)タンパク質レベルの平均パーセントとして提示され、結果は、GalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドがApo(a)発現の強力な減少を示したことを示す。この強力な影響は、完全PSヌクレオチド間連結部を含むオリゴ

40

50

ヌクレオチド及び混成 P O 及び P S 連結部を含むオリゴヌクレオチドにおいて観察された。

【 1 1 7 7 】

【表 1 0 1】

表 1 1 1 b

Apo (a) 血漿タンパク質レベル

ISIS 番号	投与量(mg/kg)	72時間時点での Apo(a) (%BL)	1週間時点での Apo(a) (%BL)	3週間時点での Apo(a) (%BL)
PBS	該当なし	116	104	107
681251	0.3	97	108	93
	1.0	85	77	57
	3.0	54	49	11
	10.0	23	15	4
681257	0.3	114	138	104
	1.0	91	98	54
	3.0	69	40	6
	10.0	30	21	4

10

20

実施例 1 0 1 : 安定した部分を介して連結された G a l N A c クラスタを含むオリゴヌクレオチドによるアンチセンス阻害

【 1 1 7 8 】

表 1 1 2 に列記されるオリゴヌクレオチドを生体内におけるマウス A P O C - I I I 発現の阻害について試験した。C 5 7 B 1 / 6 マウスのそれぞれに、表 1 1 2 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは P B S を 1 回皮下注入した。各処理群は、4 匹の動物からなった。I S I S 4 4 0 6 7 0 で処理した各マウスは、2、6、20、または 60 mg / kg の投与を受けた。I S I S 6 8 0 7 7 2 または 6 9 6 8 4 7 で処理した各マウスは、0.6、2、6、または 20 mg / kg を受けた。I S I S 6 9 6 8 4 7 の G a l N A c 共役基は、安定した部分（容易に切断可能なホスホジエステル含有結合の代わりにホスホロチオエート連結部）を介して連結されている。投与の 7 2 時間後に動物を殺した。リアルタイム P C R を用いて、肝臓における A P O C - I I I m R N A レベルを測定した。標準のプロトコルに従って、A P O C - I I I m R N A レベルをシクロフィリン m R N A レベルに対して標準化した。結果は、生理食塩水対照群と比較した各処理群の A P O C - I I I m R N A レベルの平均パーセントとして表 1 1 2 に提示される。結果は、G a l N A c 共役基を含むオリゴヌクレオチドが、共役基を欠くオリゴヌクレオチドよりも著しく強力であったことを示す。さらに、切断可能部分を介してオリゴヌクレオチドに連結された G a l N A c 共役基を含むオリゴヌクレオチド (I S I S 6 8 0 7 7 2) は、安定した部分を介してオリゴヌクレオチドに連結された G a l N A c 共役基を含むオリゴヌクレオチド (I S I S 6 9 6 8 4 7) よりもさらに強力であった。

30

40

【 1 1 7 9 】

50

【表 1 0 2】

表 1 1 2

マウスAPOC-IIIを標的とする修飾オリゴヌクレオチド

ISIS番号	配列(5'から3')	CM	投与量 (mg/kg)	APOC-III mRNA(% PBS)	配列 番号
440670	${}^mC_{es}A_{es}G_{ds}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	該当なし	2	92	849
			6	86	
			20	59	
			60	37	
680772	$GalNAC_3-7_{a-o}$ ${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $sT_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	PO	0.6	79	849
			2	58	
			6	31	
			20	13	
696847	$GalNAC_3-7_{a-s}$ ${}^mC_{es}A_{es}G_{es}{}^mC_{es}T_{es}T_{ds}T_{ds}A_{ds}$ $sT_{ds}T_{ds}A_{ds}G_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}{}^mC_{es}$ $A_{es}G_{es}{}^mC_{es}A_e$	該当なし(PS)	0.6	83	849
			2	73	
			6	40	
			20	28	

10

20

【 1 1 8 0】

GalNAc₃-7_aの構造は、実施例48に示した。

実施例102：GalNAc共役体を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドの肝臓における分布

【 1 1 8 1】

GalNAc共役体を含まないISIS 353382（表36を参照のこと）及びGalNAc共役体を含むISIS 655861（表36を参照のこと）の肝臓における分布を評価した。雄balb/cマウスに、ISIS 353382または655861を、表113に列記される投与量で1回、皮下注入した。2匹の動物からなった18mg/kgのISIS 655861群を除いて、各処理群は、3匹の動物からなった。投与の48時間後に動物を殺して、オリゴヌクレオチドの肝臓における分布を決定した。1細胞あたりのアンチセンスオリゴヌクレオチド分子の数を測定するために、ルテニウム（II）トリス-ピリジン標識（MSD TAG, Meso Scale Discovery）を、アンチセンスオリゴヌクレオチドを検出するために用いるオリゴヌクレオチドプローブに共役させた。表113に提示される結果は、1細胞あたり100万オリゴヌクレオチド分子を1単位として表した各処理群のオリゴヌクレオチドの平均濃度である。結果は、等価用量で、GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドが、全肝臓及び肝細胞において、GalNAc共役体を含まないオリゴヌクレオチドよりも高い濃度で存在したことを示す。さらに、GalNAc共役体を含むオリゴヌクレオチドは、非実質肝臓細胞において、GalNAc共役体を含まないオリゴヌクレオチドよりも低い濃度で存在した。1細胞あたりの肝細胞及び非実質肝臓細胞におけるISIS 655861の濃度が同様であった一方で、肝臓は、約80体積%肝細胞であった。したがって、肝臓内に存在するISIS 655861オリゴヌクレオチドの大部分が肝細胞内に見られる一方で、肝臓内に存在するISIS 353382オリゴヌクレオチドの大部分は、非実質肝臓細胞内に見られた。

30

40

【 1 1 8 2】

50

【表 1 0 3】

【表 1 0 3】

表 1 1 3

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	全肝臓中の濃度(1細胞あたりの分子×10 ⁶)	肝細胞中の濃度(1細胞あたりの分子×10 ⁶)	非実質肝臓細胞中の濃度(1細胞あたりの分子×10 ⁶)
353382	3	9.7	1.2	37.2
	10	17.3	4.5	34.0
	20	23.6	6.6	65.6
	30	29.1	11.7	80.0
	60	73.4	14.8	98.0
	90	89.6	18.5	119.9
655861	0.5	2.6	2.9	3.2
	1	6.2	7.0	8.8
	3	19.1	25.1	28.5
	6	44.1	48.7	55.0
	18	76.6	82.3	77.1

10

20

実施例 1 0 3 : GalNAc₃ 共役体を含む APOC - III を標的とするオリゴヌクレオチドの生体内における作用持続時間

【 1 1 8 3】

以下の表 1 1 4 に列記されるオリゴヌクレオチドを、単回投与試験においてマウスにおける作用持続時間について試験した。

【 1 1 8 4】

【表 1 0 4】

表 1 1 4

APOC - III を標的とする修飾 ASO

30

ISIS番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
304801	A _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{es} T _{es} A _{es} T _e	該当なし	該当なし	821
663084	GalNAc ₃ -3 _a -o'-A _{do} A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _e	GalNAc ₃ -3a	A _d	837
679241	A _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{eo} T _{eo} T _{es} A _{es} T _{eo} A _{do} -GalNAc ₃ -19 _a	GalNAc ₃ -19a	A _d	822

40

【 1 1 8 5】

GalNAc₃ - 3_a の構造は、実施例 3 9 に示され、GalNAc₃ - 19_a は、実施例 7 0 に示される。

処理

【 1 1 8 6】

ヒト APOC - III を発現する雌トランスジェニックマウスのそれぞれに、表 1 1 4 に列記されるオリゴヌクレオチドまたは PBS を 1 回皮下注入した。各処理群は、3 匹の動物からなった。投薬前に血液を採取して、ベースライン、ならびに投与後 3、7、14、21、28、35、及び 42 日間のレベルを決定した。実施例 2 0 に記載されるように、

50

血漿トリグリセリド及びA P O C - I I I タンパク質レベルを測定した。表 1 1 5 における結果は、ベースラインレベルに対して標準化された各処理群の血漿トリグリセリド及びA P O C - I I I レベルの平均パーセントとして提示される。実施例 7 9 の表 7 1 における結果と以下の表 1 1 5 における結果の比較は、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部及びホスホロチオエートヌクレオシド間連結部の両方を含むオリゴヌクレオチドが、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結部のみを含む等価オリゴヌクレオチドよりも増加した作用持続時間を示したことを示す。

【 1 1 8 7 】

【表 1 0 5】

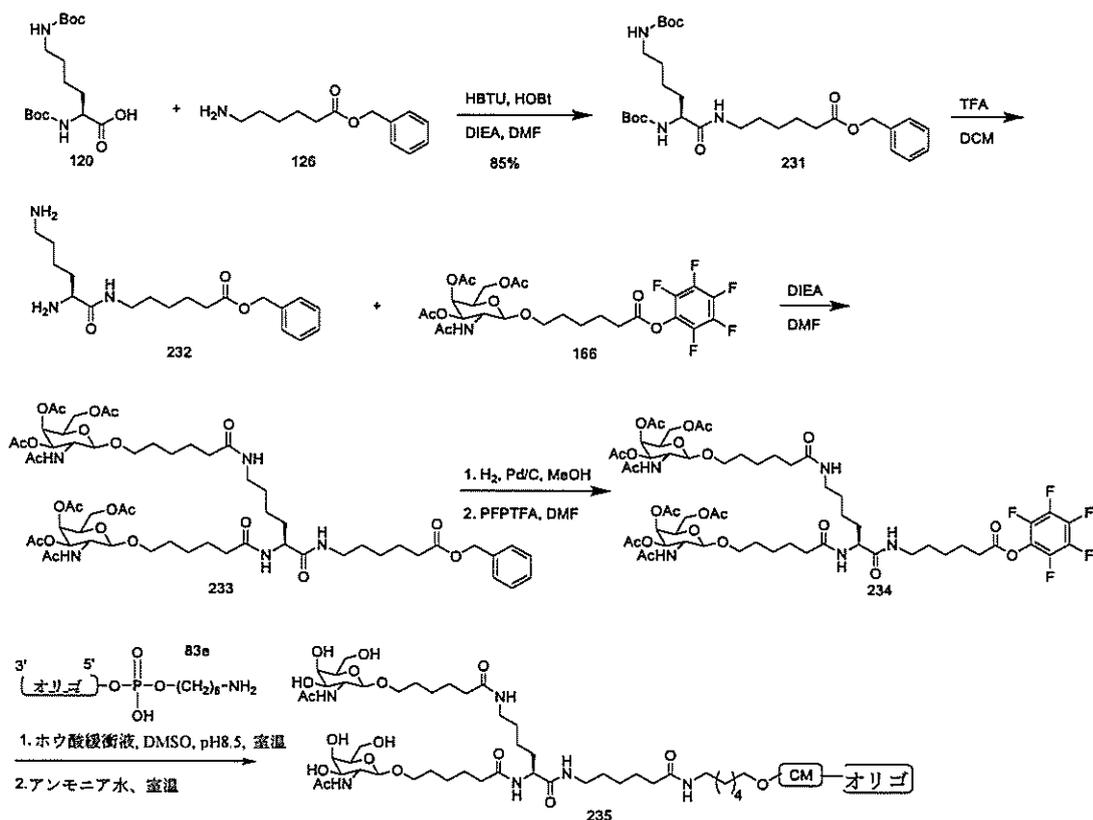
表 1 1 5

トランスジェニックマウスにおける血漿トリグリセリド及びA P O C - I I I タンパク質レベル

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	時点(投与後の日数)	トリグリセリド(%ベースライン)	APOC-III タンパク質(%ベースライン)	GalNAc ₃ クラスタ	CM
PBS	該当なし	3	96	101	該当なし	該当なし
		7	88	98		
		14	91	103		
		21	69	92		
		28	83	81		
		35	65	86		
		42	72	88		
304801	30	3	42	46	該当なし	該当なし
		7	42	51		
		14	59	69		
		21	67	81		
		28	79	76		
		35	72	95		
663084	10	3	35	28	GalNAc ₃ -3a	A _d
		7	23	24		
		14	23	26		
		21	23	29		
		28	30	22		
		35	32	36		
		42	37	47		
679241	10	3	38	30	GalNAc ₃ -19a	A _d
		7	31	28		
		14	30	22		
		21	36	34		
		28	48	34		
		35	50	45		
		42	72	64		

【 1 1 8 8 】

【 化 2 4 6 】



10

20

【 1 1 8 9 】

化合物 1 2 0 は市販されており、化合物 1 2 6 の合成は実施例 4 9 に記載されている。化合物 1 2 0 (1 g、2 . 8 9 m m o l)、H B T U (0 . 3 9 g、2 . 8 9 m m o l)、及び H O B t (1 . 6 4 g、4 . 3 3 m m o l) を、D M F (1 0 m L) 中に溶解し、N , N - ジイソプロピルエチルアミン (1 . 7 5 m L、1 0 . 1 m m o l) を添加した。約 5 分後、アミノヘキサン酸ベンジルエステル (1 . 3 6 g、3 . 4 6 m m o l) をこの反応物に添加した。3 時間後、反応混合物を 1 0 0 m L の 1 M N a H S O 4 に注ぎ、2 × 5 0 m L 酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせ、4 0 m L 飽和 N a H C O 3 で 3 回、ブラインで 2 回洗浄し、N a 2 S O 4 で乾燥させ、濾過し、濃縮した。この生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (D C M : E A : H e x = 1 : 1 : 1) によって精製して、化合物 2 3 1 を得た。L C M S 及び N M R は、その構造と一致した。化合物 2 3 1 (1 . 3 4 g、2 . 4 3 8 m m o l) をジクロロメタン (1 0 m L) 中に溶解し、トリフルオロ酢酸 (1 0 m L) を添加した。室温で 2 時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で濃縮し、トルエン (3 × 1 0 m L) と共蒸発させた。残渣を減圧下で乾燥させて、トリフルオロ酢酸塩として化合物 2 3 2 を得た。化合物 1 6 6 の合成は、実施例 5 4 に記載される。化合物 1 6 6 (3 . 3 9 g、5 . 4 0 m m o l) を D M F (3 m L) 中に溶解した。化合物 2 3 2 (1 . 3 g、2 . 2 5 m m o l) の溶液を D M F (3 m L) 中に溶解し、N , N - ジイソプロピルエチルアミン (1 . 5 5 m L) を添加した。反応物を室温で 3 0 分間攪拌し、その後、水 (8 0 m L) に注ぎ、水層を E t O A c (2 × 1 0 0 m L) で抽出した。有機相を分離し、飽和 N a H C O 3 水溶液 (3 × 8 0 m L)、1 M N a H S O 4 (3 × 8 0 m L)、及びブライン (2 × 8 0 m L) で洗浄し、その後、乾燥させ (N a 2 S O 4)、濾過し、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製して、化合物 2 3 3 を得た。L C M S 及び N M R は、その構造と一致した。化合物 2 3 3 (0 . 5 9 g、0 . 4 8 m m o l) をメタノール (2 . 2 m L) 及び酢酸エチル (2 . 2 m L) 中に溶解した。パラジウム炭素 (1 0 重量 % P d / C、湿性、0 . 0 7 g) を添加し、反

30

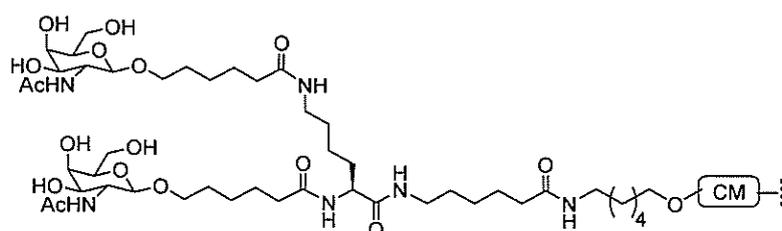
40

50

応混合物を水素雰囲気下で3時間撈拌した。セライトパッドを通して反応混合物を濾過し、濃縮して、カルボン酸を得た。カルボン酸(1.32g、1.15mmol、クラスター遊離酸)をDMF(3.2mL)中に溶解した。これに、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.3mL、1.73mmol)及びPFPTFA(0.30mL、1.73mmol)を添加した。室温で30分間撈拌した後、反応混合物を水(40mL)に注ぎ、EtOAc(2×50mL)で抽出した。上述のように標準の後処理を完了して、化合物234を得た。LCMS及びNMRは、その構造と一致した。実施例46に記載される一般的手順を用いて、オリゴヌクレオチド235を調製した。共役基GalNAc₂-24のGalNAc₂クラスター部分(GalNAc₂-24a)をオリゴヌクレオチド上に存在する任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を提供することができる。GalNAc₂-24(GalNAc₂-24a-CM)の構造は、以下に示される：

【1190】

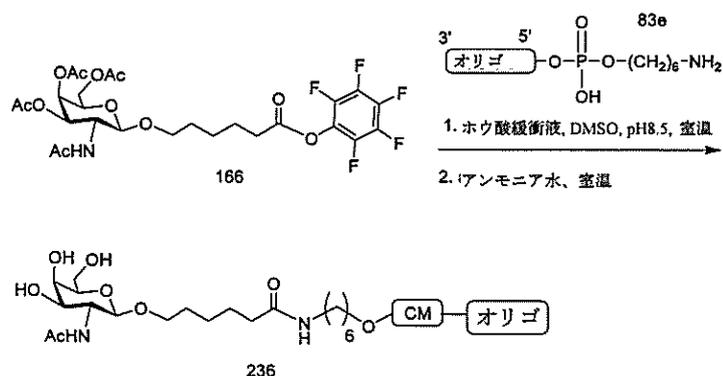
【化247】



実施例105：GalNAc₁-25共役体を含むオリゴヌクレオチドの合成

【1191】

【化248】



【1192】

化合物166の合成は、実施例54に記載される。実施例46に記載される一般の手順を用いて、オリゴヌクレオチド236を調製した。

【1193】

あるいは、以下に示されるスキームを用いてオリゴヌクレオチド236を合成し、実施例10に記載される手順を用いて、化合物238を用いてオリゴヌクレオチド236を形成した。

【1194】

10

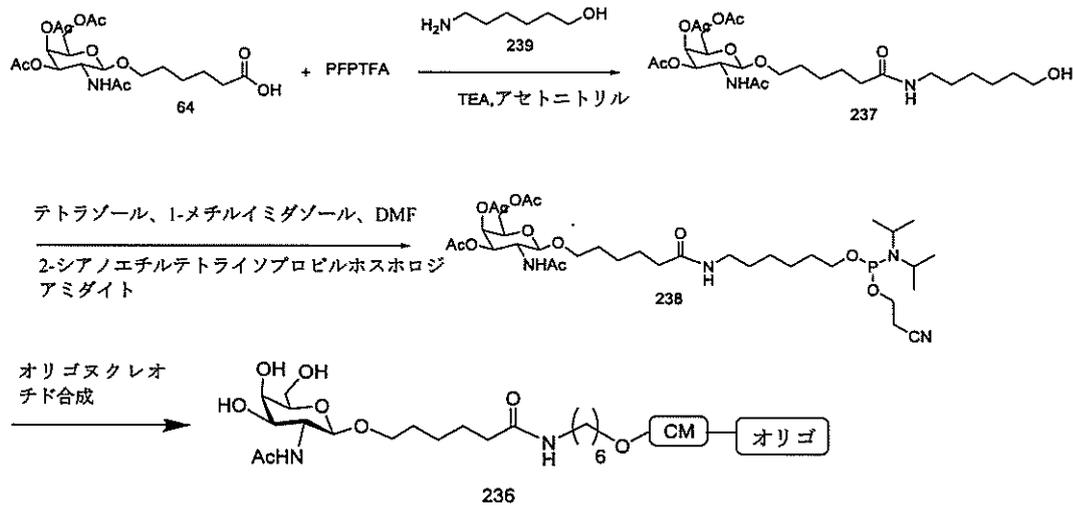
20

30

40

50

【化249】



10

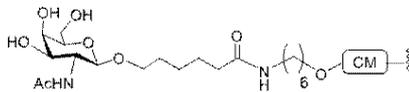
【1195】

共役基 GalNAc₁-25 の GalNAc₁ クラスター部分 (GalNAc₁-25a) をオリゴヌクレオチド上に存在する任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。GalNAc₁-25 (GalNAc₁-25a-CM) の構造は、以下に示される：

20

【1196】

【化250】



実施例106：5'-GalNAc₂または5'-GalNAc₃共役体を含むSRB-1を標的とするオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

【1197】

表116及び117に列記されるオリゴヌクレオチドを、用量依存的試験においてマウスにおけるSRB-1のアンチセンス阻害について試験した。

30

処理

【1198】

6週齢の雄C57BL/6マウス(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)に、2、7、もしくは20mg/kgのISIS番号440762；または0.2、0.6、2、6、もしくは20mg/kgのISIS番号686221、686222、もしくは708561；または生理食塩水を1回皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。最終投与の72時間後にマウスを殺した。リアルタイムPCRを用いて、肝臓におけるSRB-1 mRNAレベルを測定した。標準のプロトコルに従って、SRB-1 mRNAレベルをシクロフィリンmRNAレベルに対して標準化した。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、用量依存的様式でSRB-1 mRNAレベルを低下させ、ED₅₀結果が、表116及び117に提示される。以前の研究において、三価GalNAc共役オリゴヌクレオチドが二価GalNAc共役オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であり、これは、次いで、一価GalNAc共役オリゴヌクレオチドよりも著しく強力であったことが示されたが(例えば、Khorev et al., Bioorg. & Med. Chem., Vol. 16, 5216-5231(2008)を参照のこと)、表116及び117に示されるように、一価、二価、及び三価GalNAcクラスターを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドでの処理は、同様の力価でSRB-1 mRNAレベルを低下させた。

40

【1199】

50

【表 106】

表 116

SRB-1 を標的とする修飾オリゴヌクレオチド

ISIS 番号	配列(5'から3')	GalNAc クラスタ	ED ₅₀ (mg/kg)	配列番号
440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	該当なし	4.7	823
686221	GalNAc ₂ -24 _a -o'-A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₂ -24 _a	0.39	827
686222	GalNAc ₃ -13 _a -o'-A _{do} T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₃ -13 _a	0.41	827

10

【1200】

表の説明文については、実施例 93 を参照されたい。GalNAc₃-13_aの構造は、実施例 62 に示し、GalNAc₂-24_aの構造は、実施例 104 に示した。

【1201】

【表 107】

表 117

SRB-1 を標的とする修飾オリゴヌクレオチド

ISIS番号	配列(5'から3')	GalNAc クラスタ	ED ₅₀ (mg/kg)	配列番号
440762	T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	該当なし	5	823
708561	GalNAc ₁ -25 _a -o'-T _{ks} ^m C _{ks} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{ks} ^m C _k	GalNAc ₁ -25 _a	0.4	823

20

【1202】

表の説明文については、実施例 93 を参照されたい。GalNAc₁-25_aの構造は、実施例 105 に示した。

【1203】

実施例 75 に記載される手順を用いて、表 116 及び 117 における肝臓中のオリゴヌクレオチドの濃度も評価した。以下の表 117 a 及び 117 b に示される結果は、肝臓組織のオリゴヌクレオチド(μg)/g 単位の UV によって測定された各処理群の平均総アンチセンスオリゴヌクレオチド組織レベルである。結果は、GalNAc 共役基を含むオリゴヌクレオチドが GalNAc 共役基を欠く同一の用量のオリゴヌクレオチドよりも著しく高いレベルで肝臓に蓄積したことを示す。さらに、それらのそれぞれの共役基に 1、2、または 3 個の GalNAc リガンドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドはすべて同様のレベルで肝臓に蓄積した。上記の Khorev et al. の文献参照を考慮すると、これは意外な結果であり、上の表 116 及び 117 に示される活性データと一致する。

30

40

【1204】

50

【表 108】

表 117 a

GalNAc₂またはGalNAc₃共役基を含むオリゴヌクレオチドの肝臓中の濃度

ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	[アンチセンスオリゴヌクレオチド]($\mu\text{g/g}$)	GalNAcクラスター	CM
440762	2	2.1	該当なし	該当なし
	7	13.1		
	20	31.1		
686221	0.2	0.9	GalNAc ₂ -24 _a	A _d
	0.6	2.7		
	2	12.0		
	6	26.5		
686222	0.2	0.5	GalNAc ₃ -13 _a	A _d
	0.6	1.6		
	2	11.6		
	6	19.8		

10

20

【1205】

【表 109】

表 117 b

GalNAc₁共役基を含むオリゴヌクレオチドの肝臓中の濃度

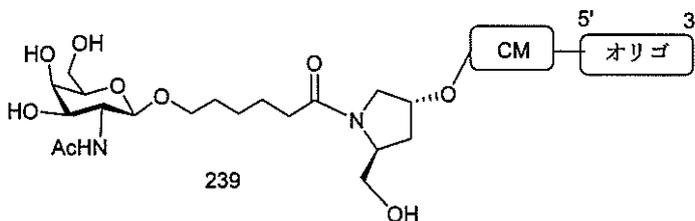
ISIS 番号	投与量 (mg/kg)	[アンチセンスオリゴヌクレオチド]($\mu\text{g/g}$)	GalNAcクラスター	CM
440762	2	2.3	該当なし	該当なし
	7	8.9		
	20	23.7		
708561	0.2	0.4	GalNAc ₁ -25 _a	PO
	0.6	1.1		
	2	5.9		
	6	23.7		
	20	53.9		

30

実施例 107 : GalNAc₁-26またはGalNAc₁-27共役体を含むオリゴヌクレオチドの合成

【1206】

【化 251】



40

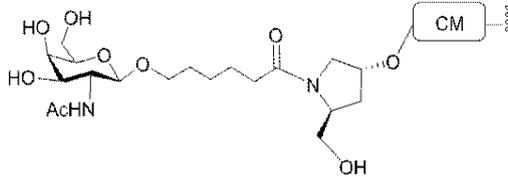
【1207】

50

DMF中HBTU及びDIEAを用いて、オリゴヌクレオチド239を化合物47（実施例15を参照のこと）と酸64（実施例32を参照のこと）とのカップリングによって合成する。結果として生じたアミド含有化合物をホスフィチル化し、その後、実施例10に記載される手順を用いて、オリゴヌクレオチドの5'末端に付加する。共役基GalNAc₁-26のGalNAc₁クラスター部分（GalNAc₁-26_a）をオリゴヌクレオチド上に存在する任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。GalNAc₁-26（GalNAc₁-26_a-CM）の構造は、以下に示される：

【1208】

【化252】



10

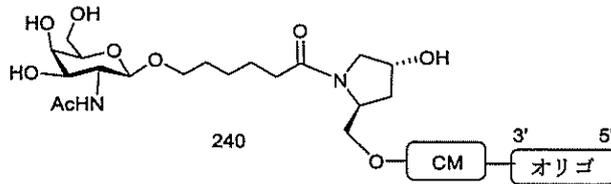
【1209】

GalNAc₁共役基をオリゴヌクレオチドの3'末端に付加するために、実施例7に記載される手順を用いて、化合物47と64の反応から形成されたアミドを固体支持体に付加する。その後、実施例9に記載される手順を用いて、オリゴヌクレオチド合成を完了して、オリゴヌクレオチド240を形成する。

20

【1210】

【化253】



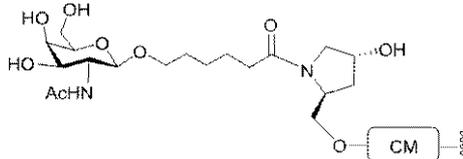
【1211】

共役基GalNAc₁-27のGalNAc₁クラスター部分（GalNAc₁-27_a）をオリゴヌクレオチド上に存在する任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。GalNAc₁-27（GalNAc₁-27_a-CM）の構造は、以下に示される：

30

【1212】

【化254】



40

実施例108：生体内におけるApo(a)を標的とするGalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドによる生体内におけるアンチセンス阻害

【1213】

以下の表118に列記されるオリゴヌクレオチドを、マウスにおける単回投与試験において試験した。

【1214】

50

【表 1 1 0】

表 1 1 8

APO (a) を標的とする修飾ASO

ISIS番号	配列(5'から3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
49437 2	T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	該当なし	該当なし	847
68125 1	GalNAc ₃ -7 _a -o'-T _{es} G _{es} ^m C _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} G _{es} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	847
68125 5	GalNAc ₃ -3 _a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -3a	PO	847
68125 6	GalNAc ₃ -10 _a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -10 a	PO	847
68125 7	GalNAc ₃ -7 _a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	847
68125 8	GalNAc ₃ -13 _a -o'-T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -13 a	PO	847
68126 0	T _{es} G _{eo} ^m C _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{ds} G _{ds} T _{ds} T _{ds} G _{ds} G _{ds} T _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} G _{eo} T _{es} T _{es} ^m C _{eo} A _{do} '-GalNAc ₃ -19	GalNAc ₃ -19 a	A _d	854

10

20

【 1 2 1 5】

GalNAc₃-7aの構造は、実施例48に示される。

処理

【 1 2 1 6】

ヒトApo(a)を発現する雄トランスジェニックマウスのそれぞれに、表119に列記されるオリゴヌクレオチド及び投与量またはPBSを1回皮下注入した。各処理群は、4匹の動物からなった。投薬の前日に血液を採取して、血漿中のApo(a)タンパク質のベースラインレベル及び第1の投与後の1週間時点のレベルを決定した。週1回約8週間、さらに血液を採取する。ELISAを用いて血漿Apo(a)タンパク質レベルを測定した。表119における結果は、ベースラインレベル(%BL)に対して標準化された各処理群の血漿Apo(a)タンパク質レベルの平均パーセントとして提示され、結果は、アンチセンスオリゴヌクレオチドがApo(a)タンパク質の発現を低下させたことを示す。さらに、GalNAc共役基を含むオリゴヌクレオチドは、共役基を含まないオリゴヌクレオチドよりもさらに強力なApo(a)発現の減少を示した。

30

【 1 2 1 7】

40

50

【表 1 1 1】

表 1 1 9

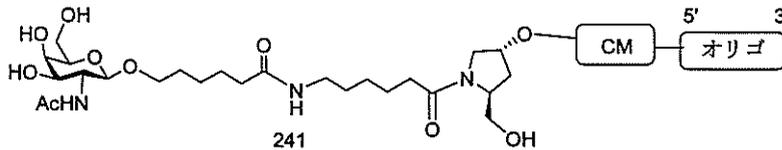
Apo (a) 血漿タンパク質レベル

ISIS番号	投与量 (mg/kg)	1週間時点での Apo(a) (%BL)
PBS	該当なし	143
494372	50	58
681251	10	15
681255	10	14
681256	10	17
681257	10	24
681258	10	22
681260	10	26

実施例 109 : GalNAc₁-28 または GalNAc₁-29 共役体を含むオリゴヌクレオチドの合成

【 1 2 1 8 】

【 化 2 5 5 】

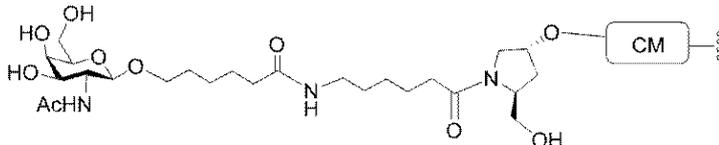


【 1 2 1 9 】

オリゴヌクレオチド 241 を実施例 71 に記載される手順と同様の手順を用いて合成して、ホスホラミダイト中間体を形成し、続いて、実施例 10 に記載される手順を用いてオリゴヌクレオチドを合成する。共役基 GalNAc₁-28 の GalNAc₁ クラスター部分 (GalNAc₁-28_a) をオリゴヌクレオチド上に存在する任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。GalNAc₁-28 (GalNAc₁-28_a-CM) の構造は、以下に示される：

【 1 2 2 0 】

【 化 2 5 6 】



【 1 2 2 1 】

GalNAc₁ 共役基をオリゴヌクレオチドの 3' 末端に付加するために、実施例 71 に記載される手順と同様の手順を用いてヒドロキシル中間体を形成し、その後、実施例 7 に記載される手順を用いてこれを固体支持体に付加する。その後、実施例 9 に記載される手順を用いてオリゴヌクレオチド合成を完了させて、オリゴヌクレオチド 242 を形成する。

【 1 2 2 2 】

10

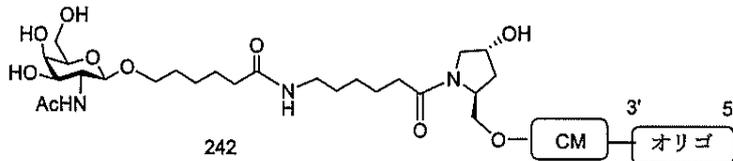
20

30

40

50

【化257】



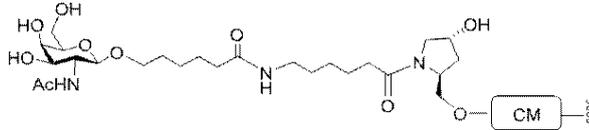
【1223】

共役基 GalNAc₁-29 の GalNAc₁ クラスター部分 (GalNAc₁-29a) をオリゴヌクレオチド上に存在する任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。GalNAc₁-29 (GalNAc₁-29a-CM) の構造は、以下に示される：

10

【1224】

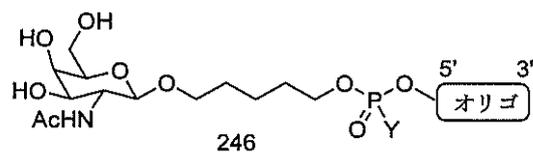
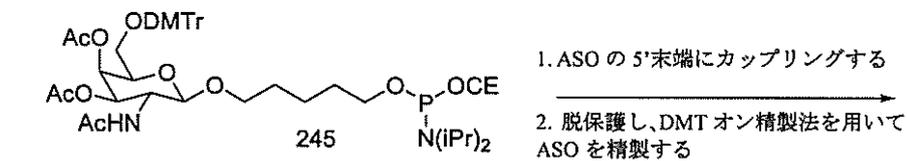
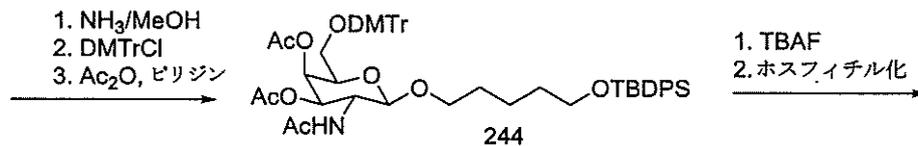
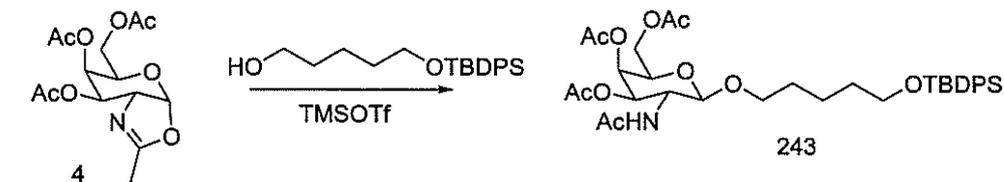
【化258】



実施例 110 : GalNAc₁-30 共役体を含むオリゴヌクレオチドの合成

【1225】

【化259】



【1226】

GalNAc₁-30 共役体を含むオリゴヌクレオチド 246 (式中、Y が、O、S、置換もしくは無置換 C₁~C₁₀ アルキル、アミノ、置換アミノ、アジド、アルケニル、またはアルキニルから選択される) を上に示されるように合成する。共役基 GalNAc₁-30 の GalNAc₁ クラスター部分 (GalNAc₁-30a) を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、Y は、切断可能部分の一部である。特定の実施形態において、Y は、安定した部分の一部であり、切断可能部分は、オリゴヌクレオチド上に存在する。GalNAc₁-30a の構

20

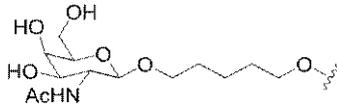
40

50

造は、以下に示される：

【 1 2 2 7 】

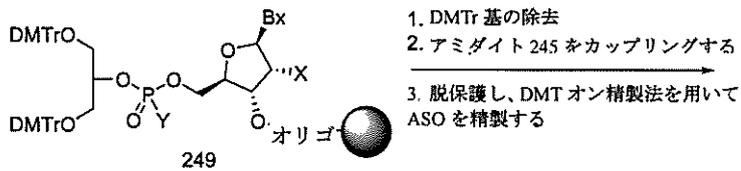
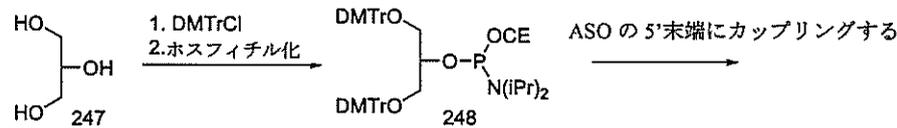
【 化 2 6 0 】



実施例 1 1 1 : G a l N A c 2 - 3 1 または G a l N A c 2 - 3 2 共役体を含むオリゴヌクレオチドの合成

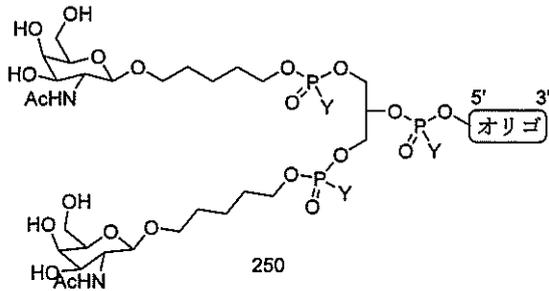
【 1 2 2 8 】

【 化 2 6 1 】



【 1 2 2 9 】

【 化 2 6 2 】



【 1 2 3 0 】

G a l N A c 2 - 3 1 共役基を含むオリゴヌクレオチド 2 5 0 (式中、 Y が、 O、 S、 置換もしくは無置換 C₁ ~ C₁₀ アルキル、 アミノ、 置換アミノ、 アジド、 アルケニル、 またはアルキニルから選択される) を上に示されるように合成する。共役基 G a l N A c 2 - 3 1 の G a l N A c 2 クラスター部分 (G a l N A c 2 - 3 1 a) を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドの 5' 末端に直接隣接した Y 含有基は、切断可能部分の一部である。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドの 5' 末端に直接隣接した Y 含有基は、安定した部分の一部であり、切断可能部分は、オリゴヌクレオチド上に存在する。 G a l N A c 2 - 3 1 a の構造は、以下に示される：

【 1 2 3 1 】

10

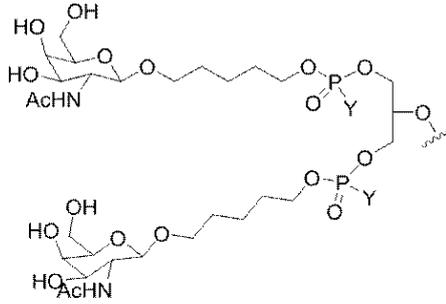
20

30

40

50

【化263】



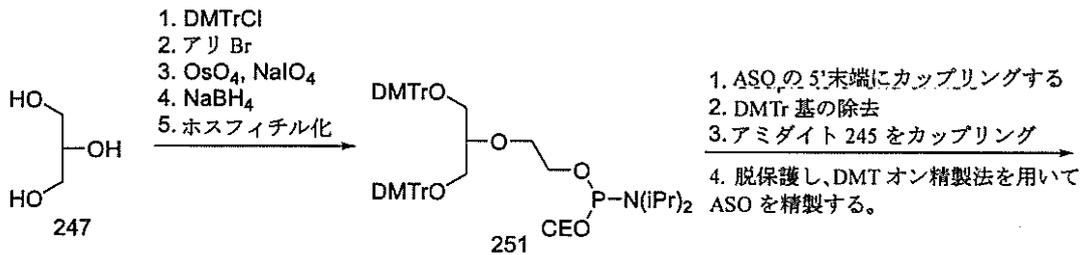
10

【1232】

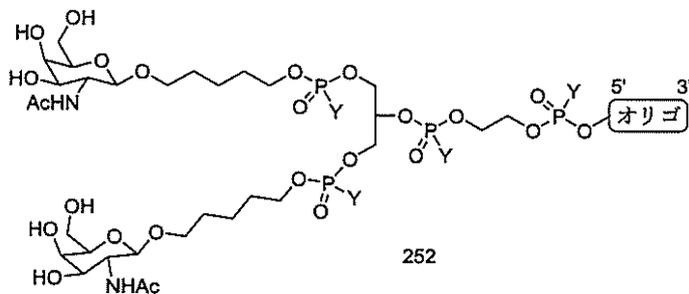
GalNAc₂-32 共役体を含むオリゴヌクレオチドの合成は、以下に示される。

【1233】

【化264】



20



30

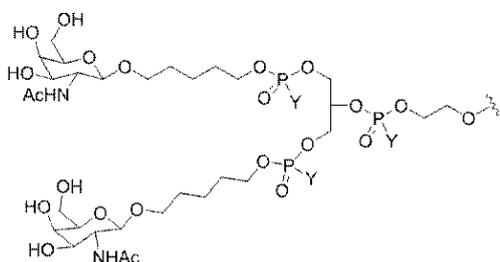
【1234】

GalNAc₂-32 共役基を含むオリゴヌクレオチド252（式中、Yが、O、S、置換もしくは無置換C₁~C₁₀アルキル、アミノ、置換アミノ、アジド、アルケニル、またはアルキニルから選択される）を上に表示されるように合成する。共役基GalNAc₂-32のGalNAc₂クラスター部分（GalNAc₂-32a）を任意の切断可能部分と組み合わせて、さまざまな共役基を得ることができる。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドの5'末端に直接隣接したY含有基は、切断可能部分の一部である。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドの5'末端に直接隣接したY含有基は、安定した部分の一部であり、切断可能部分は、オリゴヌクレオチド上に存在する。GalNAc₂-32aの構造は、以下に示される：

40

【1235】

【化265】



50

実施例 112 : GalNAc₁ 共役体を含む修飾オリゴヌクレオチド

【 1 2 3 6 】

SRB-1 を標的とする表 120 のオリゴヌクレオチドを GalNAc₁ 共役基で合成して、GalNAc₁ リガンドを含有する共役基を含むオリゴヌクレオチドの力価をさらに試験した。

【 1 2 3 7 】

【 表 1 1 2 - 1 】

表 1 2 0

ISIS 番号	配列(5'から3')	GalNAc クラスター	CM	配列番号
711461	GalNAc ₁ -25 _{a-o} .A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -25 _a	A _d	831
711462	GalNAc ₁ -25 _{a-o} .G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -25 _a	PO	829
711463	GalNAc ₁ -25 _{a-o} .G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -25 _a	PO	829
711465	GalNAc ₁ -26 _{a-o} .A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -26 _a	A _d	831
711466	GalNAc ₁ -26 _{a-o} .G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -26 _a	PO	829
711467	GalNAc ₁ -26 _{a-o} .G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -26 _a	PO	829
711468	GalNAc ₁ -28 _{a-o} .A _{do} G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -28 _a	A _d	831
711469	GalNAc ₁ -28 _{a-o} .G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -28 _a	PO	829
711470	GalNAc ₁ -28 _{a-o} .G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _e	GalNAc ₁ -28 _a	PO	829
713844	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} .GalNAc ₁ -27 _a	GalNAc ₁ -27 _a	PO	829
713845	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} .GalNAc ₁ -27 _a	GalNAc ₁ -27 _a	PO	829
713846	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} .GalNAc ₁ -27 _a	GalNAc ₁ -27 _a	A _d	830
713847	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} .GalNAc ₁ -29 _a	GalNAc ₁ -29 _a	PO	829
713848	G _{es} ^m C _{eo} T _{eo} T _{eo} ^m C _{eo} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{eo} ^m C _{eo} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} .GalNAc ₁ -29 _a	GalNAc ₁ -29 _a	PO	829
713849	G _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{es} ^m C _{es} A _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{ds} A _{ds} T _{ds} G _{ds} A _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} T _{es} T _{eo} A _{do} .GalNAc ₁ -29 _a	GalNAc ₁ -29 _a	A _d	830

【 1 2 3 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 2 - 2】

713850	$G_{es}^m C_{eo} T_{eo} T_{eo}^m C_{eo} A_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{ds} A_{ds} T_{ds}$ $G_{ds} A_{ds}^m C_{ds} T_{ds} T_{eo}^m C_{eo}^m C_{es} T_{es} T_{eo}$ $A_{do} \cdot GalNAc_1-29_a$	GalNAc ₁ -29 _a	A _d	830
--------	--	--------------------------------------	----------------	-----

【 1 2 3 9】

実施例 1 1 3 : C F B を標的とするオリゴヌクレオチドによるインビボでのアンチセンス阻害

10

表 1 2 1 に列挙するオリゴヌクレオチドを、マウスにおけるヒト補体 B 因子 (C F B) のアンチセンス阻害について、用量依存的試験で調べた。

【 1 2 4 0】

【表 1 1 3】

表 1 2 1 : C F B を標的とする修飾 A S O

ISIS 番号	配列(5'→3')	GalNAc ₃ クラスタ	CM	配列番号
588540	$A_{es} T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_{es} A_{ds}^m C_{ds} G_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds}^m$ $C_{ds}^m C_{ds} T_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{es}^m C_{es} A_{es} G_{es}^m C_e$	該当なし	該当なし	440
687301	$GalNAc_3-3_a \cdot A_{es} T_{es}^m C_{es}^m C_{es}^m C_{es} A_{ds}^m C_{ds}$ $G_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds} T_{ds} G_{ds} T_{ds}^m C_{es}$ $^m C_{es} A_{es} G_{es}^m C_e$	GalNAc ₃ -3a	PO	440

20

GalNAc₃-3a の構造は上記実施例 3 9 で示した。

30

【 1 2 4 1】

処置

ヒト C F B を発現するトランスジェニックマウス (Jackson Laboratory , メイン州バーハーバー) に、表 1 2 2 に列挙するオリゴヌクレオチドまたは生理食塩水を週に 1 回、3 週にわたって皮下注射した (合計 4 回) 。 ISIS 番号 5 8 8 5 4 0 を投与した 4 つの処置群には、1 回あたり 6、12、25、または 50 mg / kg を与えた。 ISIS 番号 6 8 7 3 0 1 を投与した 4 つの処置群には、1 回あたり 0.25、0.5、2、または 6 mg / kg を与えた。各処置群は 4 匹からなった。最後の投与の 2 日後にマウスを殺し、肝臓及び腎臓のヒト C F B 及びシクロフィリン mRNA レベルを、リアルタイム PCR を用いて標準的のプロトコルに従って決定した。 C F B mRNA レベルをシクロフィリンレベルに対して標準化し、各処置群の平均を使って、ヒト C F B 転写産物発現の 50 % 阻害を達成する用量 (E D 5 0) を決定した。結果は、2 つの異なるプライマープロベセットを使って実施した 4 回の実験の平均であり、これを表 1 2 2 に示す。

40

【 1 2 4 2】

50

【表 1 1 4】

表 1 2 2 : ヒト C F B を標的とするオリゴヌクレオチドのインビボでの力価

ISIS番号	肝臓における ED ₅₀ (mg/kg)	腎臓における ED ₅₀ (mg/kg)	GalNAc ₃ クラスター	CM
588540	7.9	11.7	該当なし	該当なし
687301	0.49	0.35	GalNAc ₃ -3a	PO

【 1 2 4 3】

血清中の肝臓トランスアミナーゼレベル、アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T) 及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T) を、標準的プロトコルを使って、生理食塩水注射マウスとの比較で相対的に測定した。総ビリルビン、B U N、及び体重も評価した。その結果から、どの処置群にも生理食塩水処置群との比較で有意な変化がないことがわかった (データ省略) 。これは、どちらのオリゴヌクレオチドも耐容性が非常に高かったことを示している。

10

【 1 2 4 4】

実施例 1 1 4 : C F B を標的とするオリゴヌクレオチドによるインビボでのアンチセンス阻害

表 1 2 3 に列挙するオリゴヌクレオチドを、マウスにおけるヒト C F B のアンチセンス阻害について、用量依存的試験で調べた。

20

【 1 2 4 5】

処置

ヒト C F B を発現するトランスジェニックマウス (J a c k s o n L a b o r a t o r y , メイン州バーハーバー) に、0 . 6、1、6、または 1 8 m g / k g の表 1 2 3 に列挙したオリゴヌクレオチドまたは生理食塩水を 1 回皮下注射した。各処置群は 4 匹または 5 匹からなった。この投薬の 7 2 時間後にマウスを 殺し、肝臓のヒト C F B 及びシクロフィリン m R N A レベルを、リアルタイム P C R を用いて標準的プロトコルに従って決定した。C F B m R N A レベルをシクロフィリンレベルに対して標準化し、各処置群の平均を使って、ヒト C F B 転写産物発現の 5 0 % 阻害を達成する用量 (E D 5 0) を決定した。結果を表 1 2 3 に示す。

30

【 1 2 4 6】

40

50

【表 1 1 5】

表 1 2 3 : C F B を 標 的 と す る 修 飾 A S O

ISIS 番号	配列(5'→3')	GalNAc ₃ クラスター	CM	肝臓における ED ₅₀ (mg/kg)	配列 番号
696844	GalNAc ₃ -7 _a -o'-A _{es} T _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{es} ^m C _{es} A _{es} G _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	0.86	440
696845	GalNAc ₃ -7 _a -o'-A _{es} T _{co} ^m C _{co} ^m C _{co} ^m C _{co} A _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{co} ^m C _{co} A _{es} G _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	0.71	440
698969	GalNAc ₃ -7 _a -o'-A _{es} T _{co} ^m C _{co} ^m C _{co} ^m C _{es} A _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{co} ^m C _{co} A _{es} G _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	0.51	440
698970	GalNAc ₃ -7 _a -o'-A _{es} T _{es} ^m C _{co} ^m C _{co} ^m C _{co} A _{ds} ^m C _{ds} G _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} ^m C _{ds} T _{ds} G _{ds} T _{ds} ^m C _{co} ^m C _{co} A _{es} G _{es} ^m C _e	GalNAc ₃ -7a	PO	0.55	440

10

20

30

GalNAc₃-7aの構造は上記実施例48で示した。

40

【 1 2 4 7】

実施例 1 1 5 : M O E ギ ャ ッ プ マ ー に よ る H e p G 2 細 胞 に お け る ヒ ト 補 体 B 因 子 (C F B) の ア ン チ セ ン ス 阻 害

ヒト補体B因子(CFB)核酸を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、CFB mRNAに対するそれらの効果をインピトロで試験した。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、培養条件が類似する一連の実験で試験した。各実験に関する結果を以下に示す別々の表に掲載する。1ウェルあたり20,000細胞の密度の培養HepG2細胞を、エレクトロポレーションにより、4,500nMアンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。約24時間の処理期間後に、細胞からRNAを単離し、定量リアルタイムPCRによってCFB mRNAレベルを測定した。ヒトプライマープローブセ

50

ットRTS3459(フォワード配列AGTCTCTGTGGCATGGTTTGG,本明細書では配列番号810と呼ぶ;リバーズ配列GGGCGAATGACTGAGATCTTG,本明細書では配列番号811と呼ぶ;プローブ配列TACCGATTACCA CAAGCAACCATGGCA,本明細書では配列番号812と呼ぶ)を使ってmRNAレベルを測定した。RIBOGREEN(登録商標)によって測定される全RNA含有量に従ってCFB mRNAレベルを調整した。結果を、無処理対照細胞との比較で、CFBの阻害パーセントとして表す。

【1248】

以下の表に示す新設計のキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'-10'-5MOEギャップマーとして設計された。これらの5'-10'-5MOEギャップマーは20ヌクレオシド長であり、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で構成され、5'側と3'側にそれぞれ5個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5'ウイングセグメント中の各ヌクレオシドと3'ウイングセグメント中の各ヌクレオシドは2'-MOE修飾を有する。ヌクレオシド間連結部は、各ギャップマーの全体を通して、ホスホロチオエート(P=S)連結部である。シトシン残基は、各ギャップマーの全体を通してすべて、5-メチルシトシンである。「開始部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も5'側のヌクレオシドを示す。「終止部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も3'側のヌクレオシドを示す。以下の表に示す各ギャップマーは、本明細書において配列番号1と呼ぶヒトCFB mRNA(GENBANKアクセッション番号NM_001710.5)もしくは本明細書において配列番号2と呼ぶヒトCFBゲノム配列(ヌクレオチド31852000から31861000までを切り出したGENBANKアクセッション番号NT_007592.15)、またはその両方を標的とする。「n/a」は、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドが当該特定遺伝子配列を100%の相補性では標的としないことを示す。

【1249】

10

20

30

40

50

【表 1 1 6 - 1】

表 1 2 4 : 配列番号 1 及び配列番号 2 を標的とする 5 - 1 0 - 5 MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	標的領域	配列	% 阻害	配列番号 2 開始部位	配列番号 2 終止部位	配列番号
532608	20	39	エクソン 1	GCTGAGCTGCCAGTCAAGGA	36	1741	1760	6
532609	26	45	エクソン 1	GGCCCCGCTGAGCTGCCAGT	16	1747	1766	7
532610	45	64	エクソン 1	CGGAACATCCAAGCGGGAGG	11	1766	1785	8
532611	51	70	エクソン 1	CTTTCCCGGAACATCCAAGC	26	1772	1791	9
532612	100	119	エクソン 1	ATCTGTGTTCTGGCACCTGC	25	1821	1840	10
532613	148	167	エクソン 1	GTCACATTCCCTTCCCCTGC	39	1869	1888	11
532614	154	173	エクソン 1	GACCTGGTACATTCCTTC	71	1875	1894	12
532615	160	179	エクソン 1	GACCTAGACCTGGTCACATT	35	1881	1900	13
532616	166	185	エクソン 1	ACTCCAGACCTAGACCTGGT	39	1887	1906	14
532617	172	191	エクソン 1	GCTGAAACTCCAGACCTAGA	27	1893	1912	15
532618	178	197	エクソン 1	GTCCAAGCTGAAACTCCAGA	29	1899	1918	16
532619	184	203	エクソン 1	CTCAGTGTCCAAGCTGAAAC	21	1905	1924	17
532620	246	265	エクソン 1	AGGAGAGAAGCTGGGCTGG	31	1967	1986	18
532621	252	271	エクソン 1	GAAGGCAGGAGAGAAGCTGG	25	1973	1992	19
532622	336	355	エクソン 1 -2 接合部	GTGGTGGTCACACCTCCAGA	28	n/a	n/a	20
532623	381	400	エクソン 2	CCCTCCAGAGAGCAGGATCC	22	2189	2208	21
532624	387	406	エクソン 2	TCTACCCCCTCCAGAGAGCA	37	2195	2214	22
532625	393	412	エクソン 2	TTGATCTTACCCCCTCCAG	30	2201	2220	23
532626	417	436	エクソン 2	TGGAGAAGTCGGAAGGAGCC	35	2225	2244	24
532627	423	442	エクソン 2	CCCTCTTGAGAAGTCGGAA	37	2231	2250	25
532628	429	448	エクソン 2	GCCTGGCCCTCTTGAGAAG	0	2237	2256	26
532629	435	454	エクソン 2	TCCAGTGCCTGGCCCTCTTG	26	2243	2262	27
532630	458	477	エクソン 2	AGAAGCCAGAAGGACACACG	30	2266	2285	28
532631	464	483	エクソン 2	ACGGGTAGAAGCCAGAAGGA	43	2272	2291	29
532632	480	499	エクソン 2	CGTGTCTGCACAGGGTACGG	57	2288	2307	30
532633	513	532	エクソン 2	AGGGTGCTCCAGGACCCCGT	27	2321	2340	31
532634	560	579	エクソン 2 -3 接合部	TTGCTCTGCACTCTGCCTTC	41	n/a	n/a	32
532635	600	619	エクソン 3	TATCCCCGTTCTCGAAGTC	67	2808	2827	33
532636	626	645	エクソン 3	CATTGTAGTAGGGAGACCGG	24	2834	2853	34
532637	632	651	エクソン 3	CACTCACATTGTAGTAGGGA	49	2840	2859	35

【 1 2 5 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 6 - 2】

532638	638	657	エクソン 3	TCTCATCACTCACATTGTAG	50	2846	2865	36
532639	644	663	エクソン 3	AAGAGATCTCATCACTCACA	52	2852	2871	37
532640	650	669	エクソン 3	AGTGGAAGAGATCTCATCA	34	2858	2877	38
532641	656	675	エクソン 3	CATAGCAGTGGAAAGAGATC	32	2864	2883	39
532642	662	681	エクソン 3	AACCGTCATAGCAGTGGAAA	45	2870	2889	40
532643	668	687	エクソン 3	GAGTGTAACCGTCATAGCAG	36	2876	2895	41
532644	674	693	エクソン 3	CCCGGAGAGTGTAACCGTCA	30	2882	2901	42
532645	680	699	エクソン 3	CAGAGCCCCGGAGAGTGTA	27	2888	2907	43
532646	686	705	エクソン 3	GATTGGCAGAGCCCCGGAGA	20	2894	2913	44
532647	692	711	エクソン 3	AGGTGCGATTGGCAGAGCCC	28	2900	2919	45
532648	698	717	エクソン 3	CTTGGCAGGTGCGATTGGCA	24	2906	2925	46
532649	704	723	エクソン 3	CATCACTTGGCAGGTGCGA	28	2912	2931	47
532650	729	748	エクソン 3	ATCGTGTCTGCCACTCCA	44	2937	2956	48
532651	735	754	エクソン 3	TCACAGATCGCTGTCTGCC	44	2943	2962	49
532652	741	760	エクソン 3	CCGTTGTCACAGATCGCTGT	27	2949	2968	50
532653	747	766	エクソン 3 -4 接合部	CCCCTCCGTTGTCACAGAT	28	n/a	n/a	51
532654	753	772	エクソン 3 -4 接合部	CAGTACCCCGCTCCGTTGTC	13	n/a	n/a	52
532655	759	778	エクソン 3 -4 接合部	TTGGAGCAGTACCCCGCTCC	8	n/a	n/a	53
532656	789	808	エクソン 4	ACCTTCCTTGTGCCAATGGG	40	3152	3171	54
532657	795	814	エクソン 4	CTGCCACCTTCCTTGTGCC	41	3158	3177	55
532658	818	837	エクソン 4	CGTGTCTTCAAGGCGGTAC	33	3181	3200	56
532659	835	854	エクソン 4	GCTGCAGTGGTAGGTGACGC	32	3198	3217	57
532660	841	860	エクソン 4	CCCCGGCTGCAGTGGTAGG	17	3204	3223	58
532661	847	866	エクソン 4	GGTAAGCCCCGGCTGCAGT	28	3210	3229	59
532662	853	872	エクソン 4	ACGCAGGGTAAGCCCCGGC	13	3216	3235	60
532663	859	878	エクソン 4	GGAGCCACGCAGGGTAAGCC	33	3222	3241	61
532664	866	885	エクソン 4	GCCGCTGGGAGCCACGCAGG	10	3229	3248	62
532665	891	910	エクソン 4	CAAGAGCCACCTTCCTGACA	17	3254	3273	63
532666	897	916	エクソン 4	CCGCTCCAAGAGCCACCTTC	25	3260	3279	64
532667	903	922	エクソン 4	TCCGTCCTCCGCTCCAAGAGCC	29	3266	3285	65
532668	909	928	エクソン 4	GAAGGCTCCGTCCTCCGCTCCA	14	3272	3291	66
532669	915	934	エクソン 4	TGGCAGGAAGGCTCCGTCCTCC	18	3278	3297	67
532670	921	940	エクソン 4 -5 接合部	GAGTCTTGGCAGGAAGGCTC	20	n/a	n/a	68

10

20

30

40

【 1 2 5 1 】

50

【表 1 1 6 - 3】

532671	927	946	エクソン 4 -5 接合部	ATGAAGGAGTCTTGGCAGGA	14	n/a	n/a	69
532672	956	975	エクソン 5	CTTCGGCCACCTCTTGAGGG	45	3539	3558	70
532673	962	981	エクソン 5	GGAAAGCTTCGGCCACCTCT	37	3545	3564	71
532674	968	987	エクソン 5	AAGACAGGAAAGCTTCGGCC	28	3551	3570	72
532675	974	993	エクソン 5	TCAGGGAAGACAGGAAAGCT	16	3557	3576	73
532676	996	1015	エクソン 5	TCGACTCCTTCTATGGTCTC	31	3579	3598	74
532677	1033	1052	エクソン 5 -6 接合部	CTTCTGTTGTTCCCCTGGGC	36	n/a	n/a	75
532678	1068	1087	エクソン 6	TTCATGGAGCCTGAAGGGTC	19	3752	3771	76
532679	1074	1093	エクソン 6	TAGATGTTTCATGGAGCCTGA	24	3758	3777	77
532680	1080	1099	エクソン 6	ACCAGGTAGATGTTTCATGGA	13	3764	3783	78
532681	1086	1105	エクソン 6	TCTAGCACCAGGTAGATGTT	20	3770	3789	79
532682	1092	1111	エクソン 6	GATCCATCTAGCACCAGGTA	33	3776	3795	80
532683	1098	1117	エクソン 6	CTGTCTGATCCATCTAGCAC	44	3782	3801	81
532684	1104	1123	エクソン 6	CCAATGCTGTCTGATCCATC	29	3788	3807	82
532685	1129	1148	エクソン 6	TTGGCTCCTGTGAAGTTGC	40	3813	3832	83

10

20

【 1 2 5 2 】

30

40

50

【表 1 1 7 - 1】

表 1 2 5 : 配列番号 1 及び配列番号 2 を標的とする 5 - 1 0 - 5 MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	標的領域	配列	% 阻害	配列番号 2 開始部位	配列番号 2 終止部位	配列番号
532686	1135	1154	エクソン 6	ACACTTTTTGGCTCCTGTGA	91	3819	3838	84
532687	1141	1160	エクソン 6	GACTAGACACTTTTTGGCTC	77	3825	3844	85
532688	1147	1166	エクソン 6	TAAGTTGACTAGACACTTTT	70	3831	3850	86
532689	1153	1172	エクソン 6	CTCAATTAAGTTGACTAGAC	61	3837	3856	87
532690	1159	1178	エクソン 6 -7 接合部	CACCTTCTCAATTAAGTTGA	57	3843	3862	88
532691	1165	1184	エクソン 6 -7 接合部	ACTTGCCACCTTCTCAATTA	56	n/a	n/a	89
532692	1171	1190	エクソン 6 -7 接合部	ACCATAACTTGCCACCTTCT	56	n/a	n/a	90
532693	1177	1196	エクソン 7	CTTCACACCATAACTTGCCA	56	4153	4172	91
532694	1183	1202	エクソン 7	TCTTGCTTCACACCATAAC	55	4159	4178	92
532695	1208	1227	エクソン 7	ATGTGGCATATGTCCTAGTA	55	4184	4203	93
532696	1235	1254	エクソン 7	CAGACACTTTGACCCAAATT	55	4211	4230	94
532697	1298	1317	エクソン 7 -8 接合部	GGTCTTCATAATTGATTCA	53	n/a	n/a	95
532698	1304	1323	エクソン 7 -8 接合部	ACTTGTGGTCTTCATAATTG	53	n/a	n/a	96
532699	1310	1329	エクソン 7 -8 接合部	ACTTCAACTTGTGGTCTTCA	52	n/a	n/a	97
532700	1316	1335	エクソン 8	TCCCTGACTTCAACTTGTGG	52	4609	4628	98
532701	1322	1341	エクソン 8	TGTTAGTCCCTGACTTCAAC	52	4615	4634	99
532702	1328	1347	エクソン 8	TCTTGGTGTAGTCCCTGAC	51	4621	4640	100
532703	1349	1368	エクソン 8	TGTACACTGCCTGGAGGGCC	51	4642	4661	101
532704	1355	1374	エクソン 8	TCATGCTGTACACTGCCTGG	51	4648	4667	102
532705	1393	1412	エクソン 8	GTTCCAGCCTTCAGGAGGGA	50	4686	4705	103
532706	1399	1418	エクソン 8	GGTGC GGTTCCAGCCTCAG	50	4692	4711	104
532707	1405	1424	エクソン 8	ATGGCGGGTGC GGTTCCAGC	50	4698	4717	105
532708	1411	1430	エクソン 8	GATGACATGGCGGGTGC GGTT	49	4704	4723	106
532709	1417	1436	エクソン 8	GAGGATGATGACATGGCGGG	49	4710	4729	107
532710	1443	1462	エクソン 8 -9 接合部	CCCATGTTGTGCAATCCATC	48	n/a	n/a	108

【 1 2 5 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 7 - 2】

532711	1449	1468	エクソン9	TCCCCGCCCATGTTGTGCAA	48	5023	5042	109
532712	1455	1474	エクソン9	ATTGGGTCCCCGCCCATGTT	48	5029	5048	110
532713	1461	1480	エクソン9	ACAGTAATTGGGTCCCCGCC	48	5035	5054	111
532714	1467	1486	エクソン9	TCAATGACAGTAATTGGGTC	47	5041	5060	112
532715	1473	1492	エクソン9	ATCTCATCAATGACAGTAAT	47	5047	5066	113
532716	1479	1498	エクソン9	TCCCGGATCTCATCAATGAC	46	5053	5072	114
532717	1533	1552	エクソン9 -10 接合部	ACATCCAGATAATCCTCCCT	46	n/a	n/a	115
532718	1539	1558	エクソン9 -10 接合部	ACATAGACATCCAGATAATC	46	n/a	n/a	116
532719	1545	1564	エクソン9 -10 接合部	CCAAACACATAGACATCCAG	46	n/a	n/a	117
532720	1582	1601	エクソン10	AGCATTGATGTTCACTTGGT	46	5231	5250	118
532721	1588	1607	エクソン10	AGCCAAAGCATTGATGTTCA	45	5237	5256	119
532722	1594	1613	エクソン10	CTTGAAGCCAAAGCATTGA	45	5243	5262	120
532723	1600	1619	エクソン10	GTCTTTCTTGAAGCCAAAG	45	5249	5268	121
532724	1606	1625	エクソン10	CTCATTGTCTTTCTTGAAG	44	5255	5274	122
532725	1612	1631	エクソン10	ATGTTGCTCATTGTCTTTCT	44	5261	5280	123
532726	1618	1637	エクソン10	GAACACATGTTGCTCATTGT	44	5267	5286	124
532727	1624	1643	エクソン10	GACTTTGAACACATGTTGCT	43	5273	5292	125
532728	1630	1649	エクソン10	ATCCTTGACTTTGAACACAT	43	5279	5298	126
532729	1636	1655	エクソン10	TTCCATATCCTTGACTTTGA	43	5285	5304	127
532730	1642	1661	エクソン10	CAGTTTTCCATATCCTTGA	42	5291	5310	128
532731	1686	1705	エクソン11	CTCAGAGACTGGCTTTCATC	42	5827	5846	129
532732	1692	1711	エクソン11	CAGAGACTCAGAGACTGGCT	42	5833	5852	130
516252	1698	1717	エクソン11	ATGCCACAGAGACTCAGAGA	42	5839	5858	131
532733	1704	1723	エクソン11	CAAACCATGCCACAGAGACT	41	5845	5864	132
532734	1710	1729	エクソン11	TGTTCCCAAACCATGCCACA	41	5851	5870	133
532735	1734	1753	エクソン11	TTGTGGTAATCGGTACCCTT	41	5875	5894	134
532736	1740	1759	エクソン11	GGTGTCTGTGGTAATCGGT	40	5881	5900	135
532737	1746	1765	エクソン11	TGCCATGGTTGCTTGTGGTA	40	5887	5906	136
532738	1752	1771	エクソン11	TTGGCCTGCCATGGTTGCTT	40	5893	5912	137
532739	1758	1777	エクソン11	GAGATCTTGGCCTGCCATGG	38	5899	5918	138
532740	1803	1822	エクソン12	ACAGCCCCCATAACAGCTCTC	38	6082	6101	139
532741	1809	1828	エクソン12	GACACCACAGCCCCCATAACA	38	6088	6107	140
532742	1815	1834	エクソン12	TACTCAGACACCACAGCCCC	38	6094	6113	141
532743	1821	1840	エクソン12	ACAAAGTACTCAGACACCAC	37	6100	6119	142
532744	1827	1846	エクソン12	GTCAGCACAAAGTACTCAGA	37	6106	6125	143

10

20

30

40

【 1 2 5 4 】

50

【表 1 1 7 - 3】

532745	1872	1891	エクソン 12	TTGATTGAGTGTCCTTGTC	36	6151	6170	144
532746	1878	1897	エクソン 12	CTGACCTTGATTGAGTGTC	35	6157	6176	145
532747	1909	1928	エクソン 13	TATCTCCAGGTCCCGCTTCT	35	6403	6422	146
532748	1967	1986	エクソン 13	GAATTCCTGCTTCTTTTTTC	32	6461	6480	147
532749	1973	1992	エクソン 13	ATCAGGAATTCCTGCTTCT	32	6467	6486	148
532750	1979	1998	エクソン 13	CATAAAATTCAGGAATTCCT	32	6473	6492	149
532751	1985	2004	エクソン 13	CATAGTCATAAAATTCAGGA	31	6479	6498	150
532752	2006	2025	エクソン 13	TGAGCTTGATCAGGGCAACG	30	6500	6519	151
532753	2012	2031	エクソン 13	TATCTTGAGCTTGATCAGG	30	6506	6525	152
532754	2048	2067	エクソン 13 -14 接合部	GACAAATGGGCCTGATAGTC	30	n/a	n/a	153
532755	2070	2089	エクソン 14	GTTGTTCCCTCGGTGCAGGG	29	6659	6678	154
532756	2076	2095	エクソン 14	GCTCGAGTTGTTCCCTCGGT	28	6665	6684	155
532757	2082	2101	エクソン 14	CTCAAAGCTCGAGTTGTTCC	28	6671	6690	156
532758	2088	2107	エクソン 14	GGAAGCCTCAAAGCTCGAGT	25	6677	6696	157
532759	2094	2113	エクソン 14	GTTGGAGGAAGCCTCAAAGC	23	6683	6702	158
532760	2100	2119	エクソン 14	GTGGTAGTTGGAGGAAGCCT	23	6689	6708	159
532761	2106	2125	エクソン 14	TGGCAAGTGGTAGTTGGAGG	18	6695	6714	160
532762	2112	2131	エクソン 14	TGTTGCTGGCAAGTGGTAGT	14	6701	6720	161

10

20

【 1 2 5 5 】

30

40

50

【表 1 1 8 - 1】

表 1 2 6 : 配列番号 1 及び配列番号 2 を標的とする 5 - 1 0 - 5 MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	標的領域	配列	% 阻害	配列番号 2 開始部位	配列番号 2 終止部位	配列番号
532812	n/a	n/a	エクソン 1	TCCAGCTCACTC CCCTGTTG	19	1593	1612	162
532813	n/a	n/a	エクソン 1	TAAGGATCCAG CTCACTCCC	40	1599	1618	163
532814	n/a	n/a	エクソン 1	CAGAAATAAGG ATCCAGCTC	39	1605	1624	164
532815	n/a	n/a	エクソン 1	AGGGACCAGAA ATAAGGATC	0	1611	1630	165
532816	n/a	n/a	エクソン 1	CCACTTAGGGA CCAGAAATA	27	1617	1636	166
532817	n/a	n/a	エクソン 1	TCCAGGACTCT CCCCTTCAG	39	1682	1701	167
532818	n/a	n/a	エクソン 1	AAGTCCCACCC TTTGCTGCC	15	1707	1726	168
532819	n/a	n/a	エクソン 1	CTGCAGAAGTC CCACCCTTT	26	1713	1732	169
532820	n/a	n/a	エクソン 1	CAGAAACTGCA GAAGTCCCA	8	1719	1738	170
532821	n/a	n/a	エクソン 2 -イントロン 2	AACCTCTGCAC TCTGCCTTC	39	2368	2387	171
532822	n/a	n/a	エクソン 2 -イントロン 2	CCCTCAAACCT CTGCACTCT	3	2374	2393	172
532823	n/a	n/a	エクソン 2 -イントロン 2	TCATTGCCCTCA AACCTCTG	19	2380	2399	173
532824	n/a	n/a	イントロン 2	CCCACTCATTG CCCTCAA	37	2386	2405	174
532825	n/a	n/a	イントロン 2	CACTGCCACA CTCATTGCC	23	2392	2411	175
532826	n/a	n/a	イントロン 2	TTAGGCCACTG CCCACACTC	15	2398	2417	176

【 1 2 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 8 - 2】

532827	n/a	n/a	イントロン 2	CTAGTCCTGACC TTGCTGCC	28	2436	2455	177
532828	n/a	n/a	イントロン 2	CTCATCCTAGTC CTGACCTT	25	2442	2461	178
532829	n/a	n/a	イントロン 2	CCTAGTCTCATC CTAGTCCT	23	2448	2467	179
532830	n/a	n/a	イントロン 2	ACCCTGCCTAGT CTCATCCT	30	2454	2473	180
532831	n/a	n/a	イントロン 2	CTTGTCACCCTG CCTAGTCT	34	2460	2479	181
532832	n/a	n/a	イントロン 2	GCCACCTTGTC ACCCTGCC	36	2466	2485	182
532833	n/a	n/a	イントロン 2	CCTAAAAGTGC TCCTACTCC	9	2492	2511	183
532834	n/a	n/a	イントロン 4	GAGTCAGAAAT GAGGTCAA	19	3494	3513	184
532835	n/a	n/a	イントロン 11	CCCTACTCCAT TTCACCTT	16	5971	5990	185
532836	n/a	n/a	イントロン 8-エクソン 9	TGTTGTGCAATC CTGCAGAA	25	5013	5032	186
532837	n/a	n/a	イントロン 1	AAAGGCTGATG AAGCCTGGC	18	2123	2142	187
532838	n/a	n/a	イントロン 7	CCTTTGACCAC AAAGTGGCC	21	4461	4480	188
532839	n/a	n/a	イントロン 12	AGGTACCACCT CTTTGTGGG	29	6362	6381	189
532840	n/a	n/a	イントロン 1-エクソン 2	TGGTGGTCACA CCTGAAGAG	34	2143	2162	190
532763	2133	2152	エクソン 14 -15 接合部	GCAGGGAGCAG CTCTTCCTT	40	n/a	n/a	191
532764	2139	2158	エクソン 15	TCCTGTGCAGG GAGCAGCTC	28	6927	6946	192
532765	2145	2164	エクソン 15	TTGATATCCTGT GCAGGGAG	41	6933	6952	193
532766	2151	2170	エクソン 15	AGAGCTTTGATA TCCTGTGC	36	6939	6958	194

【 1 2 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 8 - 3】

532767	2157	2176	エクソン 15	ACAAACAGAGC TTTGATATC	33	6945	6964	195
532768	2163	2182	エクソン 15	TCAGACACAAA CAGAGCTTT	41	6951	6970	196
532769	2169	2188	エクソン 15	TCCTCCTCAGAC ACAAACAG	49	6957	6976	197
532770	2193	2212	エクソン 15	ACCTCCTTCCGA GTCAGCTT	61	6981	7000	198
532771	2199	2218	エクソン 15	ATGTAGACCTCC TTCCGAGT	39	6987	7006	199
532772	2205	2224	エクソン 15	TTCTTGATGTAG ACCTCCTT	30	6993	7012	200
532773	2211	2230	エクソン 15	TCCCCATTCTTG ATGTAGAC	31	6999	7018	201
532774	2217	2236	エクソン 15 -16 接合部	TTCTTATCCCCA TTCTTGAT	36	n/a	n/a	202
532775	2223	2242	エクソン 15 -16 接合部	CTGCCTTCTTA TCCCCATT	56	n/a	n/a	203
532776	2229	2248	エクソン 15 -16 接合部	TCACAGCTGCC TTTCTTATC	33	n/a	n/a	204
532777	2235	2254	エクソン 16	TCTCTCTCACAG CTGCCTTT	38	7119	7138	205
532778	2241	2260	エクソン 16	TGAGCATCTCTC TCACAGCT	51	7125	7144	206
532779	2247	2266	エクソン 16	GCATATTGAGCA TCTCTCTC	39	7131	7150	207
532780	2267	2286	エクソン 16	TGACTTTGTCAT AGCCTGGG	56	7151	7170	208
532781	2273	2292	エクソン 16	TGTCCTTGACTT TGTCATAG	36	7157	7176	209
532782	2309	2328	エクソン 16	CAGTACAAAGG AACCGAGGG	30	7193	7212	210
532783	2315	2334	エクソン 16	CTCCTCCAGTAC AAAGGAAC	21	7199	7218	211
532784	2321	2340	エクソン 16	GACTCACTCCTC CAGTACAA	31	7205	7224	212
532785	2327	2346	エクソン 16	CATAGGGACTC ACTCCTCCA	30	7211	7230	213

10

20

30

40

【 1 2 5 8 】

50

【表 1 1 8 - 4】

532786	2333	2352	エクソン 16	GGTCAGCATAG GGACTCACT	31	7217	7236	214
532787	2352	2371	エクソン 16 -17 接合部	TCACCTCTGCA AGTATTGGG	42	7236	7255	215
532788	2358	2377	エクソン 16 -17 接合部	CCAGAATCACC TCTGCAAGT	32	n/a	n/a	216
532789	2364	2383	エクソン 16 -17 接合部	GGGCCGCCAGA ATCACCTCT	35	n/a	n/a	217
532790	2382	2401	エクソン 17	CTCTTGGA ACTATCAAGGG	33	7347	7366	218
532791	2388	2407	エクソン 17	CGACTTCTCTTG TGA ACTAT	52	7353	7372	219
532792	2394	2413	エクソン 17	ATGAAACGACT TCTCTTGTG	16	7359	7378	220
532793	2400	2419	エクソン 17 -18 接合部	ACTTGAATGAA ACGACTTCT	45	7365	7384	221
532794	2406	2425	エクソン 17 -18 接合部	ACACCAACTTG AATGAAACG	18	n/a	n/a	222
532795	2427	2446	エクソン 18	TCCACTACTCCC CAGCTGAT	30	7662	7681	223
532796	2433	2452	エクソン 18	CAGACATCCACT ACTCCCCA	38	7668	7687	224
532797	2439	2458	エクソン 18	TTTTTGCAGACA TCCACTAC	35	7674	7693	225
532798	2445	2464	エクソン 18	TTCTGGTTTTTG CAGACATC	45	7680	7699	226
532799	2451	2470	エクソン 18	TGCCGCTTCTGG TTTTTGCA	47	7686	7705	227
532800	2457	2476	エクソン 18	TGCTTTTGCCGC TTCTGGTT	61	7692	7711	228
532801	2463	2482	エクソン 18	GGTACCTGCTTT TGCCGCTT	47	7698	7717	229
532802	2469	2488	エクソン 18	TGAGCAGGTAC CTGCTTTTG	31	7704	7723	230
532803	2517	2536	エクソン 18	TTCAGCCAGGG CAGCACTTG	41	7752	7771	231
532804	2523	2542	エクソン 18	TTCTCCTTCAGC CAGGGCAG	44	7758	7777	232

10

20

30

40

【 1 2 5 9 】

50

【表 1 1 8 - 5】

532805	2529	2548	エクソン 18	TGGAGTTTCTCC TTCAGCCA	46	7764	7783	233
532806	2535	2554	エクソン 18	TCATCTTGGAGT TTCTCCTT	49	7770	7789	234
532807	2541	2560	エクソン 18	AAATCCTCATCT TGGAGTTT	30	7776	7795	235
532808	2547	2566	エクソン 18	AAACCCAAATC CTCATCTTG	20	7782	7801	236
532809	2571	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGA AACCCCTTA	65	7806	7825	237
532810	2577	2596	エクソン 18	GCCCCTGTCCA GCAGGAAAC	74	7812	7831	238
532811	2599	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAAT TCAATCCC	96	7834	7853	239

10

【 1 2 6 0 】

20

30

40

50

【表 1 1 9 - 1】

表 1 2 7 : 配列番号 1 及び配列番号 2 を標的とする 5 - 1 0 - 5 MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	標的領域	配列	配列番号 2 開始部位	配列番号 2 終止部位	% 阻害	配列番号
532841	n/a	n/a	イントロン 6-エクソン 7	AACTTGCCACCTGTGGGTGA	4142	4161	11	240
532842	n/a	n/a	エクソン 15-イントロン 15	TCACCTTATCCCCATTCTTG	7007	7026	16	241
532843	n/a	n/a	イントロン 11	TCAACTTTCACAAACCACCA	6015	6034	19	242
532844	n/a	n/a	イントロン 16-エクソン 17	CCGCCAGAATCACCTGCAAG	7326	7345	33	243
532845	n/a	n/a	イントロン 10	AGGAGGAATGAAGAAGGCTT	5431	5450	29	244
532846	n/a	n/a	イントロン 13	GCCTTTCCTCAGGGATCTGG	6561	6580	26	245
532847	n/a	n/a	イントロン 4	AAATGTCTGGGAGTGTCAGG	3477	3496	18	246
532848	n/a	n/a	イントロン 15	GCCTAGAGTGCCTCCTTAGG	7038	7057	20	247
532849	n/a	n/a	イントロン 17	GGCATCTCCCCAGATAGGAA	7396	7415	16	248
532850	n/a	n/a	イントロン 6	AGGGAGCTAGTCCTGGAAGA	3906	3925	14	249
532851	n/a	n/a	イントロン 1-エクソン 2	ACACCTGAAGAGAAAGGCTG	2135	2154	6	250
532852	n/a	n/a	イントロン 7	CCCTTTGACCACAAAGTGGC	4462	4481	25	251
532853	n/a	n/a	イントロン 7	GCCCTCAAGGTAGTCTCATG	4354	4373	26	252
532854	n/a	n/a	イントロン 6	AAGGGAAGGAGGACAGAATA	3977	3996	18	253
532855	n/a	n/a	イントロン 1	AAAGGCCAAGGAGGGATGCT	2099	2118	9	254
532856	n/a	n/a	エクソン 8-イントロン 8	AGAGGTCCCTTCTGACCATC	4736	4755	4	255
532857	n/a	n/a	イントロン 8	GCTGGGACAGGAGAGAGGTC	4749	4768	0	256
532858	n/a	n/a	イントロン 4	TCAAATGTCTGGGAGTGTC	3479	3498	13	257
532859	n/a	n/a	イントロン 10	AGAAGGAGAATGTGCTGAAA	5801	5820	20	258

【 1 2 6 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 1 9 - 2】

532860	n/a	n/a	イントロン 17	TGCTGACCACTTGGCATCTC	7408	7427	20	259
532861	n/a	n/a	イントロン 11	CAACTTTCACAAACCACCAT	6014	6033	18	260
532862	n/a	n/a	イントロン 10	AGCTCTGTGATTCTAAGGTT	5497	5516	15	261
532863	n/a	n/a	イントロン 6-エクソン7	CCACCTGTGGGTGAGGAGAA	4136	4155	16	262
532864	n/a	n/a	エクソン17 -イントロン 17	GAGGACTCACTTGAATGAAA	7373	7392	21	263
532865	n/a	n/a	イントロン6	TGGAATGATCAGGGAGCTAG	3916	3935	30	264
532866	n/a	n/a	イントロン5	GTCCCTTCTCCATTTCCCC	3659	3678	26	265
532867	n/a	n/a	イントロン7	TCAACTTTTAAAGTTAATCA	4497	4516	14	266
532868	n/a	n/a	イントロン6	GGGTGAGGAGAACAAGGCGC	4128	4147	21	267
532869	n/a	n/a	イントロン7	CTCCAAGCCATCTTTAAC	4553	4572	5	268
532870	n/a	n/a	エクソン17 -イントロン 17	AGGACTCACTTGAATGAAAC	7372	7391	18	269
532871	n/a	n/a	イントロン 10	TTCCAGGCAACTAGAGCTTC	5412	5431	15	270
532872	n/a	n/a	エクソン1	CAGAGTCCAGCCACTGTTTG	1557	1576	13	271
532873	n/a	n/a	イントロン 17-エクソン 18	CCAACCTGCAGAGGCAGTGG	7638	7657	23	272
532874	n/a	n/a	イントロン 16	TGCAAGGAGAGGAGAAGCTG	7312	7331	10	273
532875	n/a	n/a	エクソン9 -イントロン 9	CTAGGCAGGTTACTCACCCA	5120	5139	21	274
532876	n/a	n/a	イントロン 6-エクソン7	CACCATAACTTGCCACCTGT	4148	4167	41	275
532877	n/a	n/a	イントロン 12	TAGGTACCACCTCTTTGTGG	6363	6382	27	276
532878	n/a	n/a	イントロン 11	CTTGACCTCACCTCCCCCAA	5954	5973	13	277
532879	n/a	n/a	イントロン 12	CCACCTCTTTGTGGGCAGCT	6357	6376	33	278

10

20

30

40

【 1 2 6 2 】

50

【表 1 1 9 - 3】

532880	n/a	n/a	イントロン 11	TTCACAAACCACCATCTCTT	6009	6028	8	279
532881	n/a	n/a	エクソン3 -イントロン 3	TTCTCACCTCCGTTGTCACA	2958	2977	17	280
532882	n/a	n/a	イントロン 12	GAAAGTGGGAGGTGTTGCCT	6225	6244	19	281
532883	n/a	n/a	イントロン1	ACAGCAGGAAGGGAAGGTTA	2075	2094	34	282
532884	n/a	n/a	イントロン 17	CATGCTGACCACTTGGCATC	7410	7429	18	283
532885	n/a	n/a	エクソン4 -イントロン 4	GGTCACCTTGGCAGGAAGGC	3286	3305	0	284
532886	n/a	n/a	イントロン8	GTATAGTGTTACAAGTGGAC	4804	4823	13	285
532887	n/a	n/a	イントロン7	GGACTTCCCTTTGACCACAA	4468	4487	18	286
532888	n/a	n/a	イントロン 11	TCACCTTGACCTCACCTCCC	5958	5977	20	287
532889	n/a	n/a	イントロン 15	TAGAGTGCCTCCTTAGGATG	7035	7054	27	288
532890	n/a	n/a	イントロン7	TGACTTCAACTTGTGGTCTG	4605	4624	16	289
532891	n/a	n/a	イントロン 10	CAGAGAAGGAGAATGTGCTG	5804	5823	25	290
532892	n/a	n/a	イントロン 14-エクソン 15	AGGGAGCAGCTCTTCCTCTG	6919	6938	47	291
532893	n/a	n/a	イントロン 5-エクソン6	TGTTCCCTGGGTGCCAGGA	3710	3729	24	292
532894	n/a	n/a	イントロン 10	GGCCTGGCTGTTTCAAGCC	5612	5631	15	293
532895	n/a	n/a	イントロン 10-エクソン 11	GACTGGCTTTCATCTGGCAG	5821	5840	25	294
532896	n/a	n/a	イントロン 10	GAAGGCTTCCAGGCAACTA	5419	5438	19	295
532897	n/a	n/a	エクソン17 -イントロン 17	TCACTTGAATGAAACGACTT	7367	7386	11	296
532898	n/a	n/a	イントロン1	GGCCCCAAAAGGCCAAGGAG	2106	2125	5	297

10

20

30

40

【 1 2 6 3 】

50

【表 1 1 9 - 4】

532899	n/a	n/a	イントロン 16-エクソン 17	AATCACCTGCAAGGAGAGGA	7319	7338	19	298
532900	n/a	n/a	イントロン 12	GACCTTCAGTTGCATCCTTA	6183	6202	25	299
532901	n/a	n/a	イントロン1	TGATGAAGCCTGGCCCCAAA	2117	2136	0	300
532902	n/a	n/a	イントロン 12	TAGAAAGTGGGAGGTGTTGC	6227	6246	0	301
532903	n/a	n/a	イントロン 12	CCCATCCCTGACTGGTCTGG	6295	6314	14	302
532904	n/a	n/a	イントロン8	CCATGGGTATAGTGTACAA	4810	4829	13	303
532905	n/a	n/a	イントロン2	GTGTTCTCTTGACTCCAGG	2586	2605	23	304
532906	n/a	n/a	イントロン 13	GGCCTGCTCCTCACCCAGT	6597	6616	27	305
532907	n/a	n/a	イントロン 10	GAGGCCTGGCTGTTTTCAAG	5614	5633	32	306
532908	n/a	n/a	エクソン1	GACTCTCCCCTCAGTACCT	1677	1696	16	307
532909	n/a	n/a	イントロン8	CATGGGTATAGTGTACAAAG	4809	4828	10	308
532910	n/a	n/a	イントロン 10	GAAGGAGAATGTGCTGAAAA	5800	5819	0	309
532911	n/a	n/a	イントロン7	TCACCTGGTCTTCCAAGCCA	4562	4581	0	310
532912	n/a	n/a	イントロン 17	CTCCCCAGATAGGAAAGGGA	7391	7410	0	311
532913	n/a	n/a	エクソン17 -イントロン 17	GGACTCACTTGAATGAAACG	7371	7390	0	312
532914	n/a	n/a	イントロン 16-エクソン 17	GGCCGCCAGAATCACCTGCA	7328	7347	30	313
532915	n/a	n/a	エクソン17 -イントロン 17	CTCACTTGAATGAAACGACT	7368	7387	22	314
532916	n/a	n/a	イントロン 13	CTTCCCAGCCTTCCTCAG	6569	6588	28	315
532918	n/a	n/a	イントロン 12	AGAAAGTGGGAGGTGTTGCC	6226	6245	3	316
532917	2604	2623	エクソン18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	7839	7858	90	317

【 1 2 6 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 0 - 1】

表 1 2 8 : 配列番号 1 及び配列番号 2 を標的とする 5 - 1 0 - 5 MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	標的領域	配列	配列番号 2 開始部位	配列番号 2 終止部位	% 阻害	配列番号
532919	n/a	n/a	エクソン 1	CCAGGACTCTCCCCTTCAGT	1681	1700	4	318
532920	n/a	n/a	イントロン 6	AGGGAAGGAGGACAGAATAG	3976	3995	25	319
532921	n/a	n/a	イントロン 4	GAAATGAGGTCAAATGTCTG	3488	3507	30	320
532922	n/a	n/a	イントロン 4	GGAGAGTCAGAAATGAGGTC	3497	3516	25	321
532923	n/a	n/a	イントロン 12	GTAGAAAGTGGGAGGTGTTG	6228	6247	26	322
532924	n/a	n/a	イントロン 10	TAGAAAGATCTCTGAAGTGC	5521	5540	24	323
532925	n/a	n/a	イントロン 13	CTGCTCCTCACCCAGTCCT	6594	6613	26	324
532926	n/a	n/a	イントロン 11	CTACTGGGATTCTGTGCTTA	5927	5946	30	325
532927	n/a	n/a	イントロン 1	CCCAAAGGCCAAGGAGGGA	2103	2122	13	326
532928	n/a	n/a	イントロン 17	TGACCACTTGGCATCTCCCC	7405	7424	27	327
532929	n/a	n/a	イントロン 16- エクソン 17	CCTGCAAGGAGAGGAGAAGC	7314	7333	29	328
532930	n/a	n/a	エクソン 16 -イントロン 16	CTCTCACCTTGCAAGTATT	7239	7258	44	329
532931	n/a	n/a	イントロン 1	CCCCAAAAGGCCAAGGAGGG	2104	2123	21	330
532932	n/a	n/a	イントロン 7	GTCTTCCAAGCCATCTTTTA	4555	4574	20	331
532933	n/a	n/a	イントロン 8	GTTACAAGTGGACTTAAGGG	4797	4816	30	332
532934	n/a	n/a	イントロン 8- エクソン 9	CCCATGTTGTGCAATCCTGC	5017	5036	30	333
532935	n/a	n/a	イントロン 15	GAGGTGGGAAGCATGGAGAA	7091	7110	17	334
532936	n/a	n/a	イントロン 14	TGCTCCCACCACTGTCATCT	6874	6893	21	335
532937	n/a	n/a	エクソン 9 -イントロン 9	AGGCAGGTTACTCACCCAGA	5118	5137	18	336
532938	n/a	n/a	イントロン 11	TACTGGGATTCTGTGCTTAC	5926	5945	15	337
532939	n/a	n/a	イントロン 13	GCCTTCCCAGCCTTTCCTC	6571	6590	27	338
532940	n/a	n/a	イントロン 8- エクソン 9	GTGCAATCCTGCAGAAGAGA	5009	5028	21	339
532941	n/a	n/a	イントロン 8	ACAGGAGAGAGGTCCCTTCT	4743	4762	20	340
532942	n/a	n/a	イントロン 10	CCCAAAGGAGAAAGGGAAA	5717	5736	14	341
532943	n/a	n/a	イントロン 2	AAGCCCAGGGTAAATGCTTA	2557	2576	32	342

【 1 2 6 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 0 - 2】

532944	n/a	n/a	イントロン 1	GATGAAGCCTGGCCCCAAAA	2116	2135	22	343
532945	n/a	n/a	イントロン 10	TGGCAGAGAAGGAGAATGTG	5807	5826	22	344
532946	n/a	n/a	イントロン 13	TTCCCAGCCTTTCCTCAGGG	6567	6586	35	345
532947	n/a	n/a	イントロン 10	GGCAGAGAAGGAGAATGTGC	5806	5825	30	346
532948	n/a	n/a	イントロン 10	ACAGTGCCAGGAAACAAGAA	5471	5490	25	347
532949	n/a	n/a	エクソン 9 -イントロン 9	TAGGCAGGTTACTCACCCAG	5119	5138	22	348
532950	n/a	n/a	イントロン 2	TTCTCTTGACTTCCAGGGCT	2583	2602	22	349
532951	n/a	n/a	イントロン 13	CCTGCTCCTCACCCCAGTCC	6595	6614	16	350
532953	n/a	n/a	イントロン 7	TCCCCTAACCTCCATTGCC	4422	4441	14	351
532954	n/a	n/a	イントロン 7	TTCCCTTTGACCACAAAGTG	4464	4483	16	352
532955	n/a	n/a	イントロン 9	CTGGGTCCTAGGCAGGTTAC	5127	5146	30	353
532956	n/a	n/a	イントロン 10	TCCAGGCAACTAGAGCTTCA	5411	5430	20	354
532957	n/a	n/a	イントロン 8- エクソン 9	GCCCATGTTGTGCAATCCTG	5018	5037	45	355
532958	n/a	n/a	イントロン 7	GGTCCCCTAACCTCCATT	4425	4444	18	356
532959	n/a	n/a	イントロン 3	AGGTAGAGAGCAAGAGTTAC	3052	3071	26	357
532960	n/a	n/a	イントロン 7	CCACTAACCTCCATTGCCCA	4420	4439	10	358
532961	n/a	n/a	イントロン 11	TCACAAACCACCATCTCTTA	6008	6027	40	359
532962	n/a	n/a	エクソン 9 -イントロン 9	TACTCACCCAGATAATCCTC	5110	5129	27	360
532963	n/a	n/a	イントロン 13	TGCTCCTCACCCCAGTCCTC	6593	6612	24	361
532964	n/a	n/a	イントロン 15- エクソン 16	TCTCACAGCTGCCTTTCTGT	7115	7134	25	362
532965	n/a	n/a	エクソン 17 -イントロン 17	GAAAGGGAGGACTCACTTGA	7379	7398	11	363
532966	n/a	n/a	イントロン 7	CCATCTTTTAACCCCAGAGA	4545	4564	18	364
532967	n/a	n/a	イントロン 13	TCCTCACCCCAGTCCTCCAG	6590	6609	27	365
532968	n/a	n/a	イントロン 10	CTGGCAGAGAAGGAGAATGT	5808	5827	15	366
532969	n/a	n/a	イントロン 17	TCTCCCCAGATAGGAAAGGG	7392	7411	23	367
532970	n/a	n/a	イントロン 14	ACTTCAGCTGCTCCCACCAC	6882	6901	18	368
532971	n/a	n/a	イントロン 1	GACAGCAGGAAGGGAAGGTT	2076	2095	13	369
532972	n/a	n/a	イントロン 13- エクソン 14	GGAGACAAATGGGCCTATAA	6640	6659	33	370
532973	n/a	n/a	イントロン 14	CTGCTCCCACCACTGTCATC	6875	6894	11	371
532974	n/a	n/a	イントロン 10	AGGAATGAAGAAGGCTTTCC	5428	5447	21	372

【 1 2 6 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 0 - 3】

532975	n/a	n/a	イントロン 14	GGGATCTCATCCTTATCCTC	6741	6760	31	373
532976	n/a	n/a	イントロン 9	GTGCTGGGTCCTAGGCAGGT	5130	5149	16	374
532977	n/a	n/a	イントロン 1	CAAAAGGCCAAGGAGGGATG	2101	2120	14	375
532978	n/a	n/a	イントロン 17	CCATGCTGACCACTTGGCAT	7411	7430	20	376
532979	n/a	n/a	イントロン 8	GGAGGCTGGGACAGGAGAGA	4753	4772	25	377
532980	n/a	n/a	イントロン 14-エクソン 15	GGAGCAGCTCTTCCTCTGGA	6917	6936	36	378
532981	n/a	n/a	エクソン 3 -イントロン 3	TCTCACCTCCGTTGTCACAG	2957	2976	20	379
532982	n/a	n/a	イントロン 13	CAGTCTCCAGCCTTTCCCA	6581	6600	21	380
532983	n/a	n/a	イントロン 13	AGTCCTCCAGCCTTTCCAG	6580	6599	22	381
532984	n/a	n/a	イントロン 4- エクソン 5	TGAAGGAGTCTGGGAGAGTC	3509	3528	12	382
532985	n/a	n/a	イントロン 16-エクソン 17	CAGAATCACCTGCAAGGAGA	7322	7341	20	383
532986	n/a	n/a	エクソン 17 -イントロン 17	TAGGAAAGGGAGGACTCACT	7382	7401	3	384
532987	n/a	n/a	エクソン 4 -イントロン 4	ACCTTGGCAGGAAGGCTCCG	3282	3301	12	385
532988	n/a	n/a	イントロン 13-エクソン 14	GAGACAAATGGGCCTATAAA	6639	6658	15	386
532989	n/a	n/a	イントロン 1	CTGAAGAGAAAGGCTGATGA	2131	2150	17	387
532990	n/a	n/a	イントロン 6	AATGATCAGGGAGCTAGTCC	3913	3932	30	388
532991	n/a	n/a	イントロン 17	CTTAGCTGACCTAAAGGAAT	7557	7576	22	389
532992	n/a	n/a	イントロン 8	TGGGTATAGTGTACAAGTG	4807	4826	17	390
532993	n/a	n/a	イントロン 1	TGAAGAGAAAGGCTGATGAA	2130	2149	19	391
532994	n/a	n/a	イントロン 8	GTGTTACAAGTGGACTTAAG	4799	4818	25	392
532995	n/a	n/a	イントロン 6	ACCTGTGGGTGAGGAGAACA	4134	4153	24	393
532996	n/a	n/a	エクソン 9 -イントロン 9	TCACCCAGATAATCCTCCCT	5107	5126	36	394
532952	2608	2627	エクソン 18	TGTTGTTCGAGCTGTTTTAA	7843	7862	90	395

10

20

30

40

【 1 2 6 7 】

実施例 1 1 6 : M O E ギャップマーによる H e p G 2 細胞におけるヒト補体 B 因子 (C F B) のアンチセンス阻害

ヒト補体 B 因子 (C F B) 核酸を標的とする新たなアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、 C F B m R N A に対するそれらの効果をインビトロで試験した。 1 ウェルあたり 2 0 , 0 0 0 細胞の密度の培養 H e p G 2 細胞を、エレクトロポレーションにより、 4 , 5 0 0 n M アンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。約 2 4 時間の処理期間後に、 R N A を細胞から単離し、 C F B m R N A レベルを定量リアルタイム P C R で測定した。ヒトプライマープロベセット R T S 3 4 6 0 _ M G B (フォワード配列 C G A A G C A G C T C A A T G A A A T C A A , 本明細書では配列番号 8 1 3 と呼ぶ ;

50

リバース配列 T G C C T G G A G G G C C T T C T T , 本明細書では配列番号 8 1 4 と呼ぶ ; プローブ配列 A G A C C A C A A G T T G A A G T C , 本明細書では配列番号 8 1 5 と呼ぶ) を使って、m R N A レベルを測定した。R I B O G R E E N (登録商標) によって測定される全 R N A 含有量に従って C F B m R N A レベルを調整した。結果を、無処理対照細胞との比較で、C F B の阻害パーセントとして表す。

【 1 2 6 8 】

以下の表に示す新設計のキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーとして設計された。これらの 5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーは 2 0 ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは 1 0 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドで構成され、5 ' 側と 3 ' 側にそれぞれ 5 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5 ' ウイングセグメント中の各ヌクレオシドと 3 ' ウイングセグメント中の各ヌクレオシドは 2 ' - M O E 修飾を有する。ヌクレオシド間連結部は、各ギャップマーの全体を通して、ホスホロチオエート (P = S) 連結部である。シトシン残基は、各ギャップマーの全体を通してすべて、5 - メチルシトシンである。「開始部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も 5 ' 側のヌクレオシドを示す。「終止部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も 3 ' 側のヌクレオシドを示す。以下の表に示す各ギャップマーは、本明細書において配列番号 1 と呼ぶヒト C F B m R N A (G E N B A N K アクセッション番号 N M _ 0 0 1 7 1 0 . 5) もしくは本明細書において配列番号 2 と呼ぶヒト C F B ゲノム配列 (ヌクレオチド 3 1 8 5 2 0 0 0 から 3 1 8 6 1 0 0 0 までを切り出した G E N B A N K アクセッション番号 N T _ 0 0 7 5 9 2 . 1 5) 、またはその両方を標的とする。「n / a」は、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドが当該特定遺伝子配列を 1 0 0 % の相補性では標的としないことを示す。

【 1 2 6 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 1 - 1】

表 1 2 9 : 配列番号 1 及び配列番号 2 を標的とする 5 - 1 0 - 5 MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	標的領域	配列	% 阻害	配列番号 2 開始部位	配列番号 2 終止部位	配列番号
532686	1135	1154	エクソン 6	ACACTTTTTGGCTCCTGTGA	48	3819	3838	84
532687	1141	1160	エクソン 6	GACTAGACACTTTTTGGCTC	63	3825	3844	85
532688	1147	1166	エクソン 6	TAAGTTGACTAGACACTTTT	47	3831	3850	86
532689	1153	1172	エクソン 6	CTCAATTAAGTTGACTAGAC	57	3837	3856	87
532690	1159	1178	エクソン 6 -7 接合部	CACCTTCTCAATTAAGTTGA	49	3843	3862	88
532691	1165	1184	エクソン 6 -7 接合部	ACTTGCCACCTTCTCAATTA	33	n/a	n/a	89
532692	1171	1190	エクソン 6 -7 接合部	ACCATAACTTGCCACCTTCT	67	n/a	n/a	90
532693	1177	1196	エクソン 7	CTTCACACCATAACTTGCCA	56	4153	4172	91
532694	1183	1202	エクソン 7	TCTTGGCTTCACACCATAAC	50	4159	4178	92

【 1 2 7 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 1 - 2】

532695	1208	1227	エク ソン 7	ATGTGGCATATGTCACTAGA	53	4184	4203	93
532696	1235	1254	エク ソン 7	CAGACACTTTGACCCAAATT	52	4211	4230	94
532697	1298	1317	エク ソン 7 -8 接 合部	GGTCTTCATAATTGATTTCA	59	n/a	n/a	95
532698	1304	1323	エク ソン 7 -8 接 合部	ACTTGTGGTCTTCATAATTG	52	n/a	n/a	96
532699	1310	1329	エク ソン 7 -8 接 合部	ACTTCAACTTGTGGTCTTCA	85	n/a	n/a	97
532700	1316	1335	エク ソン 8	TCCCTGACTTCAACTTGTGG	96	4609	4628	98
532701	1322	1341	エク ソン 8	TGTTAGTCCCTGACTTCAAC	56	4615	4634	99
532702	1328	1347	エク ソン 8	TCTTGGTGTTAGTCCCTGAC	86	4621	4640	100
532703	1349	1368	エク ソン 8	TGTACACTGCCTGGAGGGCC	35	4642	4661	101
532704	1355	1374	エク ソン 8	TCATGCTGTACTGCCTGG	12	4648	4667	102
532705	1393	1412	エク ソン 8	GTTCCAGCCTTCAGGAGGGA	27	4686	4705	103

10

20

30

40

【 1 2 7 1 】

50

【表 1 2 1 - 3】

532706	1399	1418	エク ソン 8	GGTGCGGTTCCAGCCTTCAG	67	4692	4711	104
532707	1405	1424	エク ソン 8	ATGGCGGGTGCGGTTCCAGC	26	4698	4717	105
532708	1411	1430	エク ソン 8	GATGACATGGCGGGTGCGGT	28	4704	4723	106
532709	1417	1436	エク ソン 8	GAGGATGATGACATGGCGGG	6	4710	4729	107
532710	1443	1462	エク ソン 8 -9 接 合部	CCCATGTTGTGCAATCCATC	35	n/a	n/a	108
532711	1449	1468	エク ソン 9	TCCCCGCCCATGTTGTGCAA	28	5023	5042	109
532712	1455	1474	エク ソン 9	ATTGGGTCCCCGCCCATGTT	19	5029	5048	110
532713	1461	1480	エク ソン 9	ACAGTAATTGGGTCCCCGCC	29	5035	5054	111
532714	1467	1486	エク ソン 9	TCAATGACAGTAATTGGGTC	49	5041	5060	112
532715	1473	1492	エク ソン 9	ATCTCATCAATGACAGTAAT	45	5047	5066	113
532716	1479	1498	エク ソン 9	TCCCGGATCTCATCAATGAC	54	5053	5072	114
532717	1533	1552	エク ソン 9 -10 接合 部	ACATCCAGATAATCCTCCCT	22	n/a	n/a	115

【 1 2 7 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 1 - 4】

532718	1539	1558	エクソン 9 -10 接合部	ACATAGACATCCAGATAATC	8	n/a	n/a	116
532719	1545	1564	エクソン 9 -10 接合部	CCAAACACATAGACATCCAG	30	n/a	n/a	117
532720	1582	1601	エクソン 10	AGCATTGATGTTCACTTGGT	62	5231	5250	118
532721	1588	1607	エクソン 10	AGCCAAAGCATTGATGTTCA	46	5237	5256	119
532722	1594	1613	エクソン 10	CTTGGAAGCCAAAGCATTGA	35	5243	5262	120
532723	1600	1619	エクソン 10	GTCTTTCTTGGAAGCCAAAG	43	5249	5268	121
532724	1606	1625	エクソン 10	CTCATTGTCTTTCTTGGAAG	40	5255	5274	122
532725	1612	1631	エクソン 10	ATGTTGCTCATTGTCTTTCT	49	5261	5280	123
532726	1618	1637	エクソン 10	GAACACATGTTGCTCATTGT	68	5267	5286	124
532727	1624	1643	エクソン 10	GACTTTGAACACATGTTGCT	54	5273	5292	125
532728	1630	1649	エクソン 10	ATCCTTGACTTTGAACACAT	61	5279	5298	126

【 1 2 7 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 1 - 5】

532729	1636	1655	エク ソン 10	TTCCATATCCTTGACTTTGA	55	5285	5304	127
532730	1642	1661	エク ソン 10	CAGGTTTTCCATATCCTTGA	51	5291	5310	440
532731	1686	1705	エク ソン 10 -11 接合 部	CTCAGAGACTGGCTTTCATC	41	5827	5846	129
532732	1692	1711	エク ソン 11	CAGAGACTCAGAGACTGGCT	59	5833	5852	130
516252	1698	1717	エク ソン 11	ATGCCACAGAGACTCAGAGA	57	5839	5858	131
532733	1704	1723	エク ソン 11	CAAACCATGCCACAGAGACT	34	5845	5864	132
532734	1710	1729	エク ソン 11	TGTTCCCAAACCATGCCACA	51	5851	5870	133
532735	1734	1753	エク ソン 11	TTGTGGTAATCGGTACCCTT	50	5875	5894	134
532736	1740	1759	エク ソン 11	GGTTGCTTGTGGTAATCGGT	64	5881	5900	135
532737	1746	1765	エク ソン 11	TGCCATGGTTGCTTGTGGTA	40	5887	5906	136
532738	1752	1771	エク ソン 11	TTGGCCTGCCATGGTTGCTT	49	5893	5912	137
532739	1758	1777	エク ソン 11	GAGATCTTGGCCTGCCATGG	47	5899	5918	138

10

20

30

40

【 1 2 7 4 】

50

【表 1 2 1 - 6】

532740	1803	1822	エク ソン 12	ACAGCCCCATACAGCTCTC	48	6082	6101	139
532741	1809	1828	エク ソン 12	GACACCACAGCCCCATACA	40	6088	6107	140
532742	1815	1834	エク ソン 12	TACTCAGACACCACAGCCCC	33	6094	6113	141
532743	1821	1840	エク ソン 12	ACAAAGTACTCAGACACCAC	39	6100	6119	142
532744	1827	1846	エク ソン 12	GTCAGCACAAAGTACTCAGA	45	6106	6125	143
532745	1872	1891	エク ソン 12	TTGATTGAGTGTTCTTGTC	42	6151	6170	144
532746	1878	1897	エク ソン 12	CTGACCTTGATTGAGTGTC	53	6157	6176	145
532747	1909	1928	エク ソン 13	TATCTCCAGGTCCCGCTTCT	31	6403	6422	146
532748	1967	1986	エク ソン 13	GAATTCCTGCTTCTTTTTTC	30	6461	6480	147
532749	1973	1992	エク ソン 13	ATTCAGGAATTCCTGCTTCT	40	6467	6486	148
532750	1979	1998	エク ソン 13	CATAAAATTCAGGAATTCCT	45	6473	6492	149
532751	1985	2004	エク ソン 13	CATAGTCATAAAATTCAGGA	43	6479	6498	150
532752	2006	2025	エク ソン 13	TGAGCTTGATCAGGGCAACG	61	6500	6519	151

10

20

30

40

【 1 2 7 5 】

50

【表 1 2 1 - 7】

532753	2012	2031	エクソン 13	TATTCTTGAGCTTGATCAGG	47	6506	6525	152
532754	2048	2067	エクソン 13 -14 接合部	GACAAATGGGCCTGATAGTC	35	n/a	n/a	153
532755	2070	2089	エクソン 14	GTTGTTCCCTCGGTGCAGGG	43	6659	6678	154
532756	2076	2095	エクソン 14	GCTCGAGTTGTTCCCTCGGT	51	6665	6684	155
532757	2082	2101	エクソン 14	CTCAAAGCTCGAGTTGTTCC	36	6671	6690	156
532758	2088	2107	エクソン 14	GGAAGCCTCAAAGCTCGAGT	54	6677	6696	157
532759	2094	2113	エクソン 14	GTTGGAGGAAGCCTCAAAGC	52	6683	6702	158
532760	2100	2119	エクソン 14	GTGGTAGTTGGAGGAAGCCT	22	6689	6708	159
532761	2106	2125	エクソン 14	TGGCAAGTGGTAGTTGGAGG	34	6695	6714	160
532762	2112	2131	エクソン 14	TGTTGCTGGCAAGTGGTAGT	52	6701	6720	161

【 1 2 7 6 】

実施例 1 1 7 : M O E ギャップマーによる H e p G 2 細胞におけるヒト補体 B 因子 (C F B) のアンチセンス阻害

ヒト補体 B 因子 (C F B) 核酸を標的とする新たなアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、 C F B mRNA に対するそれらの効果をインビトロで試験した。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドを、培養条件が類似する一連の実験で試験した。各実験に関する結果を以下に示す別々の表に掲載する。1 ウェルあたり 2 0 , 0 0 0 細胞の密度の培養 H e p G 2 細胞を、エレクトロポレーションにより、5 , 0 0 0 n M アンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。約 2 4 時間の処理期間後に、細胞から RNA を単離し、定量リアルタイム P C R によって C F B mRNA レベルを測定した。ヒトプライマープローブセット R T S 3 4 5 9 を使って mRNA レベルを測定した。R I B O G R E E N (登録商標) によって測定される全 RNA 含有量に従って C F B mRNA レベルを調整した。結果を、無処理対照細胞との比較で、 C F B の阻害パーセントとして表す。

【 1 2 7 7 】

10

20

30

40

50

以下の表に示す新設計のキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5' - 10 - 5 MOE
ギャップマーとして設計された。これらのギャップマーは20ヌクレオシド長であり、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で構成され、5'側と3'側
にそれぞれ5個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5'ウイングセ
グメント中の各ヌクレオシドと3'ウイングセグメント中の各ヌクレオシドは2' - MOE
修飾を有する。ヌクレオシド間連結部は、各ギャップマーの全体を通して、ホスホロチオ
エート (P = S) 連結部である。シトシン残基は、各ギャップマーの全体を通してすべて
、5 - メチルシトシンである。「開始部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマー
の標的になる最も5'側のヌクレオシドを示す。「終止部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当
該ギャップマーの標的になる最も3'側のヌクレオシドを示す。以下の表に示す各ギャップ
マーは、本明細書において配列番号1と呼ぶヒトCFB mRNA (GENBANKアクセ
ッション番号NM_001710.5) もしくは本明細書において配列番号2と呼ぶヒ
トCFBゲノム配列 (ヌクレオチド31852000から31861000までを切り出
したGENBANKアクセッション番号NT_007592.15)、またはその両方を
標的とする。「n/a」は、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドが当該特定遺伝子配列
を100%の相補性では標的としないことを示す。ある特定の表において標的遺伝子に関
する配列アラインメントが示されていない場合は、その表に掲載されたオリゴヌクレオチ
ドはいずれも、その標的遺伝子と100%の相補性では整列しないと理解される。

【1278】

10

20

30

40

50

【表 1 2 2 - 1】

表 1 3 0 : 配列番号 1 を標的とする 5 - 1 0 - 5 MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列番号1 開始部位	配列番号1 終止部位	標的領域	配列	% 阻害	配列番号
588570	150	169	エクソン 1	TGGTCACATTCCCTTCCCCT	54	396
588571	152	171	エクソン 1	CCTGGTCACATTCCCTTCCC	63	397
532614	154	173	エクソン 1	GACCTGGTCACATTCCCTTC	64	12
588572	156	175	エクソン 1	TAGACCTGGTCACATTCCCT	62	398
588573	158	177	エクソン 1	CCTAGACCTGGTCACATTCC	53	399
588566	2189	2208	エクソン 15	CCTTCCGAGTCAGCTTTTTTC	60	400
588567	2191	2210	エクソン 15	CTCCTTCCGAGTCAGCTTTT	61	401
532770	2193	2212	エクソン 15	ACCTCCTTCCGAGTCAGCTT	77	198
588568	2195	2214	エクソン 15	AGACCTCCTTCCGAGTCAGC	72	402
588569	2197	2216	エクソン 15	GTAGACCTCCTTCCGAGTCA	46	403
588574	2453	2472	エクソン 18	TTTGCCGCTTCTGGTTTTTG	46	404
588575	2455	2474	エクソン 18	CTTTTGCCGCTTCTGGTTTT	41	405
532800	2457	2476	エクソン 18	TGCTTTTGCCGCTTCTGGTT	69	228
588576	2459	2478	エクソン 18	CCTGCTTTTGCCGCTTCTGG	61	406
588577	2461	2480	エクソン 18	TACCTGCTTTTGCCGCTTCT	51	407
516350	2550	2569	エクソン 18	AGAAAACCCAAATCCTCATC	71	408
588509	2551	2570	エクソン 18	TAGAAAACCCAAATCCTCAT	58	409
588510	2552	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCAAATCCTCA	57	410
588511	2553	2572	エクソン 18	TATAGAAAACCCAAATCCTC	57	411
588512	2554	2573	エクソン 18	TTATAGAAAACCCAAATCCT	44	412
588513	2555	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAACCCAAATCC	37	413
588514	2556	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAACCCAAATC	50	414
588515	2557	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAAACCCAAAT	45	415
588516	2558	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAACCCAAA	60	416
588517	2559	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGAAAACCCAA	67	417
588518	2560	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAGAAAACCCA	57	418
588519	2561	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATAGAAAACCC	61	419
588520	2562	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTATAGAAAACC	27	420
588521	2563	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTATAGAAAAC	25	421
588522	2564	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTTATAGAAAA	36	422
588523	2565	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCTTATAGAAA	36	423
588524	2566	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCCCTTATAGAA	46	424

10

20

30

40

【 1 2 7 9 】

50

【表 1 2 2 - 2】

588525	2567	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCCCTTATAGA	38	425
588526	2568	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAACCCCTTATAG	47	426
588527	2569	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAACCCCTTATA	68	427
588528	2570	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAAACCCCTTAT	63	428
532809	2571	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGAAACCCCTTA	85	237
588529	2572	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGAAACCCCTT	76	429
588530	2573	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAGGAAACCCCT	74	430
588531	2574	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAGGAAACCCC	75	431
588532	2575	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCAGGAAACCC	73	432
588533	2576	2595	エクソン 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAACC	82	433
532810	2577	2596	エクソン 18	GCCCCTGTCCAGCAGGAAAC	88	238
588534	2578	2597	エクソン 18	CGCCCCTGTCCAGCAGGAAA	86	434
588535	2579	2598	エクソン 18	ACGCCCCTGTCCAGCAGGAA	86	435
588536	2580	2599	エクソン 18	CACGCCCCTGTCCAGCAGGA	93	436
588537	2581	2600	エクソン 18	CCACGCCCCTGTCCAGCAGG	92	437
588538	2582	2601	エクソン 18	CCCACGCCCCTGTCCAGCAG	94	438
588539	2583	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCCTGTCCAGCA	96	439
588540	2584	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCCTGTCCAGC	88	440
588541	2585	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCCTGTCCAG	79	441
588542	2586	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCCTGTCCA	83	442
588543	2587	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCCTGTCC	86	443
588544	2588	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCCCTGTC	90	444
588545	2589	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCACGCCCCTGT	92	445
588546	2590	2609	エクソン 18	AATTCAATCCCACGCCCCTG	92	446
588547	2591	2610	エクソン 18	TAATTCAATCCCACGCCCCT	88	447
588548	2592	2611	エクソン 18	TTAATTCAATCCCACGCCCC	93	448
588549	2593	2612	エクソン 18	TTTAATTCAATCCCACGCCC	88	449
588550	2594	2613	エクソン 18	TTTTAATTCAATCCCACGCC	89	450
588551	2595	2614	エクソン 18	GTTTTAATTCAATCCCACGC	94	451
588552	2596	2615	エクソン 18	TGTTTTAATTCAATCCCACG	93	452
588553	2597	2616	エクソン 18	CTGTTTTAATTCAATCCCAC	96	453
588554	2598	2617	エクソン 18	GCTGTTTTAATTCAATCCCA	98	454
532811	2599	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAATTCAATCCC	97	239
532811	2599	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAATTCAATCCC	95	239
588555	2600	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTTAATTCAATCC	93	455
588556	2601	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTTAATTCAATC	96	456
588557	2602	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTTAATTCAAT	98	457
588558	2603	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTTTAATTCAA	95	458

10

20

30

40

【 1 2 8 0 】

50

【表 1 2 2 - 3】

532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	97	317
588559	2605	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTTAATTC	95	459
588560	2606	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTTAATT	92	460
588561	2607	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTTTTAAT	93	461
532952	2608	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTTAA	88	395
588562	2609	2628	エクソン 18 ／リピート	TTGTTGTCGCAGCTGTTTTA	90	462
588563	2610	2629	エクソン 18 ／リピート	TTTGTGTCGCAGCTGTTTT	89	463
588564	2611	2630	エクソン 18 ／リピート	TTTTGTGTCGCAGCTGTTT	92	464
588565	2612	2631	エクソン 18 ／リピート	TTTTTGTGTCGCAGCTGTT	88	465

10

【 1 2 8 1 】

【表 1 2 3 - 1】

表 1 3 1 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とする 5 - 1 0 - 5 MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

20

ISIS 番号	配 列 番 号 1 開 始 部 位	配 列 番 号 1 終 止 部 位	標的領域	配列	% 阻害	配列 番号 2 開 始 部 位	配列 番号 2 終 止 部 位	配列 番号
588685	n/a	n/a	エクソン 1	GGATCCAGCTCACTCCCCTG	48	1596	1615	466
588686	n/a	n/a	エクソン 1	AAATAAGGATCCAGCTCACT	29	1602	n/a	467
588688	n/a	n/a	エクソン 1	GACCAGAAATAAGGATCCAG	58	1608	1627	468
588690	n/a	n/a	エクソン 1	CTTAGGGACCAGAAATAAGG	45	1614	1633	469
588692	n/a	n/a	エクソン 1	CACCCACTTAGGGACCAGAA	36	1620	1639	470
588694	n/a	n/a	エクソン 1	ACCACCCACTTAGGGACCAG	47	1622	1641	471
588696	n/a	n/a	エクソン 1	AGGTCCAGGACTCTCCCCTT	96	1685	1704	472
588698	n/a	n/a	エクソン 1	AAGGTCCAGGACTCTCCCCT	96	1686	1705	473
588700	n/a	n/a	エクソン 1	AAACTGCAGAAGTCCCACCC	2	1716	1735	474
588586	30	49	エクソン 1	GGAGGGCCCCGCTGAGCTG C	59	1751	1770	475
588587	48	67	エクソン 1	TCCCGGAACATCCAAGCGGG	45	1769	1788	476
588588	56	75	エクソン 1	CATCACTTCCCGGAACATC	39	1777	n/a	477
588589	151	170	エクソン 1	CTGGTCACATTCCCTTCCCC	29	1872	1891	478

30

40

【 1 2 8 2 】

50

【表 1 2 3 - 2】

588590	157	176	エクソン 1	CTAGACCTGGTCACATTCCC	47	1878	1897	479
588591	339	358	エクソン 1 -2 接合部	GGAGTGGTGGTCACACCTCC	44	n/a	n/a	480
588592	384	403	エクソン 2	ACCCCCTCCAGAGAGCAGGA	43	2192	2211	481
588593	390	409	エクソン 2	ATCTCTACCCCCTCCAGAGA	34	2198	2217	482
588594	467	486	エクソン 2	GGTACGGGTAGAAGCCAGAA	17	2275	2294	483
588595	671	690	エクソン 3	GGAGAGTGTAAACCGTCATAG	37	2879	2898	484
588596	689	708	エクソン 3	TGCGATTGGCAGAGCCCCGG	18	2897	2916	485
588597	695	714	エクソン 3	GGCAGGTGCGATTGGCAGAG	32	2903	2922	486
588598	707	726	エクソン 3	GGCCATTCACTTGGCAGGTG	45	2915	2934	487
588599	738	757	エクソン 3	TTGTACAGATCGCTGTCTG	52	2946	2965	488
588600	924	943	エクソン 4 -5 接合部	AAGGAGTCTTGGCAGGAAGG	39	n/a	n/a	489
588601	931	950	エクソン 4 -5 接合部	GTACATGAAGGAGTCTTGGC	37	n/a	n/a	490
588602	959	978	エクソン 5	AAGCTTCGGCCACCTCTTGA	21	3542	3561	491
588603	1089	1108	エクソン 6	CCATCTAGCACCAGGTAGAT	22	3773	3792	492
588604	1108	1127	エクソン 6	GGCCCCAATGCTGTCTGATC	21	3792	3811	493
588606	1150	1169	エクソン 6	AATTAAGTTGACTAGACACT	56	3834	3853	494
588608	1162	1181	エクソン 6 -7 接合部	TGCCACCTTCTCAATTAAGT	50		19	495
588578	1167	1186	エクソン 6 -7 接合部	TAACTTGCCACCTTCTCAAT	23	n/a	n/a	496
588579	1169	1188	エクソン 6 -7 接合部	CATAACTTGCCACCTTCTCA	23	n/a	n/a	497
532692	1171	1190	エクソン 6 -7 接合部	ACCATAACTTGCCACCTTCT	15	n/a	n/a	90
588580	1173	1192	エクソン 6 -7 接合部	ACACCATAACTTGCCACCTT	16	n/a	n/a	498
588581	1175	1194	エクソン 6 -7 接合部	TCACACCATAACTTGCCACC	14	4151	4170	499
588610	1319	1338	エクソン 8	TAGTCCCTGACTTCAACTTG	50	4612	4631	500
588612	1325	1344	エクソン 8	TGGTGTAGTCCCTGACTTC	47	4618	4637	501
588614	1396	1415	エクソン 8	GCGGTTCCAGCCTTCAGGAG	47	4689	4708	502
588616	1421	1440	エクソン 8	TCATGAGGATGATGACATGG	51	4714	4733	503
588618	1446	1465	エクソン 9	CCGCCATGTTGTGCAATCC	18	5020	5039	504
588620	1458	1477	エクソン 9	GTAATTGGGTCCCCGCCCAT	40	5032	5051	505
588623	1482	1501	エクソン 9	AAGTCCCGGATCTCATCAAT	40	5056	5075	506

【 1 2 8 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 3】

588624	1542	1561	エクソン9 -10 接合部	AACACATAGACATCCAGATA	45	n/a	n/a	507
588626	1585	1604	エクソン 10	CAAAGCATTGATGTTCACCTT	43	5234	5253	508
588628	1621	1640	エクソン 10	TTTGAACACATGTTGCTCAT	45	5270	5289	509
588631	1646	1665	エクソン 10	CTTCCAGGTTTTCCATATCC	53	5295	5314	510
588632	1647	1666	エクソン 10	TCTTCCAGGTTTTCCATATC	56	5296	5315	511
588634	1689	1708	エクソン 11	AGACTCAGAGACTGGCTTTC	35	5830	5849	512
588636	1749	1768	エクソン 11	GCCTGCCATGGTTGCTTGTG	55	5890	5909	513
588638	1763	1782	エクソン 11	TGACTGAGATCTGGCCTGC	78	5904	5923	514
588640	1912	1931	エクソン 13	TTCTATCTCCAGGTCCCGCT	95	6406	6425	515
588642	1982	2001	エクソン 13	AGTCATAAAAATTCAGGAATT	44	6476	6495	516
588645	2073	2092	エクソン 14	CGAGTTGTTCCCTCGGTGCA	40	6662	6681	517
588646	2085	2104	エクソン 14	AGCCTCAAAGCTCGAGTTGT	57	6674	6693	518
588648	2091	2110	エクソン 14	GGAGGAAGCCTCAAAGCTCG	48	6680	6699	519
588651	2097	2116	エクソン 14	GTAGTTGGAGGAAGCCTCAA	40	6686	6705	520
588652	2103	2122	エクソン 14	CAAGTGGTAGTTGGAGGAAG	43	6692	6711	521
588654	2166	2185	エクソン 15	TCCTCAGACACAAACAGAGC	13	6954	6973	522
588656	2172	2191	エクソン 15	TTCTCCTCCTCAGACACAAA	55	6960	6979	523
588658	2196	2215	エクソン 15	TAGACCTCCTCCGAGTCAG	44	6984	7003	524
588660	2202	2221	エクソン 15	TTGATGTAGACCTCCTCCG	50	6990	7009	525

【 1 2 8 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 3 - 4】

588582	2219	2238	エクソン 15 -16 接合部	CTTTCTTATCCCCATTCTTG	19	n/a	n/a	526
588583	2221	2240	エクソン 15 -16 接合部	GCCTTTCTTATCCCCATTCT	14	n/a	n/a	527
532775	2223	2242	エクソン 15 -16 接合部	CTGCCTTTCTTATCCCCATT	3	n/a	n/a	203
588584	2225	2244	エクソン 15 -16 接合部	AGCTGCCTTTCTTATCCCCA	18	n/a	n/a	528
588662	2226	2245	エクソン 15 -16 接合部	CAGCTGCCTTTCTTATCCCC	27	n/a	n/a	529
588585	2227	2246	エクソン 15 -16 接合部	ACAGCTGCCTTTCTTATCCC	59	n/a	n/a	530
588664	2238	2257	エクソン 16	GCATCTCTCTCACAGCTGCC	49	7122	7141	531
588666	2276	2295	エクソン 16	AGATGTCCTTGACTTTGTCA	41	7160	7179	532
588668	2330	2349	エクソン 16	CAGCATAGGGACTCACTCCT	41	7214	7233	533
588670	2361	2380	エクソン 16 -17 接合部	CCGCCAGAATCACCTCTGCA	43	n/a	n/a	534
588672	2397	2416	エクソン 17	TGAATGAAACGACTTCTCTT	52	7362	7381	535
588674	2430	2449	エクソン 18	ACATCCACTACTCCCCAGCT	39	7665	7684	536
588676	2448	2467	エクソン 18	CGCTTCTGGTTTTTGCAGAC	69	7683	7702	537
588678	2454	2473	エクソン 18	TTTTGCCGCTTCTGGTTTTT	46	7689	7708	538
588680	2466	2485	エクソン 18	GCAGGTACCTGCTTTTGCCG	47	7701	7720	539
588682	2532	2551	エクソン 18	TCTTGGAGTTTCTCCTTCAG	58	7767	7786	540

【 1 2 8 5 】

【表 1 2 3 - 5】

532811	2599	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAATTCAATCCC	10	7834	7853	239
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	11	7839	7858	317

10

20

30

40

50

【 1 2 8 6 】

実施例 1 1 8 : M O E ギャップマーによる H e p G 2 細胞におけるヒト補体 B 因子 (C F B) のアンチセンス阻害

ヒト補体 B 因子 (C F B) 核酸を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、C F B m R N A に対するそれらの効果をインビトロで試験した。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドを、培養条件が類似する一連の実験で試験した。各実験に関する結果を以下に示す別々の表に掲載する。1 ウェルあたり 2 0 , 0 0 0 細胞の密度の培養 H e p G 2 細胞を、エレクトロポレーションにより、3 , 0 0 0 n M アンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。約 2 4 時間の処理期間後に、細胞から R N A を単離し、定量リアルタイム P C R によって C F B m R N A レベルを測定した。ヒトプライマープロベセット R T S 3 4 5 9 を使って m R N A レベルを測定した。R I B O G R E E N (登録商標) によって測定される全 R N A 含有量に従って C F B m R N A レベルを調整した。結果を、無処理対照細胞との比較で、C F B の阻害パーセントとして表す。

10

【 1 2 8 7 】

以下の表に示す新設計のキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、4 - 8 - 5 M O E、5 - 9 - 5 M O E、5 - 1 0 - 5 M O E、3 - 1 0 - 4 M O E、3 - 1 0 - 7 M O E、6 - 7 - 6 - M O E、6 - 8 - 6 M O E、もしくは 5 - 7 - 5 M O E ギャップマーとして、またはデオキシ、M O E、及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドとして設計された。

【 1 2 8 8 】

4 - 8 - 5 M O E ギャップマーは 1 7 ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは 8 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドで構成され、5 ' 側と 3 ' 側にそれぞれ 4 個及び 5 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5 - 9 - 5 M O E ギャップマーは 1 9 ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは 9 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドで構成され、5 ' 側と 3 ' 側にそれぞれ 5 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーは 2 0 ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは 1 0 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドで構成され、5 ' 側と 3 ' 側にそれぞれ 5 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5 - 7 - 5 M O E ギャップマーは 1 7 ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは 7 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドで構成され、5 ' 側と 3 ' 側にそれぞれ 5 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。3 - 1 0 - 4 M O E ギャップマーは 1 7 ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは 1 0 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドで構成され、5 ' 側と 3 ' 側にそれぞれ 3 個及び 4 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。3 - 1 0 - 7 M O E ギャップマーは 2 0 ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは 1 0 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドで構成され、5 ' 側と 3 ' 側にそれぞれ 3 個及び 7 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。6 - 7 - 6 M O E ギャップマーは 1 9 ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは 7 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドで構成され、5 ' 側と 3 ' 側にそれぞれ 6 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。6 - 8 - 6 M O E ギャップマーは 2 0 ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは 8 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドで構成され、5 ' 側と 3 ' 側にそれぞれ 6 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。ヌクレオシド間連結部は、各ギャップマーの全体を通して、ホスホロチオエート (P = S) 連結部である。シトシン残基は、各ギャップマーの全体を通してすべて、5 - メチルシトシンである。

20

30

40

【 1 2 8 9 】

前記デオキシ、M O E 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドは 1 6 ヌクレオシド長であり、そのヌクレオシドは M O E 糖修飾、(S) - c E t 糖修飾、またはデオキシ修飾のいずれかを有する。「化学的特徴」欄には各オリゴヌクレオチドの糖修飾を記載する。「k」は (S) - c E t 糖修飾を示し、「d」はデオキシリボースを示し、「e」は M O E 修飾を示す。

【 1 2 9 0 】

「開始部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も 5 ' 側のヌクレ

50

オシドを示す。「終止部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も3'側のヌクレオシドを示す。以下の表に示す各ギャップマーは、本明細書において配列番号1と呼ぶヒトCFB mRNA (GENBANKアクセッション番号NM_001710.5)もしくは本明細書において配列番号2と呼ぶヒトCFBゲノム配列(ヌクレオチド31852000から31861000までを切り出したGENBANKアクセッション番号NT_007592.15)、またはその両方を標的とする。「n/a」は、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドが当該特定遺伝子配列を100%の相補性では標的としないことを示す。

【1291】

【表124-1】

表132：配列番号1または配列番号2を標的とするデオキシ、MOE及び(S)-cEtオリゴヌクレオチドによるCFB mRNAの阻害

ISIS 番号	配列 番号1 開始 部位	配列 番号1 終止 部位	標的領域	配列	% 阻害	配列 番号 2 開始 部位	配列 番号 2 終止 部位	モチーフ	配列 番号
532811	2599	2618	エクソン18	AGCTGTTTAAAT TCAATCCC	10	7834	7853	eeeeeddddd ddddeeee	239
588884	48	63	エクソン1	GGAACATCCAA GCGGG	79	1769	1784	eekdddddd dddkke	541
588872	154	169	エクソン1	TGGTCACATTCC CTTC	91	1875	1890	eekdddddd dddkke	542
588873	156	171	エクソン1	CCTGGTCACATT CCCT	91	1877	1892	eekdddddd dddkke	543
588874	158	173	エクソン1	GACCTGGTCAC ATTCC	91	1879	1894	eekdddddd dddkke	544
588878	1171	1186	エクソン6 -7 接合部	TAACCTGCCACC TTCT	92	n/a	n/a	eekdddddd dddkke	545
588879	1173	1188	エクソン6 -7 接合部	CATAACTGCCA CCTT	94	n/a	n/a	eekdddddd dddkke	546
588880	1175	1190	エクソン6 -7 接合部	ACCATAACTG CACC	89	4151	4166	eekdddddd dddkke	547
588869	2193	2208	エクソン15	CCTCCGAGTC AGCTT	17	6981	6996	eekdddddd dddkke	548
588870	2195	2210	エクソン15	CTCCTCCGAGT CAGC	78	6983	6998	eekdddddd dddkke	549
588871	2197	2212	エクソン15	ACCTCCTCCGA GTCA	80	6985	7000	eekdddddd dddkke	550
588881	2223	2238	エクソン15 -16 接合部	CTTCTTATCCC CATT	93	n/a	n/a	eekdddddd dddkke	551
588882	2225	2240	エクソン15 -16 接合部	GCCTTCTTATC CCCA	88	n/a	n/a	eekdddddd dddkke	552
588883	2227	2242	エクソン15 -16 接合部	CTGCCTTCTTA TCCC	90	n/a	n/a	eekdddddd dddkke	553
588875	2457	2472	エクソン18	TTGCCGCTTCT GGTT	81	7692	7707	eekdddddd dddkke	554
588876	2459	2474	エクソン18	CTTTGCCGCTT CTGG	95	7694	7709	eekdddddd dddkke	555

10

20

30

40

50

【 1 2 9 2 】

【表 1 2 4 - 2 】

588877	2461	2476	エクソン 18	TGCTTTTGCCGC TTCT	91	7696	7711	eekdddddd dddkke	556
588807	2551	2566	エクソン 18	AAACCCAAATC CTCAT	82	7786	7801	eekdddddd dddkke	557
588808	2553	2568	エクソン 18	GAAAACCCAAA TCCTC	69	7788	7803	eekdddddd dddkke	558
588809	2555	2570	エクソン 18	TAGAAAACCCA AATCC	51	7790	7805	eekdddddd dddkke	559
588810	2556	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCC AAATC	23	7791	7806	eekdddddd dddkke	560
588811	2559	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAAC CCAA	13	7794	7809	eekdddddd dddkke	561
588812	2560	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAA CCCA	29	7795	7810	eekdddddd dddkke	562
588813	2561	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAA ACCC	53	7796	7811	eekdddddd dddkke	563
588814	2562	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAA AACC	86	7797	7812	eekdddddd dddkke	564
588815	2563	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGA AAAC	76	7798	7813	eekdddddd dddkke	565
588816	2564	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAG AAAA	33	7799	7814	eekdddddd dddkke	566
588817	2565	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATA GAAA	48	7800	7815	eekdddddd dddkke	567
588818	2566	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTAT AGAA	44	7801	7816	eekdddddd dddkke	568
588819	2567	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTA TAGA	74	7802	7817	eekdddddd dddkke	569
588820	2568	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCT TATAG	68	7803	7818	eekdddddd dddkke	570
588821	2569	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCC TTATA	45	7804	7819	eekdddddd dddkke	571
588822	2570	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCC CTTAT	50	7805	7820	eekdddddd dddkke	572
588823	2571	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACC CCTTA	54	7806	7821	eekdddddd dddkke	573
588824	2572	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAAC CCCTT	35	7807	7822	eekdddddd dddkke	574

10

20

30

40

【 1 2 9 3 】

50

【表 1 2 4 - 3】

588825	2573	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAA CCCCT	11	7808	7823	eekddddddd dddkke	575
588826	2574	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAA ACCCC	19	7809	7824	eekddddddd dddkke	576
588827	2575	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGA AACCC	42	7810	7825	eekddddddd dddkke	577
588828	2576	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGG AAACC	0	7811	7826	eekddddddd dddkke	578
588829	2577	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAG GAAAC	49	7812	7827	eekddddddd dddkke	579
588830	2578	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCA GGAAA	11	7813	7828	eekddddddd dddkke	580
588831	2579	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGC AGGAA	20	7814	7829	eekddddddd dddkke	581
588832	2580	2595	エクソン 18	CCCCTGTCCAG CAGGA	19	7815	7830	eekddddddd dddkke	582
588833	2581	2596	エクソン 18	GCCCCTGTCCA GCAGG	12	7816	7831	eekddddddd dddkke	583
588834	2582	2597	エクソン 18	CGCCCCTGTCC AGCAG	10	7817	7832	eekddddddd dddkke	584
588835	2583	2598	エクソン 18	ACGCCCCTGTC CAGCA	13	7818	7833	eekddddddd dddkke	585
588836	2584	2599	エクソン 18	CACGCCCTGT CCAGC	13	7819	7834	eekddddddd dddkke	586
588837	2585	2600	エクソン 18	CCACGCCCTG TCCAG	39	7820	7835	eekddddddd dddkke	587
588838	2586	2601	エクソン 18	CCCACGCCCT GTCCA	54	7821	7836	eekddddddd dddkke	588
588839	2587	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCT GTCC	51	7822	7837	eekddddddd dddkke	589
588840	2588	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCC TGTC	65	7823	7838	eekddddddd dddkke	590
588841	2589	2604	エクソン 18	AATCCCACGCC CCTGT	59	7824	7839	eekddddddd dddkke	591
588842	2590	2605	エクソン 18	CAATCCCACGC CCCTG	70	7825	7840	eekddddddd dddkke	592
588843	2591	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGC CCCT	0	7826	7841	eekddddddd dddkke	593

【 1 2 9 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 4 - 4】

588844	2592	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACG CCCC	48	7827	7842	eekdddddd dddkke	594
588845	2593	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCAC GCCC	46	7828	7843	eekdddddd dddkke	595
588846	2594	2609	エクソン 18	AATTCATCCCA CGCC	67	7829	7844	eekdddddd dddkke	596
588847	2595	2610	エクソン 18	TAATTCATCCC ACGC	75	7830	7845	eekdddddd dddkke	597
588848	2596	2611	エクソン 18	TTAATTCATCC CACG	76	7831	7846	eekdddddd dddkke	598
588849	2597	2612	エクソン 18	TTTAATTCATC CCAC	94	7832	7847	eekdddddd dddkke	599
588850	2598	2613	エクソン 18	TTTTAATTCAT CCCA	91	7833	7848	eekdddddd dddkke	600
588851	2599	2614	エクソン 18	GTTTTAATTCAA TCCC	91	7834	7849	eekdddddd dddkke	601
588852	2600	2615	エクソン 18	TGTTTTAATTC ATCC	78	7835	7850	eekdddddd dddkke	602
588853	2601	2616	エクソン 18	CTGTTTTAATC AATC	81	7836	7851	eekdddddd dddkke	603
588854	2602	2617	エクソン 18	GCTGTTTTAAT CAAT	63	7837	7852	eekdddddd dddkke	604
588855	2603	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAAT TCAA	65	7838	7853	eekdddddd dddkke	605
588856	2604	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTTAA TTCA	76	7839	7854	eekdddddd dddkke	606
588857	2605	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTTA ATTC	89	7840	7855	eekdddddd dddkke	607
588858	2606	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTT AATT	89	7841	7856	eekdddddd dddkke	608
588859	2607	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTT TAAT	89	7842	7857	eekdddddd dddkke	609
588860	2608	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTT TTAA	76	7843	7858	eekdddddd dddkke	610
588861	2609	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGT TTTA	87	7844	7859	eekdddddd dddkke	611
588862	2610	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTG TTTT	85	7845	7860	eekdddddd dddkke	612

【 1 2 9 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 4 - 5】

588863	2611	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCT GTTT	87	7846	7861	eekddddddd dddkke	613
588864	2612	2627	エクソン 18	TGTTGTTCGCAGC TGTT	67	7847	7862	eekddddddd dddkke	614
588865	2613	2628	エクソン 18	TTGTTGTTCGCAG CTGT	51	n/a	n/a	eekddddddd dddkke	615
588866	2614	2629	エクソン 18	TTTGTTGTTCGCA GCTG	95	n/a	n/a	eekddddddd dddkke	616
588867	2615	2630	エクソン 18	TTTTGTTGTTCGC AGCT	92	n/a	n/a	eekddddddd dddkke	617
588868	2616	2631	エクソン 18	TTTTTGTTCGTCG CAGC	66	n/a	n/a	eekddddddd dddkke	618

10

【 1 2 9 6 】

【表 1 2 5 - 1】

表 1 3 3 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とする 5 - 1 0 - 5 MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

20

ISIS 番号	配列 番号1 開始 部位	配列 番号1 終了 部位	標的領域	配列	% 阻 害	配列 番号 2 開始 部位	配列 番号 2 終了 部位	配列 番号
588685	n/a	n/a	エクソン 1	GGATCCAGCTCACTCCCCTG	14	1596	1615	466
588686	n/a	n/a	エクソン 1	AAATAAGGATCCAGCTCACT	2	1602	1621	467
588688	n/a	n/a	エクソン 1	GACCAGAAATAAGGATCCAG	3	1608	1627	468
588690	n/a	n/a	エクソン 1	CTTAGGGACCAGAAATAAGG	10	1614	1633	469
588692	n/a	n/a	エクソン 1	CACCCACTTAGGGACCAGAA	23	1620	1639	470
588694	n/a	n/a	エクソン 1	ACCACCCACTTAGGGACCAG	23	1622	1641	471
588696	n/a	n/a	エクソン 1	AGGTCCAGGACTCTCCCCTT	15	1685	1704	472
588698	n/a	n/a	エクソン 1	AAGGTCCAGGACTCTCCCCT	19	1686	1705	473
588700	n/a	n/a	エクソン 1	AAACTGCAGAAGTCCCACCC	16	1716	1735	474
588586	30	49	エクソン 1	GGAGGGCCCCGCTGAGCTGC	11	1751	1770	475
588587	48	67	エクソン 1	TCCCGGAACATCCAAGCGGG	14	1769	1788	476
588588	56	75	エクソン 1	CATCACTTCCCGGAACATC	18	1777	1796	477
588589	151	170	エクソン 1	CTGGTACATTCCCTTCCCC	59	1872	1891	478
588590	157	176	エクソン 1	CTAGACCTGGTCACATTCCC	59	1878	1897	479
588591	339	358	エクソン 1 -2 接合 部	GGAGTGGTGGTCACACCTCC	45	n/a	n/a	480
588592	384	403	エクソン 2	ACCCCTCCAGAGAGCAGGA	39	2192	2211	481

30

40

【 1 2 9 7 】

50

【表 1 2 5 - 2】

588593	390	409	エクソン2	ATCTCTACCCCCTCCAGAGA	29	2198	2217	482
588594	467	486	エクソン2	GGTACGGGTAGAAGCCAGAA	47	2275	2294	483
588595	671	690	エクソン3	GGAGAGTGTAACCGTCATAG	44	2879	2898	484
588596	689	708	エクソン3	TGCGATTGGCAGAGCCCCGG	43	2897	2916	638
588597	695	714	エクソン3	GGCAGGTGCGATTGGCAGAG	34	2903	2922	486
588598	707	726	エクソン3	GGCCATTCACTTGGCAGGTG	17	2915	2934	487
588599	738	757	エクソン3	TTGTCACAGATCGCTGTCTG	37	2946	2965	488
588600	924	943	エクソン3 -4 接合部	AAGGAGTCTTGGCAGGAAGG	18	n/a	n/a	489
588601	931	950	エクソン3 -4 接合部	GTACATGAAGGAGTCTTGGC	32	n/a	n/a	490
588602	959	978	エクソン5	AAGCTTCGGCCACCTCTTGA	45	3542	3561	491
588603	1089	1108	エクソン6	CCATCTAGCACCAGGTAGAT	52	3773	3792	492
588604	1108	1127	エクソン6	GGCCCAATGCTGTCTGATC	39	3792	3811	493
588606	1150	1169	エクソン6	AATTAAGTTGACTAGACACT	37	3834	3853	494
588608	1162	1181	エクソン6 -7 接合部	TGCCACCTTCTCAATTAAGT	21	n/a	n/a	648
588578	1167	1186	エクソン6 -7 接合部	TAACCTGCCACCTTCTCAAT	22	n/a	n/a	496
588579	1169	1188	エクソン6 -7 接合部	CATAACTGCCACCTTCTCA	21	n/a	n/a	497
532692	1171	1190	エクソン6 -7 接合部	ACCATAACTGCCACCTTCT	56	n/a	n/a	90
588580	1173	1192	エクソン6 -7 接合部	ACACCATAACTGCCACCTT	50	n/a	n/a	498
588581	1175	1194	エクソン7	TCACACCATAACTGCCACC	50	4151	4170	499
588610	1319	1338	エクソン8	TAGTCCCTGACTTCAACTTG	47	4612	4631	500
588612	1325	1344	エクソン8	TGGTGTAGTCCCTGACTTC	47	4618	4637	501
588614	1396	1415	エクソン8	GCGGTTCCAGCCTTCAGGAG	51	4689	4708	502
588616	1421	1440	エクソン8	TCATGAGGATGATGACATGG	18	4714	4733	503
588618	1446	1465	エクソン9	CCGCCATGTTGTGCAATCC	40	5020	5039	504
588620	1458	1477	エクソン9	GTAATTGGGTCCCCGCCAT	40	5032	5051	505
588623	1482	1501	エクソン9	AAGTCCCGGATCTCATCAAT	45	5056	5075	506
588624	1542	1561	エクソン9 -10 接合部	AACACATAGACATCCAGATA	43	n/a	n/a	507

10

20

30

40

【 1 2 9 8 】

50

【表 1 2 5 - 3】

588626	1585	1604	エクソン 10	CAAAGCATTGATGTTCACTT	45	5234	5253	508
588628	1621	1640	エクソン 10	TTTGAACACATGTTGCTCAT	53	5270	5289	509
588631	1646	1665	エクソン 10	CTTCCAGGTTTTCCATATCC	56	5295	5314	510
588632	1647	1666	エクソン 10	TCTTCCAGGTTTTCCATATC	35	5296	5315	511
588634	1689	1708	エクソン 11	AGACTCAGAGACTGGCTTTC	55	5830	5849	512
588636	1749	1768	エクソン 11	GCCTGCCATGGTTGCTTGTG	78	5890	5909	513
588638	1763	1782	エクソン 11	TGACTGAGATCTTGGCCTGC	95	5904	5923	514
588640	1912	1931	エクソン 13	TTCTATCTCCAGGTCCCGCT	44	6406	6425	515
588642	1982	2001	エクソン 13	AGTCATAAAATTCAGGAATT	40	6476	6495	516
588645	2073	2092	エクソン 14	CGAGTTGTTCCCTCGGTGCA	57	6662	6681	517
588646	2085	2104	エクソン 14	AGCCTCAAAGCTCGAGTTGT	48	6674	6693	518
588648	2091	2110	エクソン 14	GGAGGAAGCCTCAAAGCTCG	40	6680	6699	519
588651	2097	2116	エクソン 14	GTAGTTGGAGGAAGCCTCAA	43	6686	6705	520
588652	2103	2122	エクソン 14	CAAGTGGTAGTTGGAGGAAG	13	6692	6711	521
588654	2166	2185	エクソン 15	TCCTCAGACACAAACAGAGC	55	6954	6973	522
588656	2172	2191	エクソン 15	TTCTCCTCCTCAGACACAAA	44	6960	6979	523
588658	2196	2215	エクソン 15	TAGACCTCCTTCCGAGTCAG	50	6984	7003	524
588660	2202	2221	エクソン 15	TTGATGTAGACCTCCTTCCG	27	6990	7009	525
588582	2219	2238	エクソン 15 -16 接合部	CTTCTTATCCCCATTCTTG	49	n/a	n/a	526

10

20

30

40

【 1 2 9 9 】

50

【表 1 2 5 - 4】

588583	2221	2240	エクソン 15 -16 接合部	GCCTTTCTTATCCCCATTCT	41	n/a	n/a	527
532775	2223	2242	エクソン 15 -16 接合部	CTGCCTTTCTTATCCCCATT	41	n/a	n/a	203
588584	2225	2244	エクソン 15 -16 接合部	AGCTGCCTTTCTTATCCCCA	43	n/a	n/a	528
588662	2226	2245	エクソン 15 -16 接合部	CAGCTGCCTTTCTTATCCCC	52	n/a	n/a	529
588585	2227	2246	エクソン 15 -16 接合部	ACAGCTGCCTTTCTTATCCC	39	n/a	n/a	530
588664	2238	2257	エクソン 16	GCATCTCTCTCACAGCTGCC	69	7122	7141	531
588666	2276	2295	エクソン 16	AGATGTCCTTGACTTTGTCA	46	7160	7179	532
588668	2330	2349	エクソン 16	CAGCATAGGGACTCACTCCT	47	7214	7233	533
588670	2361	2380	エクソン 16 -17 接合部	CCGCCAGAATCACCTCTGCA	58	n/a	n/a	534
588672	2397	2416	エクソン 17	TGAATGAAACGACTTCTCTT	48	7362	7381	535
588674	2430	2449	エクソン 18	ACATCCACTACTCCCCAGCT	29	7665	7684	536
588676	2448	2467	エクソン 18	CGCTTCTGGTTTTTGCAGAC	58	7683	7702	537
588678	2454	2473	エクソン 18	TTTTGCCGCTTCTGGTTTTT	45	7689	7708	538
588680	2466	2485	エクソン 18	GCAGGTACCTGCTTTTGCCG	36	7701	7720	539
588682	2532	2551	エクソン 18	TCTTGGAGTTTCTCCTTCAG	47	7767	7786	540
532811	2599	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAATTCAATCCC	96	7834	7853	239
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	96	7839	7858	317

【 1 3 0 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 1】

表 1 3 4 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とする MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列 番号1 開始 部位	配列番 号1 終止部 位	標的領域	配列	% 阻害	配列 番号 2 開始 部位	配列 番号 2 終止 部位	モチーフ	配列 番号
598973	2552	2568	エクソン 18	GAAAACCCAAATCCTCA	40	7787	7803	3-10-4	619
599036	2552	2568	エクソン 18	GAAAACCCAAATCCTCA	18	7787	7803	5-7-5	619
598974	2553	2569	エクソン 18	AGAAAACCCAAATCCTC	28	7788	7804	3-10-4	620
599037	2553	2569	エクソン 18	AGAAAACCCAAATCCTC	19	7788	7804	5-7-5	620
598975	2554	2570	エクソン 18	TAGAAAACCCAAATCCT	15	7789	7805	3-10-4	621
599038	2554	2570	エクソン 18	TAGAAAACCCAAATCCT	32	7789	7805	5-7-5	621
598976	2555	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCAAATCC	12	7790	7806	3-10-4	622
599039	2555	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCAAATCC	7	7790	7806	5-7-5	622
598977	2557	2573	エクソン 18	TTATAGAAAACCCAAAT	13	7792	7808	3-10-4	623
599040	2557	2573	エクソン 18	TTATAGAAAACCCAAAT	13	7792	7808	5-7-5	623
598978	2558	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAACCCAAA	0	7793	7809	3-10-4	624
599041	2558	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAACCCAAA	0	7793	7809	5-7-5	624
598979	2559	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAACCCAA	8	7794	7810	3-10-4	625
599042	2559	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAACCCAA	19	7794	7810	5-7-5	625
598980	2560	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAAACCCA	42	7795	7811	3-10-4	626
599043	2560	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAAACCCA	10	7795	7811	5-7-5	626

【 1 3 0 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 2】

598981	2561	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAACCC	20	7796	7812	3-10-4	627
599044	2561	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAACCC	12	7796	7812	5-7-5	627
598982	2562	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGAAAACC	10	7797	7813	3-10-4	628
599045	2562	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGAAAACC	3	7797	7813	5-7-5	628
598983	2563	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAGAAAAC	0	7798	7814	3-10-4	629
599046	2563	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAGAAAAC	18	7798	7814	5-7-5	629
598984	2564	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATAGAAAA	0	7799	7815	3-10-4	630
599047	2564	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATAGAAAA	7	7799	7815	5-7-5	630
598985	2565	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTATAGAAA	0	7800	7816	3-10-4	631
599048	2565	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTATAGAAA	9	7800	7816	5-7-5	631
598986	2566	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTATAGAA	0	7801	7817	3-10-4	632
599049	2566	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTATAGAA	18	7801	7817	5-7-5	632
598988	2567	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTTATAGA	0	7802	7818	3-10-4	633
599050	2567	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTTATAGA	8	7802	7818	5-7-5	633
598989	2568	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCTTATAG	0	7803	7819	3-10-4	634
598990	2569	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCCCTTATA	8	7804	7820	3-10-4	635
598991	2570	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCCCTTAT	25	7805	7821	3-10-4	636
598992	2571	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAACCCCTTA	12	7806	7822	3-10-4	637
598993	2572	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAACCCCTT	37	7807	7823	3-10-4	638

【 1 3 0 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 3】

598994	2573	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAAACCCCT	29	7808	7824	3-10-4	639
598995	2574	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGAAACCCC	42	7809	7825	3-10-4	640
598996	2575	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGAAACCC	36	7810	7826	3-10-4	641
598997	2576	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAGGAAACC	18	7811	7827	3-10-4	642
598998	2577	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAGGAAAC	27	7812	7828	3-10-4	643
598999	2578	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCAGGAAA	61	7813	7829	3-10-4	644
599000	2580	2596	エクソン 18	GCCCCTGTCCAGCAGGA	71	7815	7831	3-10-4	645
599001	2581	2597	エクソン 18	CGCCCCTGTCCAGCAGG	80	7816	7832	3-10-4	646
599002	2582	2598	エクソン 18	ACGCCCCTGTCCAGCAG	68	7817	7833	3-10-4	647
599003	2583	2599	エクソン 18	CACGCCCCTGTCCAGCA	71	7818	7834	3-10-4	648
599004	2584	2600	エクソン 18	CCACGCCCCTGTCCAGC	76	7819	7835	3-10-4	649
599005	2585	2601	エクソン 18	CCCACGCCCCTGTCCAG	70	7820	7836	3-10-4	650
599006	2586	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCCTGTCCA	65	7821	7837	3-10-4	651
599007	2587	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCCTGTCC	60	7822	7838	3-10-4	652
599008	2588	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCCTGTC	72	7823	7839	3-10-4	653
599009	2589	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCCTGT	79	7824	7840	3-10-4	654
599010	2590	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCCTG	73	7825	7841	3-10-4	655
599011	2591	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCCCT	79	7826	7842	3-10-4	656
599012	2592	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCACGCCCC	67	7827	7843	3-10-4	657

10

20

30

40

【 1 3 0 3 】

50

【表 1 2 6 - 4】

599013	2593	2609	エクソン 18	AATTCAATCCCACGCC	65	7828	7844	3-10-4	658
599014	2594	2610	エクソン 18	TAATTCAATCCCACGCC	74	7829	7845	3-10-4	659
599015	2595	2611	エクソン 18	TTAATTCAATCCCACGC	71	7830	7846	3-10-4	660
599016	2596	2612	エクソン 18	TTTAATTCAATCCCACG	48	7831	7847	3-10-4	661
599017	2597	2613	エクソン 18	TTTTAATTCAATCCCAC	34	7832	7848	3-10-4	662
599018	2598	2614	エクソン 18	GTTTTAATTCAATCCCA	56	7833	7849	3-10-4	663
599019	2599	2615	エクソン 18	TGTTTTAATTCAATCCC	60	7834	7850	3-10-4	664
599020	2600	2616	エクソン 18	CTGTTTTAATTCAATCC	0	7835	7851	3-10-4	665
599021	2601	2617	エクソン 18	GCTGTTTTAATTCAATC	33	7836	7852	3-10-4	666
599022	2602	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAATTCAAT	17	7837	7853	3-10-4	667
599023	2603	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTTAATTCAA	52	7838	7854	3-10-4	668
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	86	7839	7858	5-10-5	317
599024	2604	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTTAATTCA	88	7839	7855	3-10-4	669
599025	2605	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTTAATTC	85	7840	7856	3-10-4	670
599026	2606	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTTTAATF	69	7841	7857	3-10-4	671
599027	2607	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTTAAT	77	7842	7858	3-10-4	672
599028	2608	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTTAA	73	7843	7859	3-10-4	673
599029	2609	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTTA	78	7844	7860	3-10-4	674
599030	2610	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTTTT	75	7845	7861	3-10-4	675

【 1 3 0 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 6 - 5】

599031	2611	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGTTT	77	7846	7862	3-10-4	676
599032	2612	2628	エクソン 18 / リピ ート	TTGTTGTCGCAGCTGTT	79	n/a	n/a	3-10-4	677
599033	2613	2629	エクソン 18 / リピ ート	TTTGTGTCGCAGCTGT	80	n/a	n/a	3-10-4	678
599034	2614	2630	エクソン 18 / リピ ート	TTTTGTGTCGCAGCTG	78	n/a	n/a	3-10-4	679
599035	2615	2631	エクソン 18 / リピ ート	TTTTTGTGTCGCAGCT	63	n/a	n/a	3-10-4	680

10

【 1 3 0 5 】

【表 1 2 7 - 1】

表 1 3 5 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とする MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

20

ISIS 番号	配列番 号1 開始部 位	配列番号 1 終止部位	標的領域	配列	% 阻 害	配列 番号2 開始 部位	配列 番号2 終止 部位	モチー フ	配 列 番 号
599098	2552	2568	エクソン 18	GAAAACCCAAATCCTCA	57	7787	7803	4-8-5	619
599099	2553	2569	エクソン 18	AGAAAACCCAAATCCTC	33	7788	7804	4-8-5	620
599100	2554	2570	エクソン 18	TAGAAAACCCAAATCCT	32	7789	7805	4-8-5	621
599101	2555	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCAAATCC	47	7790	7806	4-8-5	622
599102	2557	2573	エクソン 18	TTATAGAAAACCCAAAT	59	7792	7808	4-8-5	623
599103	2558	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAACCCAAA	10	7793	7809	4-8-5	624
599104	2559	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAACCCAA	3	7794	7810	4-8-5	625
599105	2560	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAAACCCA	45	7795	7811	4-8-5	626

30

40

【 1 3 0 6 】

50

【表 1 2 7 - 2】

599106	2561	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAACCC	49	7796	7812	4-8-5	627
599107	2562	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGAAAACC	35	7797	7813	4-8-5	628
599108	2563	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAGAAAAC	17	7798	7814	4-8-5	629
599109	2564	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATAGAAAA	36	7799	7815	4-8-5	630
599110	2565	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTATAGAAA	20	7800	7816	4-8-5	631
599111	2566	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTATAGAA	20	7801	7817	4-8-5	632
599112	2567	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTTATAGA	15	7802	7818	4-8-5	633
599113	2568	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCTTATAG	19	7803	7819	4-8-5	634
599051	2568	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCTTATAG	26	7803	7819	5-7-5	634
599114	2569	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCCCTTATA	18	7804	7820	4-8-5	635
599052	2569	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCCCTTATA	21	7804	7820	5-7-5	635
599115	2570	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCCCTTAT	31	7805	7821	4-8-5	636
599053	2570	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCCCTTAT	25	7805	7821	5-7-5	636
599116	2571	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAACCCCTTA	39	7806	7822	4-8-5	637
599054	2571	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAACCCCTTA	36	7806	7822	5-7-5	637
599117	2572	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAACCCCTT	46	7807	7823	4-8-5	638
599055	2572	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAACCCCTT	22	7807	7823	5-7-5	638
599118	2573	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAAACCCCT	40	7808	7824	4-8-5	639
599056	2573	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAAACCCCT	32	7808	7824	5-7-5	639

【 1 3 0 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 7 - 3】

599119	2574	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGAAACCCC	50	7809	7825	4-8-5	640
599057	2574	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGAAACCCC	46	7809	7825	5-7-5	640
599120	2575	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGAAACCC	30	7810	7826	4-8-5	641
599058	2575	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGAAACCC	52	7810	7826	5-7-5	641
599121	2576	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAGGAAACC	31	7811	7827	4-8-5	642
599059	2576	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAGGAAACC	24	7811	7827	5-7-5	642
599122	2577	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAGGAAAC	23	7812	7828	4-8-5	643
599060	2577	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAGGAAAC	37	7812	7828	5-7-5	643
599123	2578	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCAGGAAA	51	7813	7829	4-8-5	644
599061	2578	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCAGGAAA	34	7813	7829	5-7-5	644
599124	2580	2596	エクソン 18	GCCCCCTGTCCAGCAGGA	56	7815	7831	4-8-5	645
599062	2580	2596	エクソン 18	GCCCCCTGTCCAGCAGGA	51	7815	7831	5-7-5	645
599125	2581	2597	エクソン 18	CGCCCCCTGTCCAGCAGG	70	7816	7832	4-8-5	646
599063	2581	2597	エクソン 18	CGCCCCCTGTCCAGCAGG	56	7816	7832	5-7-5	646
599126	2582	2598	エクソン 18	ACGCCCCCTGTCCAGCAG	76	7817	7833	4-8-5	647
599064	2582	2598	エクソン 18	ACGCCCCCTGTCCAGCAG	61	7817	7833	5-7-5	647
599127	2583	2599	エクソン 18	CACGCCCCCTGTCCAGCA	67	7818	7834	4-8-5	648
599065	2583	2599	エクソン 18	CACGCCCCCTGTCCAGCA	64	7818	7834	5-7-5	648
599066	2584	2600	エクソン 18	CCACGCCCCCTGTCCAGC	40	7819	7835	5-7-5	649

10

20

30

40

【 1 3 0 8 】

50

【表 1 2 7 - 4】

599067	2585	2601	エクソン 18	CCCACGCCCTGTCCAG	37	7820	7836	5-7-5	650
599068	2586	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCTGTCCA	31	7821	7837	5-7-5	651
599069	2587	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCTGTCC	39	7822	7838	5-7-5	652
599070	2588	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCTGTC	59	7823	7839	5-7-5	653
599071	2589	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCTGT	63	7824	7840	5-7-5	657
599072	2590	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCTG	74	7825	7841	5-7-5	655
599073	2591	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCCT	53	7826	7842	5-7-5	656
599074	2592	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCACGCCCC	56	7827	7843	5-7-5	657
599075	2593	2609	エクソン 18	AATTCAATCCCACGCCC	49	7828	7844	5-7-5	658
599076	2594	2610	エクソン 18	TAATTCAATCCCACGCC	54	7829	7845	5-7-5	659
599077	2595	2611	エクソン 18	TTAATTCAATCCCACGC	79	7830	7846	5-7-5	660
599078	2596	2612	エクソン 18	TTTAATTCAATCCCACG	67	7831	7847	5-7-5	661
599079	2597	2613	エクソン 18	TTTTAATTCAATCCCAC	69	7832	7848	5-7-5	662
599080	2598	2614	エクソン 18	GTTTTAATTCAATCCCA	79	7833	7849	5-7-5	663
599081	2599	2615	エクソン 18	TGTTTTAATTCAATCCC	57	7834	7850	5-7-5	664
599082	2600	2616	エクソン 18	CTGTTTTAATTCAATCC	50	7835	7851	5-7-5	665
599083	2601	2617	エクソン 18	GCTGTTTTAATTCAATC	67	7836	7852	5-7-5	666
599084	2602	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAATTCAAT	60	7837	7853	5-7-5	667
599085	2603	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTTAATTCAA	71	7838	7854	5-7-5	668

【 1 3 0 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 7 - 5】

532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTAAATTCA	82	7839	7858	5-10-5	317
599086	2604	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTAAATTCA	81	7839	7855	5-7-5	669
599087	2605	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTAAATTC	88	7840	7856	5-7-5	670
599088	2606	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTTAAATT	84	7841	7857	5-7-5	671
599089	2607	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTAAAT	81	7842	7858	5-7-5	672
599090	2608	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTAA	77	7843	7859	5-7-5	673
599091	2609	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTA	74	7844	7860	5-7-5	674
599092	2610	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTTTT	66	7845	7861	5-7-5	675
599093	2611	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGTTT	89	7846	7862	5-7-5	676
599094	2612	2628	エクソン 18/リピ ート	TTGTTGTCGCAGCTGTT	82	n/a	n/a	5-7-5	677
599095	2613	2629	エクソン 18/リピ ート	TTTGTGTCGCAGCTGT	87	n/a	n/a	5-7-5	678
599096	2614	2630	エクソン 18/リピ ート	TTTTGTGTCGCAGCTG	85	n/a	n/a	5-7-5	679
599097	2615	2631	エクソン 18/リピ ート	TTTTTGTGTCGCAGCT	78	n/a	n/a	5-7-5	680

【 1 3 1 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 8 - 1】

表 1 3 6 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とする MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列 番号 1 開始 部位	配列 番号 1 終止 部位	標的領域	配列	% 阻 害	配列番 号2 開始部 位	配列番 号2 終止部 位	モ チ ーフ	配 列 番 号
599510	2552	2570	エクソン 18	TAGAAAACCCAAATCCTCA	45	7787	7805	5-9-5	681
599331	2553	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCAAATCCTC	46	7788	7806	5-9-5	682
599332	2554	2572	エクソン 18	TATAGAAAACCCAAATCCT	38	7789	7807	5-9-5	683
599333	2556	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAACCCAAATC	1	7791	7809	5-9-5	684
599334	2557	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAACCCAAAT	5	7792	7810	5-9-5	685
599335	2558	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAAACCCAAA	34	7793	7811	5-9-5	686
599336	2559	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAACCCAA	40	7794	7812	5-9-5	687
599337	2560	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGAAAACCCA	39	7795	7813	5-9-5	688
599338	2561	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAGAAAACCC	57	7796	7814	5-9-5	689
599339	2562	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATAGAAAACC	26	7797	7815	5-9-5	690
599281	2562	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATAGAAAACC	15	7797	7815	6-7-6	690
599340	2563	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTATAGAAAAC	17	7798	7816	5-9-5	691
599282	2563	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTATAGAAAAC	12	7798	7816	6-7-6	691
599341	2564	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTATAGAAAA	23	7799	7817	5-9-5	692
599283	2564	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTATAGAAAA	18	7799	7817	6-7-6	692
599342	2565	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTTATAGAAA	10	7800	7818	5-9-5	693
599284	2565	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTTATAGAAA	14	7800	7818	6-7-6	693
599343	2566	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCTTATAGAA	10	7801	7819	5-9-5	694
599285	2566	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCTTATAGAA	13	7801	7819	6-7-6	694
599344	2567	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCCCTTATAGA	22	7802	7820	5-9-5	695
599286	2567	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCCCTTATAGA	31	7802	7820	6-7-6	695
599345	2568	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCCCTTATAG	19	7803	7821	5-9-5	696
599287	2568	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCCCTTATAG	12	7803	7821	6-7-6	696
599346	2569	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAACCCCTTATA	30	7804	7822	5-9-5	697
599288	2569	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAACCCCTTATA	28	7804	7822	6-7-6	697
599347	2570	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAACCCCTTAT	46	7805	7823	5-9-5	698
599289	2570	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAACCCCTTAT	32	7805	7823	6-7-6	698
599348	2571	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAAACCCCTTA	44	7806	7824	5-9-5	699
599290	2571	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAAACCCCTTA	24	7806	7824	6-7-6	699
599349	2572	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGAAACCCCTT	60	7807	7825	5-9-5	700
599291	2572	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGAAACCCCTT	38	7807	7825	6-7-6	700
599350	2573	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGAAACCCCT	49	7808	7826	5-9-5	701

【 1 3 1 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 8 - 2】

599292	2573	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGAAACCCCT	35	7808	7826	6-7-6	701
599351	2575	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAGGAAACCC	46	7810	7828	5-9-5	702
599293	2575	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAGGAAACCC	12	7810	7828	6-7-6	702
599352	2576	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCAGGAAACC	49	7811	7829	5-9-5	703
599294	2576	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCAGGAAACC	38	7811	7829	6-7-6	703
599353	2577	2595	エクソン 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAAC	64	7812	7830	5-9-5	704
599295	2577	2595	エクソン 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAAC	33	7812	7830	6-7-6	704
599354	2578	2596	エクソン 18	GCCCTGTCCAGCAGGAAA	56	7813	7831	5-9-5	705
599296	2578	2596	エクソン 18	GCCCTGTCCAGCAGGAAA	13	7813	7831	6-7-6	705
599355	2580	2598	エクソン 18	ACGCCCTGTCCAGCAGGA	81	7815	7833	5-9-5	706
599297	2580	2598	エクソン 18	ACGCCCTGTCCAGCAGGA	57	7815	7833	6-7-6	706
599356	2581	2599	エクソン 18	CACGCCCTGTCCAGCAGG	64	7816	7834	5-9-5	707
599298	2581	2599	エクソン 18	CACGCCCTGTCCAGCAGG	39	7816	7834	6-7-6	707
599299	2582	2600	エクソン 18	CCACGCCCTGTCCAGCAG	55	7817	7835	6-7-6	708
599300	2583	2601	エクソン 18	CCCACGCCCTGTCCAGCA	45	7818	7836	6-7-6	709
599301	2584	2602	エクソン 18	TCCACGCCCTGTCCAGC	39	7819	7837	6-7-6	710
599302	2585	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCTGTCCAG	27	7820	7838	6-7-6	711
599303	2586	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCTGTCCA	35	7821	7839	6-7-6	712
599304	2587	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCTGTCC	16	7822	7840	6-7-6	713
599305	2588	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCTGTC	41	7823	7841	6-7-6	714
599306	2589	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCCTGT	70	7824	7842	6-7-6	715
599307	2590	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCACGCCCTG	66	7825	7843	6-7-6	716
599308	2591	2609	エクソン 18	AATTCAATCCCACGCCCT	68	7826	7844	6-7-6	717
599309	2592	2610	エクソン 18	TAATTCAATCCCACGCCCC	52	7827	7845	6-7-6	718
599310	2593	2611	エクソン 18	TTAATTCAATCCCACGCCC	39	7828	7846	6-7-6	719
599311	2594	2612	エクソン 18	TTTAATTCAATCCCACGCC	83	7829	7847	6-7-6	720
599312	2595	2613	エクソン 18	TTTTAATTCAATCCCACGC	72	7830	7848	6-7-6	721
599313	2596	2614	エクソン 18	GTTTAATTCAATCCCACG	86	7831	7849	6-7-6	722
599314	2597	2615	エクソン 18	TGTTTAATTCAATCCCAC	91	7832	7850	6-7-6	723
599315	2598	2616	エクソン 18	CTGTTTAATTCAATCCCA	71	7833	7851	6-7-6	724
599316	2599	2617	エクソン 18	GCTGTTTAATTCAATCCC	89	7834	7852	6-7-6	725
599317	2600	2618	エクソン 18	AGCTGTTTAATTCAATCC	87	7835	7853	6-7-6	726
599318	2601	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTAATTCAATC	81	7836	7854	6-7-6	727
599319	2602	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTAATTCAAT	75	7837	7855	6-7-6	728
599320	2603	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTAATTCAA	84	7838	7856	6-7-6	729
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGAGCTGTTTAATTCA	92	7839	7858	5-10-5	317
599321	2604	2622	エクソン 18	TCGAGCTGTTTAATTCA	90	7839	7857	6-7-6	730

10

20

30

40

【 1 3 1 2 】

50

【表 1 2 8 - 3】

599322	2605	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTAAATTC	89	7840	7858	6-7-6	731
599323	2606	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTAAATT	81	7841	7859	6-7-6	732
599324	2607	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTAAAT	68	7842	7860	6-7-6	733
599325	2608	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTTTAA	71	7843	7861	6-7-6	734
599326	2609	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTAA	52	7844	7862	6-7-6	735
599327	2610	2628	エクソン 18 ／リピート	TTGTTGTCGCAGCTGTTTT	88	n/a	n/a	6-7-6	736
599328	2611	2629	エクソン 18 ／リピート	TTTGTGTCGCAGCTGTTTT	87	n/a	n/a	6-7-6	737
599329	2612	2630	エクソン 18 ／リピート	TTTTGTGTCGCAGCTGTTT	84	n/a	n/a	6-7-6	738
599330	2613	2631	エクソン 18 ／リピート	TTTTTGTGTCGCAGCTGTT	87	n/a	n/a	6-7-6	739

10

【 1 3 1 3 】

【表 1 2 9 - 1】

表 1 3 7 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とする MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

20

ISIS 番号	配列 番号1 開始 部位	配列 番号1 終止 部位	標的領域	配列	% 阻害	配列 番号2 開始 部位	配列 番号2 終止 部位	モチーフ	配列 番号
599512	2552	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCAAATCCTC A	74	7787	7806	3-10-7	410
599449	2553	2572	エクソン 18	TATAGAAAACCCAAATCCTC	43	7788	7807	3-10-7	411
599450	2554	2573	エクソン 18	TTATAGAAAACCCAAATCCT	51	7789	7808	3-10-7	412
599451	2555	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAACCCAAATCC	35	7790	7809	3-10-7	413
599452	2556	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAACCCAAATC	34	7791	7810	3-10-7	414
599453	2557	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAAACCCAAAT	44	7792	7811	3-10-7	415
599454	2558	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAACCCAA A	54	7793	7812	3-10-7	416
599455	2559	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGAAAACCCA A	53	7794	7813	3-10-7	417

30

40

【 1 3 1 4 】

50

【表 1 2 9 - 2】

599456	2560	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAGAAAACCCA	69	7795	7814	3-10-7	418
599457	2561	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATAGAAAACCC	46	7796	7815	3-10-7	419
599458	2562	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTATAGAAAACC	0	7797	7816	3-10-7	420
599459	2563	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTATAGAAAAC	12	7798	7817	3-10-7	421
599460	2564	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTTATAGAAAA	17	7799	7818	3-10-7	422
599461	2565	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCTTATAGAAA	24	7800	7819	3-10-7	423
599462	2566	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCCCTTATAGAA	33	7801	7820	3-10-7	424
599463	2567	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCCCTTATAGA	38	7802	7821	3-10-7	425
599464	2568	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAACCCCTTATAG	33	7803	7822	3-10-7	426
599465	2569	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAACCCCTTATA	49	7804	7823	3-10-7	427
599466	2570	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAAACCCCTTAT	45	7805	7824	3-10-7	428
599467	2571	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGAAACCCCTTA	60	7806	7825	3-10-7	237
599468	2572	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGAAACCCCTT	61	7807	7826	3-10-7	429
599469	2573	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAGGAAACCCCT	52	7808	7827	3-10-7	430
599470	2574	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAGGAAACCCC	45	7809	7828	3-10-7	431
599471	2575	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCAGGAAACCC	67	7810	7829	3-10-7	432
599472	2576	2595	エクソン 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAACC	79	7811	7830	3-10-7	433
599473	2577	2596	エクソン 18	GCCCCTGTCCAGCAGGAAA C	72	7812	7831	3-10-7	238
599474	2578	2597	エクソン 18	CGCCCCTGTCCAGCAGGAA A	87	7813	7832	3-10-7	434

10

20

30

40

【 1 3 1 5 】

50

【表 1 2 9 - 3】

599475	2579	2598	エクソン 18	ACGCCCTGTCCAGCAGGA A	76	7814	7833	3-10-7	435
599476	2580	2599	エクソン 18	CACGCCCTGTCCAGCAGGA	81	7815	7834	3-10-7	436
599477	2581	2600	エクソン 18	CCACGCCCTGTCCAGCAGG	83	7816	7835	3-10-7	437
599478	2582	2601	エクソン 18	CCCACGCCCTGTCCAGCAG	72	7817	7836	3-10-7	438
599479	2583	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCTGTCCAGCA	81	7818	7837	3-10-7	439
599480	2584	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCTGTCCAGC	77	7819	7838	3-10-7	440
599481	2585	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCTGTCCAG	83	7820	7839	3-10-7	441
599482	2586	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCTGTCCA	87	7821	7840	3-10-7	442
599483	2587	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCTGTCC	90	7822	7841	3-10-7	443
599484	2588	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCCTGTC	72	7823	7842	3-10-7	444
599485	2589	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCACGCCCTGT	82	7824	7843	3-10-7	445
599486	2590	2609	エクソン 18	AATTCAATCCCACGCCCTG	84	7825	7844	3-10-7	446
599487	2591	2610	エクソン 18	TAATTCAATCCCACGCCCT	84	7826	7845	3-10-7	447
599488	2592	2611	エクソン 18	TTAATTCAATCCCACGCCCC	87	7827	7846	3-10-7	448
599489	2593	2612	エクソン 18	TTTAATTCAATCCCACGCCC	87	7828	7847	3-10-7	449
599490	2594	2613	エクソン 18	TTTTAATTCAATCCCACGCC	86	7829	7848	3-10-7	450
599491	2595	2614	エクソン 18	GTTTAAATTCAATCCCACGC	87	7830	7849	3-10-7	451
599492	2596	2615	エクソン 18	TGTTTAAATTCAATCCCACG	88	7831	7850	3-10-7	452
599493	2597	2616	エクソン 18	CTGTTTAAATTCAATCCCAC	75	7832	7851	3-10-7	453

【 1 3 1 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 9 - 4】

599433	2597	2616	エクソン 18	CTGTTTTAATTCAATCCCAC	89	7832	7851	6-8-6	453
599494	2598	2617	エクソン 18	GCTGTTTTAATTCAATCCCA	90	7833	7852	3-10-7	454
599434	2598	2617	エクソン 18	GCTGTTTTAATTCAATCCCA	89	7833	7852	6-8-6	454
599495	2599	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAATTCAATCCC	88	7834	7853	3-10-7	239
599435	2599	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAATTCAATCCC	91	7834	7853	6-8-6	239
599496	2600	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTTAATTCAATCC	89	7835	7854	3-10-7	455
599436	2600	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTTAATTCAATCC	89	7835	7854	6-8-6	455
599497	2601	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTTAATTCAATC	89	7836	7855	3-10-7	456
599437	2601	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTTAATTCAATC	91	7836	7855	6-8-6	456
599498	2602	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTTAATTCAAT	88	7837	7856	3-10-7	457
599438	2602	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTTAATTCAAT	90	7837	7856	6-8-6	457
599499	2603	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTTTAATTCAA	81	7838	7857	3-10-7	458
599439	2603	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTTTAATTCAA	88	7838	7857	6-8-6	458
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	90	7839	7858	5-10-5	317
599500	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	88	7839	7858	3-10-7	317
599440	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	88	7839	7858	6-8-6	317
599501	2605	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTTAATTC	78	7840	7859	3-10-7	459
599441	2605	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTTAATTC	90	7840	7859	6-8-6	459
599502	2606	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTTAATT	87	7841	7860	3-10-7	460

10

20

30

40

【 1 3 1 7 】

50

【表 1 2 9 - 5】

599442	2606	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTAAAT	76	7841	7860	6-8-6	460
599503	2607	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTTTAAAT	83	7842	7861	3-10-7	461
599443	2607	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTTTAAAT	77	7842	7861	6-8-6	461
599504	2608	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTAA	89	7843	7862	3-10-7	395
599444	2608	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTAA	69	7843	7862	6-8-6	395
599505	2609	2628	エクソン 19／リビ ート	TTGTTGTCGCAGCTGTTTAA	83	n/a	n/a	3-10-7	462
599445	2609	2628	エクソン 19／リビ ート	TTGTTGTCGCAGCTGTTTAA	85	n/a	n/a	6-8-6	462
599506	2610	2629	エクソン 19／リビ ート	TTTGTTCGCAGCTGTTT	89	n/a	n/a	3-10-7	463
599446	2610	2629	エクソン 19／リビ ート	TTTGTTCGCAGCTGTTT	85	n/a	n/a	6-8-6	463
599507	2611	2630	エクソン 19／リビ ート	TTTTGTTGTCGCAGCTGTT	82	n/a	n/a	3-10-7	464
599447	2611	2630	エクソン 19／リビ ート	TTTTGTTGTCGCAGCTGTT	83	n/a	n/a	6-8-6	464
599508	2612	2631	エクソン 19／リビ ート	TTTTGTTGTCGCAGCTGTT	90	n/a	n/a	3-10-7	465
599448	2612	2631	エクソン 19／リビ ート	TTTTGTTGTCGCAGCTGTT	87	n/a	n/a	6-8-6	465

【 1 3 1 8 】

実施例 1 1 9 : M O E ギャップマーによる H e p G 2 細胞におけるヒト補体 B 因子 (C F B) のアンチセンス阻害

ヒト補体 B 因子 (C F B) 核酸を標的とする新たなアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、 C F B m R N A に対するそれらの効果をインビトロで試験した。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドを、培養条件が類似する一連の実験で試験した。各実験に関する結果を以下に示す別々の表に掲載する。1 ウェルあたり 2 0 , 0 0 0 細胞の密度の培養 H e p G 2 細胞を、エレクトロポレーションにより、2 , 0 0 0 n M アンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。約 2 4 時間の処理期間後に、細胞から R N A を単離し、定量リアルタイム P C R によって C F B m R N A レベルを測定した。ヒトプライマープロブセット R T S 3 4 5 9 を使って m R N A レベルを測定した。R I B O G R

10

20

30

40

50

E E N (登録商標) によって測定される全RNA含有量に従ってCFB mRNAレベルを調整した。結果を、無処理対照細胞との比較で、CFBの阻害パーセントとして表す。

【1319】

以下の表に示す新設計のキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、4-8-5MOE、5-8-5MOE、5-9-5MOE、5-10-5MOE、6-7-6MOE、3-10-5MOE、または6-8-6MOEギャップマーとして設計された。

【1320】

4-8-5MOEギャップマーは17ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは8個の2'-デオキシヌクレオシドで構成され、5'側と3'側にそれぞれ4個及び5個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5-8-5MOEギャップマーは18ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは8個の2'-デオキシヌクレオシドで構成され、5'側と3'側にそれぞれ5個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5-9-5MOEギャップマーは19ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは9個の2'-デオキシヌクレオシドで構成され、5'側と3'側にそれぞれ5個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5-10-5MOEギャップマーは20ヌクレオシド長であり、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で構成され、5'側と3'側にそれぞれ5個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。3-10-5MOEギャップマーは18ヌクレオシド長であり、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で構成され、5'側と3'側にそれぞれ3個及び5個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。6-7-6MOEギャップマーは19ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは7個の2'-デオキシヌクレオシドで構成され、5'側と3'側にそれぞれ6個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。6-8-6MOEギャップマーは20ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは8個の2'-デオキシヌクレオシドで構成され、5'側と3'側にそれぞれ6個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5'ウイングセグメント中の各ヌクレオシド及び3'ウイングセグメント中の各ヌクレオシドは2'-MOE修飾を有する。ヌクレオシド間連結部は、各ギャップマーの全体を通して、ホスホロチオエート(P=S)連結部である。シトシン残基は、各ギャップマーの全体を通してすべて、5-メチルシトシンである。

【1321】

「開始部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も5'側のヌクレオシドを示す。「終止部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も3'側のヌクレオシドを示す。以下の表に示す各ギャップマーは、本明細書において配列番号1と呼ぶヒトCFB mRNA (GENBANKアクセッション番号NM_001710.5) もしくは本明細書において配列番号2と呼ぶヒトCFBゲノム配列 (ヌクレオチド31852000から31861000までを切り出したGENBANKアクセッション番号NT_007592.15)、またはその両方を標的とする。「n/a」は、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドが当該特定遺伝子配列を100%の相補性では標的としないことを示す。

【1322】

10

20

30

40

50

【表 1 3 0 - 1】

表 1 3 8 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とする MOE ギャップマーによる CFB mR NA の阻害

ISIS 番号	配列 番号 1 開始 部位	配列 番号1 終 止 部位	標的領域	配列	% 阻 害	配列 番号2 開 始 部位	配列番 号2 終 止 部 位	モ チ ーフ	配 列 番 号
599160	2560	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAACCCA	26	7795	7812	5-8-5	740
599161	2561	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGAAAACCC	20	7796	7813	5-8-5	741
599162	2562	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAGAAAACC	12	7797	7814	5-8-5	742
599163	2563	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATAGAAAAC	11	7798	7815	5-8-5	743
599164	2564	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTATAGAAAA	11	7799	7816	5-8-5	744
599165	2566	2583	エクソン 18	AGGAAAACCCCTTATAGAA	0	7801	7818	5-8-5	745
599166	2567	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCTTATAGA	12	7802	7819	5-8-5	746
599167	2568	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCCCTTATAG	14	7803	7820	5-8-5	747
599168	2569	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCCCTTATA	16	7804	7821	5-8-5	748
599169	2570	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAACCCCTTAT	24	7805	7822	5-8-5	749
599170	2571	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAACCCCTTA	37	7806	7823	5-8-5	750
599171	2572	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAAACCCCTT	30	7807	7824	5-8-5	751
599172	2573	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGAAACCCCT	43	7808	7825	5-8-5	752
599173	2574	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGAAACCCC	47	7809	7826	5-8-5	753
599174	2575	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAGGAAACCC	27	7810	7827	5-8-5	754
599175	2576	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAGGAAACC	30	7811	7828	5-8-5	755
599176	2577	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCAGGAAAC	34	7812	7829	5-8-5	756
599177	2578	2595	エクソン 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAA	41	7813	7830	5-8-5	757
599178	2580	2597	エクソン 18	CGCCCCTGTCCAGCAGGA	67	7815	7832	5-8-5	758
599179	2581	2598	エクソン 18	ACGCCCTGTCCAGCAGG	61	7816	7833	5-8-5	759
599180	2582	2599	エクソン 18	CACGCCCTGTCCAGCAG	62	7817	7834	5-8-5	760
599181	2583	2600	エクソン 18	CCACGCCCTGTCCAGCA	63	7818	7835	5-8-5	761
599128	2584	2600	エクソン 18	CCACGCCCTGTCCAGC	55	7819	7835	4-8-5	649
599182	2584	2601	エクソン 18	CCCACGCCCTGTCCAGC	58	7819	7836	5-8-5	762
599129	2585	2601	エクソン 18	CCCACGCCCTGTCCAG	41	7820	7836	4-8-5	650
599183	2585	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCTGTCCAG	43	7820	7837	5-8-5	763
599130	2586	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCTGTCCA	46	7821	7837	4-8-5	651
599184	2586	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCTGTCCA	32	7821	7838	5-8-5	764
599131	2587	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCTGTCC	30	7822	7838	4-8-5	652
599185	2587	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCTGTCC	35	7822	7839	5-8-5	765
599132	2588	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCTGTC	52	7823	7839	4-8-5	653
599186	2588	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCTGTC	55	7823	7840	5-8-5	766

10

20

30

40

【 1 3 2 3 】

50

【表 1 3 0 - 2】

599133	2589	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCTGT	66	7824	7840	4-8-5	654
599187	2589	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCTGT	72	7824	7841	5-8-5	767
599134	2590	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCTG	80	7825	7841	4-8-5	655
599188	2590	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCCTG	92	7825	7842	5-8-5	768
599135	2591	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCCT	61	7826	7842	4-8-5	656
599189	2591	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCACGCCCT	52	7826	7843	5-8-5	769
599136	2592	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCACGCCCC	68	7827	7843	4-8-5	657
599190	2592	2609	エクソン 18	AATTCATCCCACGCCCC	62	7827	7844	5-8-5	770
599137	2593	2609	エクソン 18	AATTCATCCCACGCCCC	51	7828	7844	4-8-5	658
599191	2593	2610	エクソン 18	TAATTCATCCCACGCC	54	7828	7845	5-8-5	771
599138	2594	2610	エクソン 18	TAATTCATCCCACGCC	71	7829	7845	4-8-5	659
599192	2594	2611	エクソン 18	TTAATTCATCCCACGCC	66	7829	7846	5-8-5	772
599139	2595	2611	エクソン 18	TTAATTCATCCCACGC	80	7830	7846	4-8-5	660
599193	2595	2612	エクソン 18	TTAATTCATCCCACGC	74	7830	7847	5-8-5	773
599140	2596	2612	エクソン 18	TTAATTCATCCCACG	66	7831	7847	4-8-5	786
599194	2596	2613	エクソン 18	TTTAATTCATCCCACG	66	7831	7848	5-8-5	774
599141	2597	2613	エクソン 18	TTTAATTCATCCCAC	63	7832	7848	4-8-5	662
599195	2597	2614	エクソン 18	GTTTAATTCATCCCAC	86	7832	7849	5-8-5	775
599142	2598	2614	エクソン 18	GTTTAATTCATCCCA	69	7833	7849	4-8-5	663
599196	2598	2615	エクソン 18	TGTTTAATTCATCCCA	82	7833	7850	5-8-5	776
599143	2599	2615	エクソン 18	TGTTTAATTCATCCC	59	7834	7850	4-8-5	664
599197	2599	2616	エクソン 18	CTGTTTAATTCATCCC	79	7834	7851	5-8-5	777
599144	2600	2616	エクソン 18	CTGTTTAATTCATCC	52	7835	7851	4-8-5	665
599198	2600	2617	エクソン 18	GCTGTTTAATTCATCC	86	7835	7852	5-8-5	778
599145	2601	2617	エクソン 18	GCTGTTTAATTCATC	53	7836	7852	4-8-5	666
599199	2601	2618	エクソン 18	AGCTGTTTAATTCATC	72	7836	7853	5-8-5	779
599146	2602	2618	エクソン 18	AGCTGTTTAATTCAT	42	7837	7853	4-8-5	667
599200	2602	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTAATTCAT	76	7837	7854	5-8-5	780
599147	2603	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTAATTCAA	55	7838	7854	4-8-5	668
599201	2603	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTAATTCAA	87	7838	7855	5-8-5	781
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTAATTC A	93	7839	7858	5-10-5	317
599148	2604	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTAATTC	84	7839	7855	4-8-5	669
599202	2604	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTAATTC	89	7839	7856	5-8-5	782
599149	2605	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTAATTC	92	7840	7856	4-8-5	670
599203	2605	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTTAATTC	90	7840	7857	5-8-5	783
599150	2606	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTTAATT	75	7841	7857	4-8-5	671
599151	2607	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTAAT	80	7842	7858	4-8-5	672

10

20

30

40

【 1 3 2 4 】

50

【表 1 3 0 - 3】

599152	2608	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTAA	76	7843	7859	4-8-5	673
599153	2609	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTA	56	7844	7860	4-8-5	674
599154	2610	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTTT	85	7845	7861	4-8-5	675
599155	2611	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGTTT	89	7846	7862	4-8-5	676
599156	2612	2628	エクソン 18 ／リピート	TTGTTGTCGCAGCTGTT	83	n/a	n/a	4-8-5	813
599157	2613	2629	エクソン 18 ／リピート	TTTGTGTCGCAGCTGT	78	n/a	n/a	4-8-5	678
599158	2614	2630	エクソン 18 ／リピート	TTTTGTGTCGCAGCTG	83	n/a	n/a	4-8-5	679
599159	2615	2631	エクソン 18 ／リピート	TTTTTGTGTCGCAGCT	65	n/a	n/a	4-8-5	680
599204	2606	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTAAATT	83	7841	7858	5-8-5	784

10

【 1 3 2 5】

【表 1 3 1 - 1】

表 1 3 9 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とする MOE ギャップマーによる CFB mR NA の阻害

20

ISIS 番号	配列番号1 開始 部位	配列番号1 終止 部位	標的領域	配列	% 阻害	配列番号2 開始 部位	配列番号2 終止 部位	モチーフ	配列番号
599509	2552	2570	エクソン 18	TAGAAAACCCAAATCCTCA	45	7787	7805	6-7-6	681
599213	2553	2570	エクソン 18	TAGAAAACCCAAATCCTC	89	7788	7805	3-10-5	785
599273	2553	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCAAATCCTC	85	7788	7806	6-7-6	682
599214	2554	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCAAATCCT	79	7789	7806	3-10-5	786
599274	2554	2572	エクソン 18	TATAGAAAACCCAAATCCT	75	7789	7807	6-7-6	683
599215	2555	2572	エクソン 18	TATAGAAAACCCAAATCC	81	7790	7807	3-10-5	787
599216	2556	2573	エクソン 18	TTATAGAAAACCCAAATC	87	7791	7808	3-10-5	788
599275	2556	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAACCCAAATC	84	7791	7809	6-7-6	684
599217	2557	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAACCCAAAT	84	7792	7809	3-10-5	789
599276	2557	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAACCCAAAT	68	7792	7810	6-7-6	685
599218	2558	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAACCCAAA	82	7793	7810	3-10-5	790
599277	2558	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAAACCCAAA	82	7793	7811	6-7-6	686
599219	2559	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAAACCCAA	81	7794	7811	3-10-5	791
599278	2559	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAACCCAA	84	7794	7812	6-7-6	687
599220	2560	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAACCCA	92	7795	7812	3-10-5	740
599279	2560	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGAAAACCCA	92	7795	7813	6-7-6	688
599221	2561	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGAAAACCC	93	7796	7813	3-10-5	741
599280	2561	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAGAAAACCC	90	7796	7814	6-7-6	689

30

40

【 1 3 2 6】

50

【表 1 3 1 - 2】

599222	2562	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAGAAAACC	95	7797	7814	3-10-5	742
599223	2563	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATAGAAAAC	93	7798	7815	3-10-5	743
599224	2564	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTATAGAAAA	90	7799	7816	3-10-5	744
599225	2566	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTTATAGAA	93	7801	7818	3-10-5	745
599226	2567	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCTTATAGA	95	7802	7819	3-10-5	746
599227	2568	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCCCTTATAG	94	7803	7820	3-10-5	747
599228	2569	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCCCTTATA	96	7804	7821	3-10-5	748
599229	2570	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAACCCCTTAT	92	7805	7822	3-10-5	749
599230	2571	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAACCCCTTA	88	7806	7823	3-10-5	750
599231	2572	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAAACCCCTT	83	7807	7824	3-10-5	751
599232	2573	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGAAACCCCT	89	7808	7825	3-10-5	752
599233	2574	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGAAACCCC	83	7809	7826	3-10-5	753
599234	2575	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAGGAAACCCC	88	7810	7827	3-10-5	754
599235	2576	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAGGAAACC	91	7811	7828	3-10-5	755
599236	2577	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCAGGAAAC	90	7812	7829	3-10-5	756
599237	2578	2595	エクソン 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAA	34	7813	7830	3-10-5	757
599238	2580	2597	エクソン 18	CGCCCTGTCCAGCAGGA	14	7815	7832	3-10-5	758
599239	2581	2598	エクソン 18	ACGCCCTGTCCAGCAGG	10	7816	7833	3-10-5	759
599240	2582	2599	エクソン 18	CACGCCCTGTCCAGCAG	26	7817	7834	3-10-5	760
599241	2583	2600	エクソン 18	CCACGCCCTGTCCAGCA	11	7818	7835	3-10-5	761
599242	2584	2601	エクソン 18	CCCACGCCCTGTCCAGC	24	7819	7836	3-10-5	762
599243	2585	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCTGTCCAG	23	7820	7837	3-10-5	763
599244	2586	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCTGTCCA	29	7821	7838	3-10-5	764
599245	2587	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCTGTCC	11	7822	7839	3-10-5	765
599246	2588	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCTGTCC	0	7823	7840	3-10-5	766
599247	2589	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCTGT	21	7824	7841	3-10-5	767
599248	2590	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCCTG	0	7825	7842	3-10-5	768
599249	2591	2608	エクソン 18	ATCAATCCCACGCCCT	9	7826	7843	3-10-5	769
599250	2592	2609	エクソン 18	AATTCAATCCCACGCCCC	4	7827	7844	3-10-5	770
599251	2593	2610	エクソン 18	TAATTCAATCCCACGCC	12	7828	7845	3-10-5	771
599252	2594	2611	エクソン 18	TTAATTCAATCCCACGCC	2	7829	7846	3-10-5	772
599253	2595	2612	エクソン 18	TTTAATTCAATCCCACGC	28	7830	7847	3-10-5	773
599254	2596	2613	エクソン 18	TTTTAATTCAATCCCACG	27	7831	7848	3-10-5	774
599255	2597	2614	エクソン 18	GTTTTAATTCAATCCCAC	38	7832	7849	3-10-5	775
599256	2598	2615	エクソン 18	TGTTTTAATTCAATCCCA	36	7833	7850	3-10-5	776
599257	2599	2616	エクソン 18	CTGTTTTAATTCAATCCC	48	7834	7851	3-10-5	777
599258	2600	2617	エクソン 18	GCTGTTTTAATTCAATCC	19	7835	7852	3-10-5	778
599259	2601	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAATTCAATC	36	7836	7853	3-10-5	779

10

20

30

40

【 1 3 2 7 】

50

【表 1 3 1 - 3】

599260	2602	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTAAATCAAT	58	7837	7854	3-10-5	780
599261	2603	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTAAATCAA	35	7838	7855	3-10-5	781
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTAAATCA	96	7839	7858	5-10-5	317
599262	2604	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTAAATCA	52	7839	7856	3-10-5	782
599263	2605	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTTAAATC	66	7840	7857	3-10-5	783
599264	2606	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTAAAT	48	7841	7858	3-10-5	784
599265	2607	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTAAAT	46	7842	7859	3-10-5	792
599205	2607	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTAAAT	83	7842	7859	5-8-5	792
599266	2608	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTAA	76	7843	7860	3-10-5	793
599206	2608	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTAA	90	7843	7860	5-8-5	793
599267	2609	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTTTAA	53	7844	7861	3-10-5	794
599207	2609	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTTTAA	82	7844	7861	5-8-5	794
599268	2610	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTT	58	7845	7862	3-10-5	795
599208	2610	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTT	70	7845	7862	5-8-5	795
599269	2611	2628	エクソン 18 ／リピート	TTGTTGTCGCAGCTGTTT	38	n/a	n/a	3-10-5	796
599209	2611	2628	エクソン 18 ／リピート	TTGTTGTCGCAGCTGTTT	50	n/a	n/a	5-8-5	796
599270	2612	2629	エクソン 18 ／リピート	TTTGTGTCGCAGCTGTT	46	n/a	n/a	3-10-5	797
599210	2612	2629	エクソン 18 ／リピート	TTTGTGTCGCAGCTGTT	76	n/a	n/a	5-8-5	797
599271	2613	2630	エクソン 18 ／リピート	TTTTGTTGTCGCAGCTGT	64	n/a	n/a	3-10-5	798
599211	2613	2630	エクソン 18 ／リピート	TTTTGTTGTCGCAGCTGT	78	n/a	n/a	5-8-5	798
599272	2614	2631	エクソン 18 ／リピート	TTTTTGTGTCGCAGCTG	89	n/a	n/a	3-10-5	799
599212	2614	2631	エクソン 18 ／リピート	TTTTTGTGTCGCAGCTG	84	n/a	n/a	5-8-5	799

【 1 3 2 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 2 - 1】

表 1 4 0 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とする MOE ギャップマーによる CFB mR NA の阻害

ISIS 番号	配列 番号1 開始 部位	配列 番号1 終 止 部位	標的領域	配列	% 阻害	配列 番号2 開始 部位	配列 番号2 終 止 部位	モチーフ	配列 番号
599511	2552	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCAAATCCTCA	38	778 7	7806	6-8-6	410
599389	2553	2572	エクソン 18	TATAGAAAACCCAAATCCTC	80	778 8	7807	6-8-6	411
599390	2554	2573	エクソン 18	TTATAGAAAACCCAAATCCT	92	778 9	7808	6-8-6	412
599391	2555	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAACCCAAATCC	90	779 0	7809	6-8-6	413
599392	2556	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAACCCAAATC	87	779 1	7810	6-8-6	414
599393	2557	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAAACCCAAAT	87	779 2	7811	6-8-6	415
599394	2558	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAACCCAAA	74	779 3	7812	6-8-6	416
599395	2559	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGAAAACCCAA	78	779 4	7813	6-8-6	417
599396	2560	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAGAAAACCCA	77	779 5	7814	6-8-6	418
599397	2561	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATAGAAAACCC	89	779 6	7815	6-8-6	419
599398	2562	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTATAGAAAACC	90	779 7	7816	6-8-6	420
599399	2563	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTATAGAAA C	91	779 8	7817	6-8-6	421
599400	2564	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTTATAGAAA A	88	779 9	7818	6-8-6	422
599401	2565	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCTTATAGAA A	85	780 0	7819	6-8-6	423
599402	2566	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCCCTTATAGA A	77	780 1	7820	6-8-6	424

10

20

30

40

【 1 3 2 9】

50

【表 1 3 2 - 2】

599403	2567	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCCCTTATAGA	85	780 2	7821	6-8-6	425
599404	2568	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAACCCCTTATAG	90	780 3	7822	6-8-6	426
599405	2569	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAACCCCTTATA	89	780 4	7823	6-8-6	427
599406	2570	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAAACCCCTTAT	72	780 5	7824	6-8-6	428
599407	2571	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGAAACCCCTTA	87	780 6	7825	6-8-6	237
599408	2572	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGAAACCCCTT	87	780 7	7826	6-8-6	429
599409	2573	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAGGAAACCCCT	83	780 8	7827	6-8-6	430
599410	2574	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAGGAAACCC C	88	780 9	7828	6-8-6	431
599411	2575	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCAGGAAACC C	45	781 0	7829	6-8-6	432
599412	2576	2595	エクソン 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAAC C	66	7811	7830	6-8-6	433
599413	2577	2596	エクソン 18	GCCCCTGTCCAGCAGGAAA C	92	781 2	7831	6-8-6	238
599414	2578	2597	エクソン 18	CGCCCCTGTCCAGCAGGAA A	92	781 3	7832	6-8-6	434
599415	2579	2598	エクソン 18	ACGCCCCTGTCCAGCAGGA A	87	781 4	7833	6-8-6	435
599416	2580	2599	エクソン 18	CACGCCCCTGTCCAGCAGG A	91	781 5	7834	6-8-6	436
599417	2581	2600	エクソン 18	CCACGCCCCTGTCCAGCAGG	84	781 6	7835	6-8-6	437
599357	2582	2600	エクソン 18	CCACGCCCCTGTCCAGCAG	88	781 7	7835	5-9-5	708
599418	2582	2601	エクソン 18	CCCACGCCCCTGTCCAGCAG	85	781 7	7836	6-8-6	438
599358	2583	2601	エクソン 18	CCCACGCCCCTGTCCAGCA	86	781 8	7836	5-9-5	709
599419	2583	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCCTGTCCAGCA	91	781 8	7837	6-8-6	833

【 1 3 3 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 2 - 3】

599359	2584	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCCTGTCCAGC	85	7819	7837	5-9-5	834
599420	2584	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCCTGTCCAGC	91	7819	7838	6-8-6	440
599360	2585	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCCTGTCCAG	89	7820	7838	5-9-5	711
599421	2585	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCCTGTCCAG	87	7820	7839	6-8-6	441
599361	2586	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCCTGTCCA	89	7821	7839	5-9-5	712
599422	2586	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCCTGTCCA	90	7821	7840	6-8-6	442
599362	2587	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCCTGTCC	94	7822	7840	5-9-5	713
599423	2587	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCCTGTCC	85	7822	7841	6-8-6	841
599363	2588	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCCTGTC	88	7823	7841	5-9-5	714
599424	2588	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCCCTGTC	88	7823	7842	6-8-6	444
599364	2589	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCCCTGT	88	7824	7842	5-9-5	715
599425	2589	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCACGCCCCTGT	68	7824	7843	6-8-6	445
599365	2590	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCACGCCCCTG	48	7825	7843	5-9-5	716
599426	2590	2609	エクソン 18	AATTCAATCCCACGCCCCTG	55	7825	7844	6-8-6	446
599366	2591	2609	エクソン 18	AATTCAATCCCACGCCCCT	28	7826	7844	5-9-5	717
599427	2591	2610	エクソン 18	TAATTCATCCCACGCCCCT	13	7826	7845	6-8-6	849
599367	2592	2610	エクソン 18	TAATTCATCCCACGCCCC	21	7827	7845	5-9-5	718
599428	2592	2611	エクソン 18	TTAATTCATCCCACGCCCC	39	7827	7846	6-8-6	448
599368	2593	2611	エクソン 18	TTAATTCATCCCACGCCC	20	7828	7846	5-9-5	719

【 1 3 3 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 2 - 4】

599429	2593	2612	エクソン 18	TTTAATTCAATCCCACGCC	18	7828	7847	6-8-6	449
599369	2594	2612	エクソン 18	TTTAATTCAATCCCACGCC	78	7829	7847	5-9-5	720
599430	2594	2613	エクソン 18	TTTTAATTCAATCCCACGCC	24	7829	7848	6-8-6	450
599370	2595	2613	エクソン 18	TTTTAATTCAATCCCACGC	25	7830	7848	5-9-5	721
599431	2595	2614	エクソン 18	GTTTAAATTCAATCCCACGC	30	7830	7849	6-8-6	451
599371	2596	2614	エクソン 18	GTTTAAATTCAATCCCACG	84	7831	7849	5-9-5	722
599432	2596	2615	エクソン 18	TGTTTTAATTCAATCCCACG	29	7831	7850	6-8-6	452
599372	2597	2615	エクソン 18	TGTTTTAATTCAATCCCAC	83	7832	7850	5-9-5	723
599373	2598	2616	エクソン 18	CTGTTTTAATTCAATCCCA	81	7833	7851	5-9-5	724
599374	2599	2617	エクソン 18	GCTGTTTTAATTCAATCCC	26	7834	7852	5-9-5	725
599375	2600	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAATTCAATCC	26	7835	7853	5-9-5	726
599376	2601	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTTAATTCAATC	62	7836	7854	5-9-5	727
599377	2602	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTTAATTCAAT	21	7837	7855	5-9-5	728
599378	2603	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTTAATTCAA	90	7838	7856	5-9-5	729
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTCA	95	7839	7858	5-10-5	867
599379	2604	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTTTAATTCA	88	7839	7857	5-9-5	730
599380	2605	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTTAATTC	37	7840	7858	5-9-5	869
599381	2606	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTTAATT	33	7841	7859	5-9-5	732
599382	2607	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTTAAT	81	7842	7860	5-9-5	733

10

20

30

40

【 1 3 3 2 】

50

【表 1 3 2 - 5】

599383	2608	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTTTTAA	54	7843	7861	5-9-5	734
599384	2609	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTTA	85	7844	7862	5-9-5	873
599385	2610	2628	エクソン 18/リビ ート	TTGTTGTCGCAGCTGTTTT	59	n/a	n/a	5-9-5	736
599386	2611	2629	エクソン 18/リビ ート	TTTGTGTCGCAGCTGTTTT	81	n/a	n/a	5-9-5	737
599387	2612	2630	エクソン 18/リビ ート	TTTTGTGTCGCAGCTGTT	80	n/a	n/a	5-9-5	738
599388	2613	2631	エクソン 18/リビ ート	TTTTTGTGTCGCAGCTGT	84	n/a	n/a	5-9-5	739

10

20

【 1 3 3 3】

実施例 1 2 0 : M O E ギャップマーによる H e p G 2 細胞におけるヒト補体 B 因子 (C F B) のアンチセンス阻害

ヒト補体 B 因子 (C F B) 核酸を標的とする新たなアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、 C F B mRNA に対するそれらの効果をインビトロで試験した。1 ウェルあたり 2 0 , 0 0 0 細胞の密度の培養 H e p G 2 細胞を、エレクトロポレーションにより、1 , 0 0 0 n M アンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。約 2 4 時間の処理期間後に、細胞から RNA を単離し、定量リアルタイム P C R によって C F B mRNA レベルを測定した。ヒトプライマープロベセット R T S 3 4 5 9 を使って mRNA レベルを測定した。R I B O G R E E N (登録商標) によって測定される全 RNA 含有量に従って C F B mRNA レベルを調整した。結果を、無処理対照細胞との比較で、 C F B の阻害パーセントとして表す。

30

【 1 3 3 4】

以下の表に示す新設計のキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、デオキシ、 M O E 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドとして設計された。前記デオキシ、 M O E 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドは 1 6 ヌクレオチド長であり、そのヌクレオチドは M O E 糖修飾、 (S) - c E t 糖修飾、またはデオキシ修飾のいずれかを有する。「化学的特徴」欄には各オリゴヌクレオチドの糖修飾を記載する。「 k 」は (S) - c E t 糖修飾を示し、「 d 」はデオキシリボースを示し、「 e 」は M O E 修飾を示す。

40

【 1 3 3 5】

「開始部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も 5 ' 側のヌクレオチドを示す。「終止部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も 3 ' 側のヌクレオチドを示す。以下の表に示す各ギャップマーは、本明細書において配列番号 1 と呼ぶヒト C F B mRNA (G E N B A N K アクセション番号 N M _ 0 0 1 7 1 0 . 5) もしくは本明細書において配列番号 2 と呼ぶヒト C F B ゲノム配列 (ヌクレオチド 3 1 8 5 2 0 0 0 から 3 1 8 6 1 0 0 0 までを切り出した G E N B A N K アクセション番号 N T _ 0 0 7 5 9 2 . 1 5)、またはその両方を標的とする。「 n / a 」は、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドが当該特定遺伝子配列を 1 0 0 % の相補性では標的としないことを示す。

50

【 1 3 3 6 】

【 表 1 3 3 - 1 】

表 1 4 1 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とするデオキシ、MOE 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列 番号1 開始 部位	配列 番号1 終止 部位	標的領域	配列	% 阻 害	配列 番号2 開始 部位	配列 番号2 終止 部位	モチーフ	配 列 番 号
599513	2551	2566	エクソン 18	AAACCCAAATCC TCAT	11	7786	7801	ekkeekkkkkkkkkkk	557
599514	2553	2568	エクソン 18	GAAAACCCAAAT CCTC	13	7788	7803	ekkeekkkkkkkkkkk	801
599515	2555	2570	エクソン 18	TAGAAAACCCA AATCC	54	7790	7805	ekkeekkkkkkkkkkk	559
599516	2559	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAAC CCAA	16	7794	7809	ekkeekkkkkkkkkkk	561
599517	2560	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAA CCCA	29	7795	7810	ekkeekkkkkkkkkkk	562
599518	2561	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAA ACCC	55	7796	7811	ekkeekkkkkkkkkkk	563
599519	2562	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAA AACC	31	7797	7812	ekkeekkkkkkkkkkk	564
599520	2563	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGA AAAC	14	7798	7813	ekkeekkkkkkkkkkk	565
599521	2564	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAG AAAA	9	7799	7814	ekkeekkkkkkkkkkk	566
599522	2565	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATA GAAA	8	7800	7815	ekkeekkkkkkkkkkk	567
599523	2566	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTAT AGAA	6	7801	7816	ekkeekkkkkkkkkkk	568
599524	2567	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTA TAGA	14	7802	7817	ekkeekkkkkkkkkkk	569
599525	2568	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTT ATAG	6	7803	7818	ekkeekkkkkkkkkkk	570
599526	2569	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCT TATA	16	7804	7819	ekkeekkkkkkkkkkk	571
599527	2570	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCC CTTAT	0	7805	7820	ekkeekkkkkkkkkkk	572
599528	2571	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCC CCTTA	6	7806	7821	ekkeekkkkkkkkkkk	573
599529	2572	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAAC CCCTT	6	7807	7822	ekkeekkkkkkkkkkk	574

【 1 3 3 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 3 - 2】

599530	2574	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAA ACCCC	29	7809	7824	ekkeekkkkkkkkk	576
599531	2575	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGA AACCC	64	7810	7825	ekkeekkkkkkkkk	577
599532	2576	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGA AACC	43	7811	7826	ekkeekkkkkkkkk	578
599533	2577	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAGG AAAC	25	7812	7827	ekkeekkkkkkkkk	820
599534	2578	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAG GAAA	12	7813	7828	ekkeekkkkkkkkk	580
599535	2580	2595	エクソン 18	CCCCTGTCCAGC AGGA	16	7815	7830	ekkeekkkkkkkkk	582
599536	2582	2597	エクソン 18	CGCCCCTGTCCA GCAG	27	7817	7832	ekkeekkkkkkkkk	584
599537	2583	2598	エクソン 18	ACGCCCTGTCC AGCA	35	7818	7833	ekkeekkkkkkkkk	585
599538	2584	2599	エクソン 18	CACGCCCTGTCC CAGC	26	7819	7834	ekkeekkkkkkkkk	586
599539	2585	2600	エクソン 18	CCACGCCCTGT CCAG	33	7820	7835	ekkeekkkkkkkkk	587
599540	2586	2601	エクソン 18	CCCACGCCCTG TCCA	27	7821	7836	ekkeekkkkkkkkk	588
599541	2587	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCT GTCC	52	7822	7837	ekkeekkkkkkkkk	589
599542	2588	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCC TGTC	16	7823	7838	ekkeekkkkkkkkk	590
599543	2589	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCC CTGT	19	7824	7839	ekkeekkkkkkkkk	591
599544	2590	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCC CCTG	33	7825	7840	ekkeekkkkkkkkk	831
599545	2591	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGC CCCT	24	7826	7841	ekkeekkkkkkkkk	593
599546	2592	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACG CCCC	54	7827	7842	ekkeekkkkkkkkk	594
599547	2593	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCAC GCCC	87	7828	7843	ekkeekkkkkkkkk	595
599548	2594	2609	エクソン 18	AATTCAATCCCA CGCC	79	7829	7844	ekkeekkkkkkkkk	596

10

20

30

40

【 1 3 3 8 】

50

【表 1 3 3 - 3】

599549	2595	2610	エクソン 18	TAATCAATCCC ACGC	62	7830	7845	ekkeekkkddddddkk	597
599550	2596	2611	エクソン 18	TTAATCAATCC CACG	52	7831	7846	ekkeekkkddddddkk	598
599551	2597	2612	エクソン 18	TTTAATCAATCC CAC	27	7832	7847	ekkeekkkddddddkk	599
599577	2597	2613	エクソン 18	TTTAATCAATC CCAC	90	7832	7848	eeekkkddddddkkee	662
599552	2598	2613	エクソン 18	TTTAATCAATC CCA	92	7833	7848	ekkeekkkddddddkk	600
599578	2598	2614	エクソン 18	GTTTAATCAAT CCCA	88	7833	7849	eeekkkddddddkkee	663
599553	2599	2614	エクソン 18	GTTTAATCAAT CCC	91	7834	7849	ekkeekkkddddddkk	601
599579	2599	2615	エクソン 18	TGTTTAATCAA TCCC	79	7834	7850	eeekkkddddddkkee	664
599554	2600	2615	エクソン 18	TGTTTAATCAA TCC	90	7835	7850	ekkeekkkddddddkk	602
599580	2600	2616	エクソン 18	CTGTTTAATTC AATCC	79	7835	7851	eeekkkddddddkkee	665
599555	2601	2616	エクソン 18	CTGTTTAATTC AATC	79	7836	7851	ekkeekkkddddddkk	846
599581	2601	2617	エクソン 18	GCTGTTTAATT CAATC	90	7836	7852	eeekkkddddddkkee	666
599556	2602	2617	エクソン 18	GCTGTTTAATT CAAT	47	7837	7852	ekkeekkkddddddkk	604
599582	2602	2618	エクソン 18	AGCTGTTTAAT TCAAT	89	7837	7853	eeekkkddddddkkee	849
599557	2603	2618	エクソン 18	AGCTGTTTAAT TCAA	67	7838	7853	ekkeekkkddddddkk	850
599583	2603	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTAA TTCAA	49	7838	7854	eeekkkddddddkkee	668
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTT TTAATCA	78	7839	7858	eeeeeeeeeeeeee ee	317
599558	2604	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTAA TTCA	80	7839	7854	ekkeekkkddddddkk	606
599584	2604	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTA ATTCA	66	7839	7855	eeekkkddddddkkee	669

10

20

30

40

【 1 3 3 9 】

50

【表 1 3 3 - 4】

599559	2605	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTAA ATTC	38	7840	7855	ekkeekkkkkkkkk	607
599585	2605	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTT AATTC	80	7840	7856	eeekkkkkkkkkkeee	670
599560	2606	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTT AATT	16	7841	7856	ekkeekkkkkkkkk	608
599586	2606	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTT TAATT	78	7841	7857	eeekkkkkkkkkkeee	671
599561	2607	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTT TAAT	58	7842	7857	ekkeekkkkkkkkk	609
599587	2607	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTT TTAAT	81	7842	7858	eeekkkkkkkkkkeee	672
588860	2608	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTT TTAA	92	7843	7858	eeekkkkkkkkkkeee	610
599562	2608	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTT TTAA	78	7843	7858	ekkeekkkkkkkkk	610
599588	2608	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGT TTTAA	81	7843	7859	eeekkkkkkkkkkeee	673
599563	2609	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGT TTTA	86	7844	7859	ekkeekkkkkkkkk	611
599589	2609	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTG TTTTA	75	7844	7860	eeekkkkkkkkkkeee	674
599564	2610	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTG TTTT	75	7845	7860	ekkeekkkkkkkkk	612
599590	2610	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCT GTTTT	88	7845	7861	eeekkkkkkkkkkeee	675
599565	2611	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCT GTTT	65	7846	7861	ekkeekkkkkkkkk	613
599591	2611	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGC TGTTT	94	7846	7862	eeekkkkkkkkkkeee	676
599566	2612	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGC TGTT	72	7847	7862	ekkeekkkkkkkkk	614
599592	2612	2628	エクソン 18/ リピート	TTGTTGTCGCAG CTGTT	90	n/a	n/a	eeekkkkkkkkkkeee	677
599567	2613	2628	エクソン 18/ リピート	TTGTTGTCGCAG CTGT	82	n/a	n/a	ekkeekkkkkkkkk	615
599593	2613	2629	エクソン 18/ リピート	TTGTTGTCGCA GCTGT	95	n/a	n/a	eeekkkkkkkkkkeee	678

【 1 3 4 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 3 - 5】

599568	2614	2629	エクソン 18/ リピート	TTTGTTGTCGCA GCTG	92	n/a	n/a	ekkeekkkdddddkk	616
599594	2614	2630	エクソン 18/ リピート	TTTTGTTGTCGC AGCTG	86	n/a	n/a	eeekkkdddddkeee	679
599569	2615	2630	エクソン 18/ リピート	TTTTGTTGTCGC AGCT	89	n/a	n/a	ekkeekkkdddddkk	617
599595	2615	2631	エクソン 18/ リピート	TTTTGTTGTCG CAGCT	76	n/a	n/a	eeekkkdddddkeee	680
599570	2616	2631	エクソン 18/ リピート	TTTTGTTGTCG CAGC	95	n/a	n/a	ekkeekkkdddddkk	618

10

【 1 3 4 1】

実施例 1 2 1 : M O E ギャップマーによる H e p G 2 細胞におけるヒト補体 B 因子 (C F B) のアンチセンス阻害

ヒト補体 B 因子 (C F B) 核酸を標的とする新たなアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、 C F B mRNA に対するそれらの効果をインビトロで試験した。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドを、培養条件が類似する一連の実験で試験した。各実験に関する結果を以下に示す別々の表に掲載する。1 ウェルあたり 2 0 , 0 0 0 細胞の密度の培養 H e p G 2 細胞を、エレクトロポレーションにより、5 0 0 n M アンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。約 2 4 時間の処理期間後に、細胞から R N A を単離し、定量リアルタイム P C R によって C F B mRNA レベルを測定した。ヒトプライマープロンプセット R T S 3 4 5 9 を使って mRNA レベルを測定した。R I B O G R E E N (登録商標) によって測定される全 R N A 含有量に従って C F B mRNA レベルを調整した。結果を、無処理対照細胞との比較で、C F B の阻害パーセントとして表す。

20

【 1 3 4 2】

以下の表に示す新設計のキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、デオキシ、M O E 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドとして、または 5 - 8 - 5 M O E 、 5 - 9 - 5 M O E 、 5 - 1 0 - 5 M O E 、 6 - 7 - 6 M O E 、 3 - 1 0 - 5 M O E 、 もしくは 6 - 8 - 6 M O E ギャップマーとして設計された。

30

【 1 3 4 3】

前記デオキシ、M O E 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドは 1 6 ヌクレオシド長であり、そのヌクレオシドは M O E 糖修飾、(S) - c E t 糖修飾、またはデオキシ修飾のいずれかを有する。「化学的特徴」欄には各オリゴヌクレオチドの糖修飾を記載する。「k」は (S) - c E t 糖修飾を示し、「d」はデオキシリボースを示し、「e」は M O E 修飾を示す。

【 1 3 4 4】

5 - 8 - 5 M O E ギャップマーは 1 8 ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは 8 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドで構成され、5 ' 側と 3 ' 側にそれぞれ 5 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5 - 9 - 5 M O E ギャップマーは 1 9 ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは 9 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドで構成され、5 ' 側と 3 ' 側にそれぞれ 5 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーは 2 0 ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは 1 0 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドで構成され、5 ' 側と 3 ' 側にそれぞれ 5 個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。3 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーは 1 8 ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは 1 0 個の 2 ' - デオキシヌクレオシドで構成され、5 ' 側と 3 ' 側にそれぞれ 3 個及び 5 個のヌクレオシドを含むウ

40

50

イングセグメントが隣接している。6 - 7 - 6 MOEギャップマーは19ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは7個の2' - デオキシヌクレオシドで構成され、5'側と3'側にそれぞれ6個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。6 - 8 - 6 MOEギャップマーは20ヌクレオシド長であり、中央のギャップセグメントは8個の2' - デオキシヌクレオシドで構成され、5'側と3'側にそれぞれ6個のヌクレオシドを含むウイングセグメントが隣接している。5'ウイングセグメント中の各ヌクレオシド及び3'ウイングセグメント中の各ヌクレオシドは2' - MOE修飾を有する。ヌクレオシド間連結部は、各ギャップマーの全体を通して、ホスホロチオエート (P = S) 連結部である。シトシン残基は、各ギャップマーの全体を通してすべて、5 - メチルシトシンである。

10

【1345】

「開始部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も5'側のヌクレオシドを示す。「終止部位」とは、ヒト遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も3'側のヌクレオシドを示す。以下の表に示す各ギャップマーは、本明細書において配列番号1と呼ぶヒトCFB mRNA (GENBANKアクセッション番号NM_001710.5) もしくは本明細書において配列番号2と呼ぶヒトCFBゲノム配列 (ヌクレオチド31852000から31861000までを切り出したGENBANKアクセッション番号NT_007592.15)、またはその両方を標的とする。「n/a」は、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドが当該特定遺伝子配列を100%の相補性では標的としないことを示す。

20

【1346】

30

40

50

【表 1 3 4 - 1】

表 1 4 2 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とするデオキシ、MOE 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列 番号1 開始 部位	配列 番号1 終止 部位	標的領域	配列	% 阻害	配列番号 2 開始部位	配列 番号2 終止 部位	モチーフ	配列番号
601152	2551	2566	エクソン 18	AAACCCAAA TCCTCAT	22	7786	7801	eekkkkkkkkkkkkee	557
601218	2551	2566	エクソン 18	AAACCCAAA TCCTCAT	21	7786	7801	ekkkkkkkkkkkkee	557
601153	2552	2567	エクソン 18	AAAACCCA AATCCTCA	27	7787	7802	eekkkkkkkkkkkkee	800
601219	2552	2567	エクソン 18	AAAACCCA AATCCTCA	19	7787	7802	ekkkkkkkkkkkkee	800
601154	2553	2568	エクソン 18	GAAAACCC AAATCCTC	23	7788	7803	eekkkkkkkkkkkkee	558
601220	2553	2568	エクソン 18	GAAAACCC AAATCCTC	24	7788	7803	ekkkkkkkkkkkkee	558
601155	2554	2569	エクソン 18	AGAAAACC CAAATCCT	20	7789	7804	eekkkkkkkkkkkkee	801
601221	2554	2569	エクソン 18	AGAAAACC CAAATCCT	0	7789	7804	ekkkkkkkkkkkkee	801
601156	2555	2570	エクソン 18	TAGAAAACC CAAATCC	11	7790	7805	eekkkkkkkkkkkkee	559
601222	2555	2570	エクソン 18	TAGAAAACC CAAATCC	23	7790	7805	ekkkkkkkkkkkkee	559
601157	2556	2571	エクソン 18	ATAGAAAAC CCAAATC	9	7791	7806	eekkkkkkkkkkkkee	560
601223	2556	2571	エクソン 18	ATAGAAAAC CCAAATC	0	7791	7806	ekkkkkkkkkkkkee	560
601158	2557	2572	エクソン 18	TATAGAAAA CCCAAAT	0	7792	7807	eekkkkkkkkkkkkee	802
601224	2557	2572	エクソン 18	TATAGAAAA CCCAAAT	0	7792	7807	ekkkkkkkkkkkkee	802
601159	2558	2573	エクソン 18	TTATAGAAA ACCCAAA	2	7793	7808	eekkkkkkkkkkkkee	803
601225	2558	2573	エクソン 18	TTATAGAAA ACCCAAA	0	7793	7808	ekkkkkkkkkkkkee	803

【 1 3 4 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 4 - 2】

601160	2559	2574	エクソン 18	CTTATAGAA AACCCAA	0	7794	7809	eekkkkkkkkkkkee	561
601226	2559	2574	エクソン 18	CTTATAGAA AACCCAA	0	7794	7809	ekkkkkkkkkkkee	561
601161	2560	2575	エクソン 18	CCTTATAGA AAACCCA	1	7795	7810	eekkkkkkkkkkkee	562
601227	2560	2575	エクソン 18	CCTTATAGA AAACCCA	14	7795	7810	ekkkkkkkkkkkee	562
601162	2561	2576	エクソン 18	CCCTTATAG AAAACCC	9	7796	7811	eekkkkkkkkkkkee	563
601228	2561	2576	エクソン 18	CCCTTATAG AAAACCC	9	7796	7811	ekkkkkkkkkkkee	563
601163	2562	2577	エクソン 18	CCCCTTATA GAAAACC	0	7797	7812	eekkkkkkkkkkkee	564
601164	2563	2578	エクソン 18	ACCCCTTAT AGAAAAC	3	7798	7813	eekkkkkkkkkkkee	565
601165	2564	2579	エクソン 18	AACCCCTTA TAGAAAA	0	7799	7814	eekkkkkkkkkkkee	566
601166	2565	2580	エクソン 18	AAACCCCTT ATAGAAA	0	7800	7815	eekkkkkkkkkkkee	567
601167	2566	2581	エクソン 18	GAAACCCCT TATAGAA	0	7801	7816	eekkkkkkkkkkkee	568
601168	2567	2582	エクソン 18	GGAAACCCC TTATAGA	0	7802	7817	eekkkkkkkkkkkee	569
601169	2568	2583	エクソン 18	AGGAAACC CCTTATAG	0	7803	7818	eekkkkkkkkkkkee	570
601170	2569	2584	エクソン 18	CAGGAAAC CCCTTATA	10	7804	7819	eekkkkkkkkkkkee	571
601171	2570	2585	エクソン 18	GCAGGAAA CCCCTTAT	9	7805	7820	eekkkkkkkkkkkee	572
601172	2571	2586	エクソン 18	AGCAGGAA ACCCCTTA	15	7806	7821	eekkkkkkkkkkkee	573
601173	2572	2587	エクソン 18	CAGCAGGA AACCCCTT	29	7807	7822	eekkkkkkkkkkkee	574
601174	2573	2588	エクソン 18	CCAGCAGG AAACCCCT	25	7808	7823	eekkkkkkkkkkkee	575
601175	2574	2589	エクソン 18	TCCAGCAGG AAACCCC	15	7809	7824	eekkkkkkkkkkkee	576

10

20

30

40

【 1 3 4 8 】

50

【表 1 3 4 - 3】

601176	2575	2590	エクソン 18	GTCCAGCAG GAAACCC	18	7810	7825	eekkkkkkkkkkkkee	577
601177	2576	2591	エクソン 18	TGTCCAGCA GGAAACC	10	7811	7826	eekkkkkkkkkkkkee	578
601178	2577	2592	エクソン 18	CTGTCCAGC AGGAAAC	11	7812	7827	eekkkkkkkkkkkkee	579
601179	2578	2593	エクソン 18	CCTGTCCAG CAGGAAA	19	7813	7828	eekkkkkkkkkkkkee	580
601180	2579	2594	エクソン 18	CCCTGTCCA GCAGGAA	7	7814	7829	eekkkkkkkkkkkkee	581
601181	2580	2595	エクソン 18	CCCCTGTCC AGCAGGA	3	7815	7830	eekkkkkkkkkkkkee	582
601182	2581	2596	エクソン 18	GCCCCTGTC CAGCAGG	0	7816	7831	eekkkkkkkkkkkkee	583
601183	2582	2597	エクソン 18	CGCCCCTGT CCAGCAG	4	7817	7832	eekkkkkkkkkkkkee	584
601184	2583	2598	エクソン 18	ACGCCCTGT TCCAGCA	14	7818	7833	eekkkkkkkkkkkkee	585
601185	2584	2599	エクソン 18	CACGCCCT GTCCAGC	26	7819	7834	eekkkkkkkkkkkkee	586
601186	2585	2600	エクソン 18	CCACGCCCC TGTCCAG	8	7820	7835	eekkkkkkkkkkkkee	587
601187	2586	2601	エクソン 18	CCCACGCC CTGTCCA	18	7821	7836	eekkkkkkkkkkkkee	588
601188	2587	2602	エクソン 18	TCCACGCC CCTGTCC	20	7822	7837	eekkkkkkkkkkkkee	589
601189	2588	2603	エクソン 18	ATCCCACGC CCCTGTC	12	7823	7838	eekkkkkkkkkkkkee	590
601190	2589	2604	エクソン 18	AATCCCACG CCCCTGT	33	7824	7839	eekkkkkkkkkkkkee	591
601191	2590	2605	エクソン 18	CAATCCCAC GCCCTG	52	7825	7840	eekkkkkkkkkkkkee	592
601192	2591	2606	エクソン 18	TCAATCCA CGCCCCT	46	7826	7841	eekkkkkkkkkkkkee	593
601193	2592	2607	エクソン 18	TTCATCCC ACGCCCC	30	7827	7842	eekkkkkkkkkkkkee	594
601194	2593	2608	エクソン 18	ATTCAATCC CAGCCCC	41	7828	7843	eekkkkkkkkkkkkee	595

10

20

30

40

【 1 3 4 9 】

50

【表 1 3 4 - 4】

601195	2594	2609	エクソン 18	AATTCAATC CCACGCC	40	7829	7844	eekkkkkkkkkkkee	596
601196	2595	2610	エクソン 18	TAATTCAAT CCCACGC	71	7830	7845	eekkkkkkkkkkkee	597
601197	2596	2611	エクソン 18	TTAATTCAA TCCCACG	42	7831	7846	eekkkkkkkkkkkee	598
601198	2597	2612	エクソン 18	TTTAATTCA ATCCCAC	63	7832	7847	eekkkkkkkkkkkee	599
601199	2598	2613	エクソン 18	TTTTAATTC AATCCCA	51	7833	7848	eekkkkkkkkkkkee	600
601200	2599	2614	エクソン 18	GTTTAAATT CAATCCC	65	7834	7849	eekkkkkkkkkkkee	601
601201	2600	2615	エクソン 18	TGTTTAAAT CAATCC	49	7835	7850	eekkkkkkkkkkkee	602
601202	2601	2616	エクソン 18	CTGTTTAA TTCAATC	33	7836	7851	eekkkkkkkkkkkee	603
601203	2602	2617	エクソン 18	GCTGTTTAA ATCAAT	63	7837	7852	eekkkkkkkkkkkee	604
601204	2603	2618	エクソン 18	AGCTGTTTT AATTCAA	69	7838	7853	eekkkkkkkkkkkee	605
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCT GTTTAAAT CA	73	7839	7858	eeeeeeeeeeee eeee	317
601205	2604	2619	エクソン 18	CAGCTGTT TAATCA	51	7839	7854	eekkkkkkkkkkkee	606
601206	2605	2620	エクソン 18	GCAGCTGTT TTAATTC	43	7840	7855	eekkkkkkkkkkkee	607
601207	2606	2621	エクソン 18	CGCAGCTGT TTAATTC	52	7841	7856	eekkkkkkkkkkkee	608
601208	2607	2622	エクソン 18	TCGCAGCTG TTTAAAT	61	7842	7857	eekkkkkkkkkkkee	609
588860	2608	2623	エクソン 18	GTCGCAGCT GTTTAA	75	7843	7858	eekkkkkkkkkkkee	610
601209	2608	2623	エクソン 18	GTCGCAGCT GTTTAA	73	7843	7858	eekkkkkkkkkkkee	610
601210	2609	2624	エクソン 18	TGTCGCAGC TGTTTTA	80	7844	7859	eekkkkkkkkkkkee	611
601211	2610	2625	エクソン 18	TTGTCGCAG CTGTTTT	64	7845	7860	eekkkkkkkkkkkee	612

10

20

30

40

【 1 3 5 0 】

50

【表 1 3 4 - 5】

601212	2611	2626	エクソン 18	GTTGTCGCA GCTGTTT	86	7846	7861	eekkkkkkkkkkkkee	613
601213	2612	2627	エクソン 18	TGTTGTCGC AGCTGTT	87	7847	7862	eekkkkkkkkkkkkee	614
601214	2613	2628	エクソン 18/ リピート	TTGTTGTCG CAGCTGT	84	n/a	n/a	eekkkkkkkkkkkkee	615
601215	2614	2629	エクソン 18/ リピート	TTTGTGTC GCAGCTG	78	n/a	n/a	eekkkkkkkkkkkkee	616
601216	2615	2630	エクソン 18/ リピート	TTTTGTTGT CGCAGCT	73	n/a	n/a	eekkkkkkkkkkkkee	617
601217	2616	2631	エクソン 18/ リピート	TTTTTGTG TCGCAGC	66	n/a	n/a	eekkkkkkkkkkkkee	618

10

【 1 3 5 1】

【表 1 3 5 - 1】

表 1 4 3 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とするデオキシ、MOE 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドによる CFB mRNA の阻害

20

ISIS 番号	配列 番号 1 開始 部位	配列 番号1 終 止 部位	標的領域	配列	% 阻 害	配列番 号2 開始部 位	配列番 号2 終 止 部 位	モチーフ	配列 番号
601284	2551	2566	エクソン 18	AAACCCAAATCC TCAT	8	7786	7801	eekkkkkkkkkkkkee	557
601285	2552	2567	エクソン 18	AAAACCCAAATC CTCA	15	7787	7802	eekkkkkkkkkkkkee	800
601286	2553	2568	エクソン 18	GAAAACCCAAAT CCTC	21	7788	7803	eekkkkkkkkkkkkee	558
601287	2554	2569	エクソン 18	AGAAAACCCAA ATCCT	9	7789	7804	eekkkkkkkkkkkkee	801
601288	2555	2570	エクソン 18	TAGAAAACCCAA ATCC	0	7790	7805	eekkkkkkkkkkkkee	559
601289	2556	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCA AATC	40	7791	7806	eekkkkkkkkkkkkee	560
601290	2557	2572	エクソン 18	TATAGAAAACCC AAAT	16	7792	7807	eekkkkkkkkkkkkee	802
601291	2558	2573	エクソン 18	TTATAGAAAACC CAA	15	7793	7808	eekkkkkkkkkkkkee	803
601292	2559	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAAC CCAA	5	7794	7809	eekkkkkkkkkkkkee	561

30

40

【 1 3 5 2】

50

【表 1 3 5 - 2】

601293	2560	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAA CCCA	15	7795	7810	ekkkkkkkkkkkkeee	562
601294	2561	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAA ACCC	3	7796	7811	ekkkkkkkkkkkkeee	563
601229	2562	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAA AACC	15	7797	7812	ekkkkkkkkkkkkeee	564
601295	2562	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAA AACC	5	7797	7812	ekkkkkkkkkkkkeee	564
601230	2563	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGA AAAC	14	7798	7813	ekkkkkkkkkkkkeee	565
601296	2563	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGA AAAC	0	7798	7813	ekkkkkkkkkkkkeee	565
601231	2564	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAG AAAA	14	7799	7814	ekkkkkkkkkkkkeee	566
601297	2564	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAG AAAA	14	7799	7814	ekkkkkkkkkkkkeee	566
601232	2565	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATA GAAA	15	7800	7815	ekkkkkkkkkkkkeee	567
601298	2565	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATA GAAA	7	7800	7815	ekkkkkkkkkkkkeee	567
601233	2566	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTAT AGAA	0	7801	7816	ekkkkkkkkkkkkeee	568
601299	2566	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTAT AGAA	0	7801	7816	ekkkkkkkkkkkkeee	568
601234	2567	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTA TAGA	0	7802	7817	ekkkkkkkkkkkkeee	569
601300	2567	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTA TAGA	9	7802	7817	ekkkkkkkkkkkkeee	569
601235	2568	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTT ATAG	3	7803	7818	ekkkkkkkkkkkkeee	570
601301	2568	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTT ATAG	14	7803	7818	ekkkkkkkkkkkkeee	570
601236	2569	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCT TATA	0	7804	7819	ekkkkkkkkkkkkeee	571
601302	2569	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCT TATA	0	7804	7819	ekkkkkkkkkkkkeee	571
601237	2570	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCC CTTAT	16	7805	7820	ekkkkkkkkkkkkeee	572

10

20

30

40

【 1 3 5 3 】

50

【表 1 3 5 - 3】

601303	2570	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCC CTTAT	16	7805	7820	ekkkkkkkkkkkkeee	572
601238	2571	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCC CCTTA	11	7806	7821	ekkkkkkkkkkkkeee	573
601304	2571	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCC CCTTA	10	7806	7821	ekkkkkkkkkkkkeee	573
601239	2572	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAAC CCCTT	21	7807	7822	ekkkkkkkkkkkkeee	574
601305	2572	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAAC CCCTT	7	7807	7822	ekkkkkkkkkkkkeee	574
601240	2573	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAA CCCCT	6	7808	7823	ekkkkkkkkkkkkeee	575
601241	2574	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAA ACCCC	10	7809	7824	ekkkkkkkkkkkkeee	576
601242	2575	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGA AACCC	19	7810	7825	ekkkkkkkkkkkkeee	577
601243	2576	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGA AACC	10	7811	7826	ekkkkkkkkkkkkeee	578
601244	2577	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAGG AAAC	28	7812	7827	ekkkkkkkkkkkkeee	579
601245	2578	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAG GAAA	5	7813	7828	ekkkkkkkkkkkkeee	580
601246	2579	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCA GGAA	18	7814	7829	ekkkkkkkkkkkkeee	581
601247	2580	2595	エクソン 18	CCCCTGTCCAGC AGGA	4	7815	7830	ekkkkkkkkkkkkeee	582
601248	2581	2596	エクソン 18	GCCCCTGTCCAG CAGG	6	7816	7831	ekkkkkkkkkkkkeee	583
601249	2582	2597	エクソン 18	CGCCCCTGTCCA GCAG	18	7817	7832	ekkkkkkkkkkkkeee	584
601250	2583	2598	エクソン 18	ACGCCCCTGTCC AGCA	26	7818	7833	ekkkkkkkkkkkkeee	585
601251	2584	2599	エクソン 18	CACGCCCCTGTC CAGC	27	7819	7834	ekkkkkkkkkkkkeee	586
601252	2585	2600	エクソン 18	CCACGCCCTGT CCAG	21	7820	7835	ekkkkkkkkkkkkeee	587
601253	2586	2601	エクソン 18	CCCACGCCCTGT TCCA	0	7821	7836	ekkkkkkkkkkkkeee	588

10

20

30

40

【 1 3 5 4 】

50

【表 1 3 5 - 4】

601254	2587	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCT GTCC	31	7822	7837	ekkkkkkkkkkeee	589
601255	2588	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCC TGTC	3	7823	7838	ekkkkkkkkkkeee	590
601256	2589	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCC CTGT	21	7824	7839	ekkkkkkkkkkeee	591
601257	2590	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCC CCTG	47	7825	7840	ekkkkkkkkkkeee	592
601258	2591	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGC CCCT	48	7826	7841	ekkkkkkkkkkeee	593
601259	2592	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACG CCCC	38	7827	7842	ekkkkkkkkkkeee	594
601260	2593	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCAC GCCC	33	7828	7843	ekkkkkkkkkkeee	595
601261	2594	2609	エクソン 18	AATTCAATCCCA CGCC	17	7829	7844	ekkkkkkkkkkeee	596
601262	2595	2610	エクソン 18	TAATTCAATCCC ACGC	40	7830	7845	ekkkkkkkkkkeee	597
601263	2596	2611	エクソン 18	TTAATTCAATCCC ACG	31	7831	7846	ekkkkkkkkkkeee	598
601264	2597	2612	エクソン 18	TTTAATTCAATCC CAC	72	7832	7847	ekkkkkkkkkkeee	599
601265	2598	2613	エクソン 18	TTTTAATTCAATC CCA	48	7833	7848	ekkkkkkkkkkeee	600
601266	2599	2614	エクソン 18	GTTTAAATTCAAT CCC	64	7834	7849	ekkkkkkkkkkeee	601
601267	2600	2615	エクソン 18	TGTTTAAATTCAA TCC	43	7835	7850	ekkkkkkkkkkeee	602
601268	2601	2616	エクソン 18	CTGTTTAAATTCA ATC	44	7836	7851	ekkkkkkkkkkeee	603
601269	2602	2617	エクソン 18	GCTGTTTAAATC AAT	66	7837	7852	ekkkkkkkkkkeee	604
601270	2603	2618	エクソン 18	AGCTGTTTAAAT CAA	47	7838	7853	ekkkkkkkkkkeee	605
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTT TTAATTCA	3	7839	7858	eeeeeeeeee ee	317
601271	2604	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTAA TTCA	26	7839	7854	ekkkkkkkkkkeee	606

10

20

30

40

【 1 3 5 5 】

50

【表 1 3 5 - 5】

601272	2605	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTAA ATTC	33	7840	7855	ekkkkkkkkkkkkeee	607
601273	2606	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTT AATT	34	7841	7856	ekkkkkkkkkkkkeee	608
601274	2607	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTT TAAT	39	7842	7857	ekkkkkkkkkkkkeee	609
588860	2608	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTT TTAA	72	7843	7858	ekkkkkkkkkkkkeee	610
601275	2608	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTT TTAA	65	7843	7858	ekkkkkkkkkkkkeee	610
601276	2609	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGT TTTA	65	7844	7859	ekkkkkkkkkkkkeee	611
601277	2610	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTG TTTT	51	7845	7860	ekkkkkkkkkkkkeee	612
601278	2611	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCT GTTT	78	7846	7861	ekkkkkkkkkkkkeee	613
601279	2612	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGC TGTT	79	7847	7862	ekkkkkkkkkkkkeee	614
601280	2613	2628	エクソン 18/ リピート	TTGTTGTCGCAG CTGT	70	n/a	n/a	ekkkkkkkkkkkkeee	615
601281	2614	2629	エクソン 18/ リピート	TTTGTTGTCGCA GCTG	78	n/a	n/a	ekkkkkkkkkkkkeee	616
601282	2615	2630	エクソン 18/ リピート	TTTTGTTGTCGC AGCT	68	n/a	n/a	ekkkkkkkkkkkkeee	617
601283	2616	2631	エクソン 18/ リピート	TTTTGTTGTCG CAGC	61	n/a	n/a	ekkkkkkkkkkkkeee	618

10

20

30

【 1 3 5 6 】

40

50

【表 1 3 6 - 1】

表 1 4 4 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とするデオキシ、MOE 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	標的領域	配列	% 阻害	配列番号 2 開始部位	配列番号 2 終止部位	モチーフ	配列番号
601306	2573	2588	エクソン 18	CCAGCAG GAAACCCC T	22	7808	7823	ekkkkkkkkkk keee	575
601307	2574	2589	エクソン 18	TCCAGCAG GAAACCCC	22	7809	7824	ekkkkkkkkkk keee	576
601308	2575	2590	エクソン 18	GTCCAGCA GGAAACC C	33	7810	7825	ekkkkkkkkkk keee	577
601309	2576	2591	エクソン 18	TGTCCAGC AGGAAAC C	33	7811	7826	ekkkkkkkkkk keee	578
601310	2577	2592	エクソン 18	CTGTCCAG CAGGAAA C	28	7812	7827	ekkkkkkkkkk keee	579
601311	2578	2593	エクソン 18	CCTGTCCA GCAGGAA A	33	7813	7828	ekkkkkkkkkk keee	580
601312	2579	2594	エクソン 18	CCCTGTCC AGCAGGA A	13	7814	7829	ekkkkkkkkkk keee	581
601313	2580	2595	エクソン 18	CCCCTGTC CAGCAGG A	32	7815	7830	ekkkkkkkkkk keee	582
601314	2581	2596	エクソン 18	GCCCCTGT CCAGCAG G	0	7816	7831	ekkkkkkkkkk keee	583
601315	2582	2597	エクソン 18	CGCCCCTG TCCAGCAG	36	7817	7832	ekkkkkkkkkk keee	584
601316	2583	2598	エクソン 18	ACGCCCT GTCCAGCA	39	7818	7833	ekkkkkkkkkk keee	585
601317	2584	2599	エクソン 18	CACGCCCC TGTCCAGC	33	7819	7834	ekkkkkkkkkk keee	586

【 1 3 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 6 - 2】

601356	2584	2599	エクソン 18	CACGCCCC TGTCCAGC	27	7819	7834	kkkdddddddk eeee	586
601318	2585	2600	エクソン 18	CCACGCCC CTGTCCAG	35	7820	7835	ekkdddddddk keee	587
601357	2585	2600	エクソン 18	CCACGCCC CTGTCCAG	26	7820	7835	kkkdddddddk eeee	587
601319	2586	2601	エクソン 18	CCCACGCC CCTGTCCA	33	7821	7836	ekkdddddddk keee	588
601358	2586	2601	エクソン 18	CCCACGCC CCTGTCCA	26	7821	7836	kkkdddddddk eeee	588
601320	2587	2602	エクソン 18	TCCCACGC CCCTGTCC	25	7822	7837	ekkdddddddk keee	589
601359	2587	2602	エクソン 18	TCCCACGC CCCTGTCC	23	7822	7837	kkkdddddddk eeee	589
601321	2588	2603	エクソン 18	ATCCCACG CCCCTGTC	50	7823	7838	ekkdddddddk keee	590
601360	2588	2603	エクソン 18	ATCCCACG CCCCTGTC	33	7823	7838	kkkdddddddk eeee	590
601322	2589	2604	エクソン 18	AATCCCAC GCCCTGT	52	7824	7839	ekkdddddddk keee	591
601361	2589	2604	エクソン 18	AATCCCAC GCCCTGT	48	7824	7839	kkkdddddddk eeee	591
601323	2590	2605	エクソン 18	CAATCCCA CGCCCCTG	67	7825	7840	ekkdddddddk keee	592
601362	2590	2605	エクソン 18	CAATCCCA CGCCCCTG	51	7825	7840	kkkdddddddk eeee	592
601324	2591	2606	エクソン 18	TCAATCCC ACGCCCT	42	7826	7841	ekkdddddddk keee	593
601363	2591	2606	エクソン 18	TCAATCCC ACGCCCT	42	7826	7841	kkkdddddddk eeee	593
601325	2592	2607	エクソン 18	TTCAATCC CACGCCCC	52	7827	7842	ekkdddddddk keee	594
601364	2592	2607	エクソン 18	TTCAATCC CACGCCCC	48	7827	7842	kkkdddddddk eeee	594
601326	2593	2608	エクソン 18	ATTCAATC CCACGCCC	27	7828	7843	ekkdddddddk keee	595
601365	2593	2608	エクソン 18	ATTCAATC CCACGCCC	36	7828	7843	kkkdddddddk eeee	595

10

20

30

40

【 1 3 5 8 】

50

【表 1 3 6 - 3】

601327	2594	2609	エクソン 18	AATTCAAT CCCACGCC	66	7829	7844	ekkkkkkkkkk keee	596
601366	2594	2609	エクソン 18	AATTCAAT CCCACGCC	49	7829	7844	kkkkkkkkkkk eeee	596
601328	2595	2610	エクソン 18	TAATTCAA TCCCACGC	55	7830	7845	ekkkkkkkkkk keee	597
601367	2595	2610	エクソン 18	TAATTCAA TCCCACGC	57	7830	7845	kkkkkkkkkkk eeee	597
601329	2596	2611	エクソン 18	TTAATTCA ATCCCACG	69	7831	7846	ekkkkkkkkkk keee	598
601368	2596	2611	エクソン 18	TTAATTCA ATCCCACG	68	7831	7846	kkkkkkkkkkk eeee	598
601330	2597	2612	エクソン 18	TTTAATTC AATCCCAC	58	7832	7847	ekkkkkkkkkk keee	599
601369	2597	2612	エクソン 18	TTTAATTC AATCCCAC	65	7832	7847	kkkkkkkkkkk eeee	599
601331	2598	2613	エクソン 18	TTTTAATTC AATCCCA	45	7833	7848	ekkkkkkkkkk keee	600
601370	2598	2613	エクソン 18	TTTTAATTC AATCCCA	42	7833	7848	kkkkkkkkkkk eeee	600
601332	2599	2614	エクソン 18	GTTTTAAT TCAATCCC	84	7834	7849	ekkkkkkkkkk keee	601
601371	2599	2614	エクソン 18	GTTTTAAT TCAATCCC	79	7834	7849	kkkkkkkkkkk eeee	601
601333	2600	2615	エクソン 18	TGTTTTAA TTCAATCC	61	7835	7850	ekkkkkkkkkk keee	602
601372	2600	2615	エクソン 18	TGTTTTAA TTCAATCC	71	7835	7850	kkkkkkkkkkk eeee	602
601334	2601	2616	エクソン 18	CTGTTTTA ATTCAATC	61	7836	7851	ekkkkkkkkkk keee	603
601373	2601	2616	エクソン 18	CTGTTTTA ATTCAATC	57	7836	7851	kkkkkkkkkkk eeee	603
601335	2602	2617	エクソン 18	GCTGTTTT AATTCAAT	73	7837	7852	ekkkkkkkkkk keee	604
601374	2602	2617	エクソン 18	GCTGTTTT AATTCAAT	66	7837	7852	kkkkkkkkkkk eeee	604
601336	2603	2618	エクソン 18	AGCTGTTT TAATTCAA	64	7838	7853	ekkkkkkkkkk keee	605

10

20

30

40

【 1 3 5 9】

50

【表 1 3 6 - 4】

601375	2603	2618	エクソン 18	AGCTGTTT TAATTCAA	61	7838	7853	kkkdddddddk eeee	605
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGC TGTTTTAA TTCA	66	7839	7858	eeeeeeee dddeeee	317
601337	2604	2619	エクソン 18	CAGCTGTT TTAATTCA	53	7839	7854	ekkddddddk keee	606
601376	2604	2619	エクソン 18	CAGCTGTT TTAATTCA	39	7839	7854	kkkddddddk eeee	606
601338	2605	2620	エクソン 18	GCAGCTGT TTAATTC	67	7840	7855	ekkddddddk keee	607
601377	2605	2620	エクソン 18	GCAGCTGT TTAATTC	67	7840	7855	kkkddddddk eeee	607
601339	2606	2621	エクソン 18	CGCAGCTG TTTTAATT	63	7841	7856	ekkddddddk keee	608
601378	2606	2621	エクソン 18	CGCAGCTG TTTTAATT	60	7841	7856	kkkddddddk eeee	608
601340	2607	2622	エクソン 18	TCGCAGCT GTTTTAAT	40	7842	7857	ekkddddddk keee	609
601379	2607	2622	エクソン 18	TCGCAGCT GTTTTAAT	36	7842	7857	kkkddddddk eeee	609
588860	2608	2623	エクソン 18	GTCGCAGC TGTTTTAA	84	7843	7858	eekddddddd dkke	610
601341	2608	2623	エクソン 18	GTCGCAGC TGTTTTAA	74	7843	7858	ekkddddddk keee	610
601380	2608	2623	エクソン 18	GTCGCAGC TGTTTTAA	78	7843	7858	kkkddddddk eeee	610
601342	2609	2624	エクソン 18	TGTCGCAG CTGTTTAA	68	7844	7859	ekkddddddk keee	611
601381	2609	2624	エクソン 18	TGTCGCAG CTGTTTAA	66	7844	7859	kkkddddddk eeee	611
601343	2610	2625	エクソン 18	TTGTCGCA GCTGTTTT	71	7845	7860	ekkddddddk keee	612
601382	2610	2625	エクソン 18	TTGTCGCA GCTGTTTT	84	7845	7860	kkkddddddk eeee	612
601344	2611	2626	エクソン 18	GTTGTCGC AGCTGTTT	87	7846	7861	ekkddddddk keee	613
601383	2611	2626	エクソン 18	GTTGTCGC AGCTGTTT	85	7846	7861	kkkddddddk eeee	613

10

20

30

40

【 1 3 6 0 】

50

【表 1 3 6 - 5】

601345	2612	2627	エクソン 18	TGTTGTCG CAGCTGTT	82	7847	7862	ekkkkkkkkkk keee	614
601384	2612	2627	エクソン 18	TGTTGTCG CAGCTGTT	79	7847	7862	kkkkkkkkkkk eeee	614
601346	2613	2628	エクソン 18 /リピート	TTGTTGTC GCAGCTGT	73	n/a	n/a	ekkkkkkkkkk keee	615
601385	2613	2628	エクソン 18 /リピート	TTGTTGTC GCAGCTGT	84	n/a	n/a	kkkkkkkkkkk eeee	615
601347	2614	2629	エクソン 18 /リピート	TTTGTGTT CGCAGCTG	70	n/a	n/a	ekkkkkkkkkk keee	616
601386	2614	2629	エクソン 18 /リピート	TTTGTGTT CGCAGCTG	71	n/a	n/a	kkkkkkkkkkk eeee	616
601348	2615	2630	エクソン 18 /リピート	TTTTGTTG TCGCAGCT	71	n/a	n/a	ekkkkkkkkkk keee	617
601387	2615	2630	エクソン 18 /リピート	TTTTGTTG TCGCAGCT	76	n/a	n/a	kkkkkkkkkkk eeee	617
601349	2616	2631	エクソン 18 /リピート	TTTTTGTG GTCGCAGC	71	n/a	n/a	ekkkkkkkkkk keee	618
601388	2616	2631	エクソン 18 /リピート	TTTTTGTG GTCGCAGC	67	n/a	n/a	kkkkkkkkkkk eeee	618

10

20

【 1 3 6 1】

【表 1 3 7 - 1】

表 1 4 5 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とする MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列 番号1 開始 部位	配列 番号1 終了 部位	標的領域	配列	% 阻害	配列 番号2 開始 部位	配列 番号2 終了 部位	モチ ーフ	配 列 番 号
599357	2582	2600	エクソン 18	CCACGCCCTGTCCAGCAG	26	7817	7835	5-9-5	708
599358	2583	2601	エクソン 18	CCCACGCCCTGTCCAGCA	22	7818	7836	5-9-5	709
599359	2584	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCTGTCCAGC	13	7819	7837	5-9-5	710
599360	2585	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCTGTCCAG	7	7820	7838	5-9-5	711
599361	2586	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCTGTCCA	11	7821	7839	5-9-5	712
599362	2587	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCTGTCC	14	7822	7840	5-9-5	713
599363	2588	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCTGTC	17	7823	7841	5-9-5	714
599364	2589	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCCTGT	20	7824	7842	5-9-5	715
599365	2590	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCACGCCCTG	22	7825	7843	5-9-5	716
599366	2591	2609	エクソン 18	AATTCAATCCCACGCCCT	13	7826	7844	5-9-5	717
599367	2592	2610	エクソン 18	TAATTCAATCCCACGCC	11	7827	7845	5-9-5	718

30

40

【 1 3 6 2】

50

【表 1 3 7 - 2】

599368	2593	2611	エクソン 18	TTAATTCAATCCCACGCC	10	7828	7846	5-9-5	719
599369	2594	2612	エクソン 18	TTTAATTCAATCCCACGCC	19	7829	7847	5-9-5	720
599370	2595	2613	エクソン 18	TTTTAATTCAATCCCACGC	23	7830	7848	5-9-5	721
599371	2596	2614	エクソン 18	GTTTAAATTCAATCCCACG	4	7831	7849	5-9-5	722
599372	2597	2615	エクソン 18	TGTTTTAATTCAATCCCAC	16	7832	7850	5-9-5	723
599373	2598	2616	エクソン 18	CTGTTTTAATTCAATCCCA	3	7833	7851	5-9-5	724
599374	2599	2617	エクソン 18	GCTGTTTTAATCAATCCC	10	7834	7852	5-9-5	725
599375	2600	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAATCAATCC	17	7835	7853	5-9-5	726
599376	2601	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTTAATCAATC	18	7836	7854	5-9-5	727
599377	2602	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTTAATCAAT	22	7837	7855	5-9-5	728
599378	2603	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTTAATCAA	11	7838	7856	5-9-5	729
599511	2552	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCAAATCCTCA	7	7787	7806	6-8-6	410
599389	2553	2572	エクソン 18	TATAGAAAACCCAAATCCTC	22	7788	7807	6-8-6	411
599390	2554	2573	エクソン 18	TTATAGAAAACCCAAATCCT	21	7789	7808	6-8-6	412
599391	2555	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAACCCAAATCC	27	7790	7809	6-8-6	413
599392	2556	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAACCCAAATC	30	7791	7810	6-8-6	414
599393	2557	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAAACCCAAAT	30	7792	7811	6-8-6	415
599394	2558	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAACCCAAA	28	7793	7812	6-8-6	416
599395	2559	2578	エクソン 18	ACCCTTATAGAAAACCCAA	23	7794	7813	6-8-6	417
599396	2560	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAGAAAACCCA	53	7795	7814	6-8-6	418
599397	2561	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATAGAAAACCC	33	7796	7815	6-8-6	419
599398	2562	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTATAGAAAACC	58	7797	7816	6-8-6	420
599399	2563	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTATAGAAAAC	23	7798	7817	6-8-6	421
599400	2564	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTTATAGAAA	54	7799	7818	6-8-6	422
599401	2565	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCTTATAGAAA	30	7800	7819	6-8-6	423
599402	2566	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCCCTTATAGAA	25	7801	7820	6-8-6	424
599403	2567	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCCCTTATAGA	17	7802	7821	6-8-6	425
599404	2568	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAACCCCTTATAG	20	7803	7822	6-8-6	426
599405	2569	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAACCCCTTATA	12	7804	7823	6-8-6	427
599406	2570	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAAACCCCTTAT	51	7805	7824	6-8-6	428
599407	2571	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGAAACCCCTTA	39	7806	7825	6-8-6	237
599408	2572	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGAAACCCCTT	53	7807	7826	6-8-6	429
599409	2573	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAGGAAACCCCT	65	7808	7827	6-8-6	430
599410	2574	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAGGAAACCCC	56	7809	7828	6-8-6	431
599411	2575	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCAGGAAACCC	60	7810	7829	6-8-6	432
599412	2576	2595	エクソン 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAACC	61	7811	7830	6-8-6	433
599413	2577	2596	エクソン 18	GCCCCTGTCCAGCAGGAAAC	40	7812	7831	6-8-6	238
599414	2578	2597	エクソン 18	CGCCCTGTCCAGCAGGAAA	41	7813	7832	6-8-6	434

10

20

30

40

【 1 3 6 3 】

50

【表 1 3 7 - 3】

599415	2579	2598	エクソン 18	ACGCCCTGTCCAGCAGGAA	37	7814	7833	6-8-6	435
599416	2580	2599	エクソン 18	CACGCCCTGTCCAGCAGGA	54	7815	7834	6-8-6	436
599417	2581	2600	エクソン 18	CCACGCCCTGTCCAGCAGG	36	7816	7835	6-8-6	437
599418	2582	2601	エクソン 18	CCCACGCCCTGTCCAGCAG	53	7817	7836	6-8-6	438
599419	2583	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCTGTCCAGCA	54	7818	7837	6-8-6	439
599420	2584	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCTGTCCAGC	50	7819	7838	6-8-6	440
599421	2585	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCTGTCCAG	48	7820	7839	6-8-6	441
599422	2586	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCTGTCCA	55	7821	7840	6-8-6	442
599423	2587	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCTGTCC	75	7822	7841	6-8-6	443
599424	2588	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCCTGTC	69	7823	7842	6-8-6	444
599425	2589	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCACGCCCTGT	77	7824	7843	6-8-6	445
599426	2590	2609	エクソン 18	AATTCATCCCACGCCCTG	60	7825	7844	6-8-6	446
599427	2591	2610	エクソン 18	TAATTCATCCCACGCCCT	72	7826	7845	6-8-6	447
599428	2592	2611	エクソン 18	TTAATTCATCCCACGCC	81	7827	7846	6-8-6	448
599429	2593	2612	エクソン 18	TTTAATTCATCCCACGCC	68	7828	7847	6-8-6	449
599430	2594	2613	エクソン 18	TTTTAATTCATCCCACGCC	58	7829	7848	6-8-6	450
599431	2595	2614	エクソン 18	GTTTAATTCATCCCACGC	70	7830	7849	6-8-6	451
599432	2596	2615	エクソン 18	TGTTTAATTCATCCCACG	85	7831	7850	6-8-6	452
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTAATTCA	85	7839	7858	5-10-5	317
599379	2604	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTTAATTCA	73	7839	7857	5-9-5	730
599380	2605	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTAATTC	77	7840	7858	5-9-5	731
599381	2606	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTAATT	69	7841	7859	5-9-5	732
599382	2607	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTAAT	58	7842	7860	5-9-5	733
599383	2608	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTTTAA	52	7843	7861	5-9-5	734
599384	2609	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGTTTA	63	7844	7862	5-9-5	735
599385	2610	2628	エクソン 18 /リピート	TTGTTGTCGCAGCTGTTT	53	n/a	n/a	5-9-5	736
599386	2611	2629	エクソン 18 /リピート	TTTGTGTCGCAGCTGTTT	63	n/a	n/a	5-9-5	737
599387	2612	2630	エクソン 18 /リピート	TTTTGTGTCGCAGCTGTT	64	n/a	n/a	5-9-5	438
599388	2613	2631	エクソン 18 /リピート	TTTTGTGTCGCAGCTGT	66	n/a	n/a	5-9-5	739

10

20

30

【 1 3 6 4 】

40

50

【表 1 3 8 - 1】

表 1 4 6 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とする MOE ギャップマーによる CFB mR NA の阻害

ISIS 番号	配列番号 1 開始部位	配列番号 1 終止部位	標的領域	配列	% 阻害	配列番号 2 開始部位	配列番号 2 終止部位	モチーフ	配列番号
599213	2553	2570	エクソン 18	TAGAAAACCCAAATCCTC	0	7788	7805	3-10-5	785
599214	2554	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCAAATCCT	0	7789	7806	3-10-5	786
599215	2555	2572	エクソン 18	TATAGAAAACCCAAATCC	36	7790	7807	3-10-5	787
599216	2556	2573	エクソン 18	TTATAGAAAACCCAAATC	8	7791	7808	3-10-5	788
599217	2557	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAACCCAAAT	5	7792	7809	3-10-5	789
599218	2558	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAACCCAAA	0	7793	7810	3-10-5	790
599219	2559	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAAACCCAA	8	7794	7811	3-10-5	791
599220	2560	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAACCCA	0	7795	7812	3-10-5	740
599221	2561	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGAAAACCC	54	7796	7813	3-10-5	741
599222	2562	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAGAAAACC	3	7797	7814	3-10-5	742
599223	2563	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATAGAAAAC	0	7798	7815	3-10-5	743
599224	2564	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTATAGAAAA	0	7799	7816	3-10-5	744
599225	2566	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTTATAGAA	60	7801	7818	3-10-5	745
599226	2567	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCTTATAGA	0	7802	7819	3-10-5	746
599227	2568	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCCCTTATAG	37	7803	7820	3-10-5	747
599228	2569	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCCCTTATA	0	7804	7821	3-10-5	748
599229	2570	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAACCCCTTAT	39	7805	7822	3-10-5	749
599230	2571	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAACCCCTTA	10	7806	7823	3-10-5	750
599231	2572	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAAACCCCTT	16	7807	7824	3-10-5	751
599232	2573	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGAAACCCCT	9	7808	7825	3-10-5	752
599233	2574	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGAAACCC	44	7809	7826	3-10-5	753
599234	2575	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAGGAAACCC	14	7810	7827	3-10-5	754
599235	2576	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAGGAAACC	0	7811	7828	3-10-5	755
599236	2577	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCAGGAAAC	43	7812	7829	3-10-5	756
599237	2578	2595	エクソン 18	CCCCTGTCCAGCAGGAAA	0	7813	7830	3-10-5	757
599238	2580	2597	エクソン 18	CGCCCTGTCCAGCAGGA	9	7815	7832	3-10-5	758
599239	2581	2598	エクソン 18	ACGCCCTGTCCAGCAGG	36	7816	7833	3-10-5	759
599240	2582	2599	エクソン 18	CACGCCCTGTCCAGCAG	11	7817	7834	3-10-5	760
599241	2583	2600	エクソン 18	CCACGCCCTGTCCAGCA	51	7818	7835	3-10-5	761
599242	2584	2601	エクソン 18	CCCACGCCCTGTCCAGC	7	7819	7836	3-10-5	762
599243	2585	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCTGTCCAG	47	7820	7837	3-10-5	763
599244	2586	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCTGTCCA	37	7821	7838	3-10-5	764

10

20

30

40

【 1 3 6 5 】

50

【表 1 3 8 - 2】

599245	2587	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCTGTCC	35	7822	7839	3-10-5	765
599246	2588	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCTGTC	21	7823	7840	3-10-5	766
599247	2589	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCTGT	61	7824	7841	3-10-5	767
599248	2590	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCCTG	51	7825	7842	3-10-5	768
599249	2591	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCACGCCCT	58	7826	7843	3-10-5	769
599250	2592	2609	エクソン 18	AATTCAATCCCACGCC	49	7827	7844	3-10-5	770
599251	2593	2610	エクソン 18	TAATTCAATCCCACGCC	46	7828	7845	3-10-5	771
599252	2594	2611	エクソン 18	TTAATTCAATCCCACGCC	32	7829	7846	3-10-5	772
599253	2595	2612	エクソン 18	TTTAATTCAATCCCACGC	23	7830	7847	3-10-5	773
599254	2596	2613	エクソン 18	TTTAATTCAATCCCACG	0	7831	7848	3-10-5	774
599255	2597	2614	エクソン 18	GTTTAATTCAATCCCAC	61	7832	7849	3-10-5	775
599256	2598	2615	エクソン 18	TGTTTAATTCAATCCCA	64	7833	7850	3-10-5	776
599257	2599	2616	エクソン 18	CTGTTTAATTCAATCCC	66	7834	7851	3-10-5	777
599258	2600	2617	エクソン 18	GCTGTTTAATTCAATCC	59	7835	7852	3-10-5	778
599259	2601	2618	エクソン 18	AGCTGTTTAATTCAATC	40	7836	7853	3-10-5	779
599260	2602	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTAATTCAAT	38	7837	7854	3-10-5	780
599261	2603	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTAATTCAA	54	7838	7855	3-10-5	781
599509	2552	2570	エクソン 18	TAGAAAACCCAAATCCTCA	54	7787	7805	6-7-6	681
599273	2553	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCAAATCCTC	0	7788	7806	6-7-6	682
599274	2554	2572	エクソン 18	TATAGAAAACCCAAATCCT	57	7789	7807	6-7-6	683
599275	2556	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAACCCAAATC	0	7791	7809	6-7-6	684
599276	2557	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAACCCAAAT	44	7792	7810	6-7-6	685
599277	2558	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAAACCCAAA	0	7793	7811	6-7-6	686
599278	2559	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAACCCAA	0	7794	7812	6-7-6	687
599279	2560	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGAAAACCCA	20	7795	7813	6-7-6	688
599280	2561	2579	エクソン 18	AACCCTTATAGAAAACCC	70	7796	7814	6-7-6	689
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTAATTCA	85	7839	7858	5-10-5	317
599262	2604	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTAATTCA	49	7839	7856	3-10-5	782
599263	2605	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTTAATTC	49	7840	7857	3-10-5	783
599264	2606	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTAATT	62	7841	7858	3-10-5	784
599265	2607	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTAAT	63	7842	7859	3-10-5	792
599266	2608	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTAA	41	7843	7860	3-10-5	793
599267	2609	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTTTA	52	7844	7861	3-10-5	794
599268	2610	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGTTT	51	7845	7862	3-10-5	795
599269	2611	2628	エクソン 18 ／リピート	TTGTTGTCGCAGCTGTTT	58	n/a	n/a	3-10-5	796

10

20

30

40

【 1 3 6 6 】

50

【表 1 3 8 - 3】

599270	2612	2629	エクソン 18 ／リピート	TTTGTTGTCGCAGCTGTT	69	n/a	n/a	3-10-5	797
599271	2613	2630	エクソン 18 ／リピート	TTTTGTTGTCGCAGCTGT	69	n/a	n/a	3-10-5	798
599272	2614	2631	エクソン 18 ／リピート	TTTTTGTGTCGCAGCTG	72	n/a	n/a	3-10-5	799
599205	2607	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTAAT	54	7842	7859	5-8-5	792
599206	2608	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTAA	62	7843	7860	5-8-5	793
599207	2609	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTTTA	62	7844	7861	5-8-5	794
599208	2610	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGTTT	66	7845	7862	5-8-5	795
599209	2611	2628	エクソン 18 ／リピート	TTGTTGTCGCAGCTGTTT	60	n/a	n/a	5-8-5	796
599210	2612	2629	エクソン 18 ／リピート	TTTGTTGTCGCAGCTGTT	62	n/a	n/a	5-8-5	797
599211	2613	2630	エクソン 18 ／リピート	TTTTGTTGTCGCAGCTGT	65	n/a	n/a	5-8-5	798
599212	2614	2631	エクソン 18 ／リピート	TTTTTGTGTCGCAGCTG	67	n/a	n/a	5-8-5	799

10

20

【 1 3 6 7 】

【表 1 3 9 - 1】

表 1 4 7 : 配列番号 1 または配列番号 2 を標的とする 5 - 1 0 - 5 MOE ギャップマーによる CFB mRNA の阻害

ISIS 番号	配列 番号 1 開始 部位	配列 番号 1 終止 部位	標的領域	配列	% 阻害	配列 番号 2 開始 部位	配列 番号 2 終止 部位	配列 番号
588570	150	169	エクソン 1	TGGTCACATTCCTTC CCCT	72	1871	1890	396
588571	152	171	エクソン 1	CCTGGTCACATTCCT TCCC	80	1873	1892	397
532614	154	173	エクソン 1	GACCTGGTCACATTC CCTTC	65	1875	1894	12
588572	156	175	エクソン 1	TAGACCTGGTCACAT TCCCT	74	1877	1896	398
588573	158	177	エクソン 1	CCTAGACCTGGTCAC ATCC	72	1879	1898	399
588566	2189	2208	エクソン 15	CCTTCCGAGTCAGCT TTTC	66	6977	6996	400

30

40

【 1 3 6 8 】

50

【表 1 3 9 - 2】

588567	2191	2210	エクソン 15	CTCCTCCGAGTCAG CTTTT	66	6979	6998	401
532770	2193	2212	エクソン 15	ACCTCCTCCGAGTC AGCTT	64	6981	7000	198
588568	2195	2214	エクソン 15	AGACCTCCTCCGAG TCAGC	78	6983	7002	402
588569	2197	2216	エクソン 15	GTAGACCTCCTCCG AGTCA	74	6985	7004	403
588574	2453	2472	エクソン 18	TTTGCCGCTTCTGGTT TTTG	71	7688	7707	404
588575	2455	2474	エクソン 18	CTTTTGCCGCTTCTGG TTTT	72	7690	7709	405
532800	2457	2476	エクソン 18	TGCTTTTGCCGCTTCT GGTT	71	7692	7711	228
588576	2459	2478	エクソン 18	CCTGCTTTTGCCGCTT CTGG	59	7694	7713	406
588577	2461	2480	エクソン 18	TACCTGCTTTTGCCGC TTCT	76	7696	7715	407
516350	2550	2569	エクソン 18	AGAAAACCCAAATCC TCATC	58	7785	7804	408
588509	2551	2570	エクソン 18	TAGAAAACCCAAATC CTCAT	6	7786	7805	409
588510	2552	2571	エクソン 18	ATAGAAAACCCAAAT CCTCA	10	7787	7806	410
588511	2553	2572	エクソン 18	TATAGAAAACCCAAA TCCTC	9	7788	7807	411
588512	2554	2573	エクソン 18	TTATAGAAAACCCAA ATCCT	80	7789	7808	412
588513	2555	2574	エクソン 18	CTTATAGAAAACCCA AATCC	70	7790	7809	413
588514	2556	2575	エクソン 18	CCTTATAGAAAACCC AAATC	71	7791	7810	414
588515	2557	2576	エクソン 18	CCCTTATAGAAAACC CAAAT	78	7792	7811	415
588516	2558	2577	エクソン 18	CCCCTTATAGAAAAC CCAAA	72	7793	7812	416
588517	2559	2578	エクソン 18	ACCCCTTATAGAAAA CCCAA	80	7794	7813	417

10

20

30

40

【 1 3 6 9 】

50

【表 1 3 9 - 3】

588518	2560	2579	エクソン 18	AACCCCTTATAGAAA ACCCA	80	7795	7814	418
588519	2561	2580	エクソン 18	AAACCCCTTATAGAA AACCC	62	7796	7815	419
588520	2562	2581	エクソン 18	GAAACCCCTTATAGA AAACC	59	7797	7816	420
588521	2563	2582	エクソン 18	GGAAACCCCTTATAG AAAAC	40	7798	7817	421
588522	2564	2583	エクソン 18	AGGAAACCCCTTATA GAAAA	66	7799	7818	422
588523	2565	2584	エクソン 18	CAGGAAACCCCTTAT AGAAA	63	7800	7819	423
588524	2566	2585	エクソン 18	GCAGGAAACCCCTTA TAGAA	70	7801	7820	424
588525	2567	2586	エクソン 18	AGCAGGAAACCCCTT ATAGA	67	7802	7821	425
588526	2568	2587	エクソン 18	CAGCAGGAAACCCCT TATAG	0	7803	7822	426
588527	2569	2588	エクソン 18	CCAGCAGGAAACCCC TTATA	11	7804	7823	427
588528	2570	2589	エクソン 18	TCCAGCAGGAAACCC CTTAT	15	7805	7824	428
532809	2571	2590	エクソン 18	GTCCAGCAGGAAACC CCTTA	75	7806	7825	237
588529	2572	2591	エクソン 18	TGTCCAGCAGGAAAC CCCTT	16	7807	7826	429
588530	2573	2592	エクソン 18	CTGTCCAGCAGGAAA CCCCT	16	7808	7827	430
588531	2574	2593	エクソン 18	CCTGTCCAGCAGGAA ACCCC	19	7809	7828	431
588532	2575	2594	エクソン 18	CCCTGTCCAGCAGGA AACCC	15	7810	7829	432
588533	2576	2595	エクソン 18	CCCCTGTCCAGCAGG AAACC	29	7811	7830	433
532810	2577	2596	エクソン 18	GCCCCTGTCCAGCAG GAAAC	74	7812	7831	238
588534	2578	2597	エクソン 18	CGCCCCTGTCCAGCA GGAAA	21	7813	7832	434

【 1 3 7 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 3 9 - 4】

588535	2579	2598	エクソン 18	ACGCCCCTGTCCAGC AGGAA	16	7814	7833	435
588536	2580	2599	エクソン 18	CACGCCCCTGTCCAG CAGGA	0	7815	7834	436
588537	2581	2600	エクソン 18	CCACGCCCCTGTCCA GCAGG	8	7816	7835	437
588538	2582	2601	エクソン 18	CCCACGCCCTGTCC AGCAG	10	7817	7836	438
588539	2583	2602	エクソン 18	TCCCACGCCCTGT CAGCA	23	7818	7837	439
588540	2584	2603	エクソン 18	ATCCCACGCCCTGT CCAGC	16	7819	7838	440
588541	2585	2604	エクソン 18	AATCCCACGCCCTG TCCAG	16	7820	7839	441
588542	2586	2605	エクソン 18	CAATCCCACGCCCT GTCCA	12	7821	7840	442
588543	2587	2606	エクソン 18	TCAATCCCACGCCCC TGTC	26	7822	7841	443
588544	2588	2607	エクソン 18	TTCAATCCCACGCCC CTGTC	26	7823	7842	444
588545	2589	2608	エクソン 18	ATTCAATCCCACGCCC CTGT	31	7824	7843	445
588546	2590	2609	エクソン 18	AATCAATCCCACGC CCCTG	22	7825	7844	446
588547	2591	2610	エクソン 18	TAATCAATCCCACGC CCCT	12	7826	7845	447
588548	2592	2611	エクソン 18	TTAATCAATCCCACG CCCC	20	7827	7846	448
588549	2593	2612	エクソン 18	TTAATCAATCCCAC GCC	26	7828	7847	449
588550	2594	2613	エクソン 18	TTTTAATCAATCCCA CGCC	32	7829	7848	450
588551	2595	2614	エクソン 18	GTTTAAATCAATCCC ACGC	48	7830	7849	451
588552	2596	2615	エクソン 18	TGTTTAAATCAATCC CACG	57	7831	7850	452
588553	2597	2616	エクソン 18	CTGTTTAAATCAATC CCAC	49	7832	7851	453

10

20

30

40

【 1 3 7 1 】

50

【表 1 3 9 - 5】

588554	2598	2617	エクソン 18	GCTGTTTTAATTCAAT CCCA	64	7833	7852	454
532811	2599	2618	エクソン 18	AGCTGTTTTAATTCAA TCCC	78	7834	7853	239
588555	2600	2619	エクソン 18	CAGCTGTTTTAATTCA ATCC	48	7835	7854	455
588556	2601	2620	エクソン 18	GCAGCTGTTTTAATTC AATC	55	7836	7855	456
588557	2602	2621	エクソン 18	CGCAGCTGTTTTAATT CAAT	51	7837	7856	457
588558	2603	2622	エクソン 18	TCGCAGCTGTTTTAAT TCAA	51	7838	7857	458
532917	2604	2623	エクソン 18	GTCGCAGCTGTTTTAA TTCA	82	7839	7858	317
588559	2605	2624	エクソン 18	TGTCGCAGCTGTTTTA ATTC	58	7840	7859	459
588560	2606	2625	エクソン 18	TTGTCGCAGCTGTTTT AATT	72	7841	7860	460
588561	2607	2626	エクソン 18	GTTGTCGCAGCTGTT TTAAT	75	7842	7861	461
532952	2608	2627	エクソン 18	TGTTGTCGCAGCTGT TTTAA	39	7843	7862	395
588562	2609	2628	エクソン 18 /リピート	TTGTTGTCGCAGCTG TTTTA	53	n/a	n/a	462
588563	2610	2629	エクソン 18 /リピート	TTTGTGTCGCAGCT GTTTT	62	n/a	n/a	463
588564	2611	2630	エクソン 18 /リピート	TTTTGTTGTCGCAGCT GTTT	63	n/a	n/a	464
588565	2612	2631	エクソン 18 /リピート	TTTTTGTGTCGCAGC TGTT	64	n/a	n/a	465

【 1 3 7 2 】

実施例 1 2 2 : 5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーによる H e p G 2 細胞におけるヒト C F B の用量依存的アンチセンス阻害

上記の試験から、C F B mRNA のインビトロ阻害を呈するギャップマーを選択し、H e p G 2 細胞において、さまざまな用量で試験した。細胞を 1 ウェルあたり 2 0 , 0 0 0 細胞の密度でプレATINGし、エレクトロポレーションにより、以下の表に指定するとおり、0 . 3 1 3 μ M、0 . 6 2 5 μ M、1 . 2 5 μ M、2 . 5 0 μ M、5 . 0 0 μ M、または 1 0 . 0 0 μ M 濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。約 1 6 時間の処理期間後に、RNA を細胞から単離し、C F B mRNA レベルを定量リアルタイム PCR によって測定した。ヒトプライマープロブセット R T S 3 4 5 9 を使って mRNA レベルを測定した。R I B O G R E E N (登録商標) によって測定される全 RNA 含有量に従って C F B mRNA レベルを調整した。結果を、無処理対照細胞との比較で、C F B の阻害パーセントとして表す。

10

20

30

40

50

【 1 3 7 3 】

各オリゴヌクレオチドの50%阻害濃度（IC₅₀）も掲載する。アンチセンスオリゴヌクレオチド処理細胞ではCFB mRNAレベルが用量依存的に低減した。

【 1 3 7 4 】

【表 1 4 0】

表 1 4 8

ISIS 番号	0.313 μM	0.625 μM	1.25 μM	2.50 μM	5.00 μM	10.00 μM	IC ₅₀ (μM)
532614	7	13	43	72	65	71	2.2
532635	12	0	3	28	0	0	>10
532692	26	0	12	52	55	74	3.7
532770	21	18	32	73	64	88	1.8
532775	8	0	26	35	47	59	6.2
532800	0	5	30	65	50	75	3.1
532809	12	30	28	40	46	66	4.6
532810	28	44	32	69	84	95	1.2
532811	66	83	90	94	97	99	<0.3
532917	64	85	88	96	97	99	<0.3
532952	50	53	68	80	91	94	0.4

10

20

【 1 3 7 5 】

実施例 1 2 3 : H e p G 2 細胞におけるヒトCFBの用量依存的アンチセンス阻害

上記の試験から、CFB mRNAのインビトロ阻害を呈するギャップマーを選択し、H e p G 2 細胞において、さまざまな用量で試験した。類似する培養条件を使用するいくつかの実験でアンチセンスオリゴヌクレオチドを試験した。各実験に関する結果を以下に示す別々の表に掲載する。細胞を1ウェルあたり20,000細胞の密度でプレATINGし、エレクトロポレーションにより、以下の表に指定するとおり、0.08 μM、0.25 μM、0.74 μM、2.22 μM、6.67 μM、及び20.00 μM濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。約16時間の処理期間後に、RNAを細胞から単離し、CFB mRNAレベルを定量リアルタイムPCRによって測定した。ヒトプライマープローブセットRTS3459を使ってmRNAレベルを測定した。RIBOGREEN（登録商標）によって測定される全RNA含有量に従ってCFB mRNAレベルを調整した。結果を、無処理対照細胞との比較で、CFBの阻害パーセントとして表す。

30

【 1 3 7 6 】

各オリゴヌクレオチドの50%阻害濃度（IC₅₀）も掲載する。アンチセンスオリゴヌクレオチド処理細胞ではCFB mRNAレベルが用量依存的に低減した。

【 1 3 7 7 】

40

50

【表 1 4 1】

表 1 4 9

ISIS 番号	0.08 μM	0.25 μM	0.74 μM	2.22 μM	6.67 μM	20.00 μM	IC ₅₀ (μM)
532811	19	53	81	87	96	97	0.2
588834	7	42	64	92	98	98	0.5
588835	11	30	66	89	97	97	0.5
588836	14	40	61	91	97	97	0.5
588837	6	39	67	89	96	97	0.5
588838	0	27	41	81	87	97	1.0
588842	17	51	68	86	93	95	0.3
588843	21	38	72	90	95	96	0.4
588870	9	31	56	88	95	97	0.6
588871	14	25	47	79	93	97	0.7
588872	18	28	59	84	92	97	0.6

10

【 1 3 7 8 】

【表 1 4 2】

表 1 5 0

ISIS 番号	0.08 μM	0.25 μM	0.74 μM	2.22 μM	6.67 μM	20.00 μM	IC ₅₀ (μM)
532811	31	70	89	94	97	97	0.1
588844	31	60	77	91	95	96	0.1
588846	32	52	78	89	95	97	0.2
588847	22	52	77	91	95	97	0.2
588848	20	40	73	91	96	98	0.3
588851	40	52	82	94	97	97	0.1
588854	17	55	59	84	94	96	0.4
588855	10	32	56	82	93	96	0.6
588856	13	46	75	90	96	97	0.3
588857	11	52	73	94	96	97	0.3
588858	19	48	75	94	97	98	0.3

30

【 1 3 7 9 】

40

50

【表 1 4 3】

表 1 5 1

ISIS 番号	0.08 μM	0.25 μM	0.74 μM	2.22 μM	6.67 μM	20.00 μM	IC ₅₀ (μM)
532811	42	66	88	96	97	98	0.1
588859	18	46	66	90	96	97	0.4
588860	55	80	94	97	97	97	<0.1
588861	24	61	86	93	96	97	0.2
588862	25	64	85	94	96	98	0.1
588863	50	73	89	96	96	98	<0.1
588864	52	80	92	96	98	98	<0.1
588865	46	72	91	96	96	99	<0.1
588866	47	76	88	96	97	98	<0.1
588867	43	69	83	92	96	99	0.1
588868	43	56	65	84	93	97	0.1

10

【 1 3 8 0 】

【表 1 4 4】

表 1 5 2

ISIS 番号	0.08 μM	0.25 μM	0.74 μM	2.22 μM	6.67 μM	20.00 μM	IC ₅₀ (μM)
532810	0	14	38	72	89	96	1.2
532811	18	54	79	93	96	97	0.3
532952	19	34	73	87	94	96	0.4
588534	17	13	44	77	93	97	0.9
588544	12	43	69	86	89	93	0.4
588545	17	55	67	86	91	93	0.3
588546	10	32	67	85	91	93	0.6
588552	27	54	76	90	94	97	0.2
588553	32	68	87	93	95	97	0.1
588560	16	54	76	90	94	96	0.3
588561	18	45	68	85	93	96	0.4

30

【 1 3 8 1 】

40

50

【表 1 4 5】

表 1 5 3

ISIS 番号	0.08 μM	0.25 μM	0.74 μM	2.22 μM	6.67 μM	20.00 μM	IC ₅₀ (μM)
532811	22	60	82	94	97	98	0.2
588536	2	38	65	90	96	97	0.6
588537	12	38	63	87	94	97	0.5
588547	19	35	61	86	93	97	0.5
588548	19	36	75	88	95	96	0.4
588554	0	76	92	95	97	97	<0.1
588555	31	61	89	96	97	98	0.1
588556	33	56	82	95	94	97	0.1
588562	12	39	71	87	94	97	0.4
588563	25	48	72	86	94	96	0.3
588564	15	33	63	89	91	97	0.5

10

【 1 3 8 2 】

【表 1 4 6】

表 1 5 4

ISIS 番号	0.08 μM	0.25 μM	0.74 μM	2.22 μM	6.67 μM	20.00 μM	IC ₅₀ (μM)
532811	39	68	86	96	98	98	0.1
588538	0	40	82	94	97	98	0.3
588539	34	65	88	95	98	98	0.1
588540	30	51	81	91	97	98	0.2
588549	31	57	82	95	96	98	0.1
588550	34	65	88	96	98	98	0.1
588551	47	66	87	96	98	99	<0.1
588557	40	84	95	98	98	98	<0.1
588558	45	73	93	97	98	99	<0.1
588559	51	69	83	96	98	99	<0.1
588565	19	56	81	92	96	98	0.2

30

【 1 3 8 3 】

実施例 1 2 4 : H e p G 2 細胞におけるヒト C F B の用量依存的アンチセンス阻害
 上記の試験から、C F B mRNA のインビトロ阻害を呈するギャップマーを選択し、H e p G 2 細胞において、さまざまな用量で試験した。類似する培養条件を使用するいくつかの実験でアンチセンスオリゴヌクレオチドを試験した。各実験に関する結果を以下に示す別々の表に掲載する。細胞を 1 ウェルあたり 2 0 , 0 0 0 細胞の密度でプレATING し、エレクトロポレーションにより、以下の表に指定するとおり、0 . 0 6 μM 、0 . 2 5 μM 、1 . 0 0 μM 、及び 4 . 0 0 μM 濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。約 1 6 時間の処理期間後に、RNA を細胞から単離し、C F B mRNA レベルを定量リアルタイム PCR によって測定した。ヒトプライマープロベセット R T S 3 4 5 9 を使って mRNA レベルを測定した。R I B O G R E E N (登録商標) によって測定される全 RNA 含有量に従って C F B mRNA レベルを調整した。結果を、

40

50

無処理対照細胞との比較で、C F B の阻害パーセントとして表す。

【 1 3 8 4 】

各オリゴヌクレオチドの50%阻害濃度(IC₅₀)も掲載する。アンチセンスオリゴヌクレオチド処理細胞ではC F B mRNAレベルが用量依存的に低減した。

【 1 3 8 5 】

【表 1 4 7】

表 1 5 5

ISIS 番号	0.06 μM	0.25 μM	1.00 μM	4.00 μM	IC ₅₀ (μM)
532917	31	58	87	92	0.2
588860	18	50	79	93	0.3
599001	16	28	69	90	0.5
599024	14	32	74	90	0.4
599025	0	31	56	92	0.7
599032	28	44	62	88	0.3
599033	28	46	80	92	0.2
599077	8	20	59	80	0.8
599080	9	33	48	76	0.9
599086	7	22	53	83	0.8
599087	21	31	74	87	0.4
599088	13	37	69	82	0.5
599089	3	36	55	79	0.7
599093	25	59	79	88	0.2
599094	19	29	75	89	0.4
599095	29	43	67	87	0.3
599096	23	51	70	88	0.3
599149	20	53	82	92	0.3
599188	0	21	62	85	0.8

10

20

30

【 1 3 8 6 】

40

50

【表 1 4 8】

表 1 5 6

ISIS 番号	0.06 μM	0.25 μM	1.00 μM	4.00 μM	IC ₅₀ (μM)
532917	0	42	81	91	0.4
588860	17	49	74	92	0.3
599155	29	52	67	87	0.3
599198	3	25	64	89	0.6
599201	13	26	67	91	0.5
599202	0	44	72	87	0.5
599203	22	41	75	88	0.3
599314	12	34	71	84	0.5
599316	7	37	66	88	0.5
599317	8	1	54	83	1.0
599321	8	33	70	85	0.5
599322	24	38	66	87	0.4
599327	22	32	66	89	0.4
599328	0	31	59	88	0.7
599330	5	43	67	84	0.5
599374	23	42	80	91	0.3
599378	21	57	80	93	0.2
599380	23	56	82	93	0.2
599432	17	37	73	93	0.4

10

20

【 1 3 8 7 】

30

40

50

【表 1 4 9】

表 1 5 7

ISIS 番号	0.06 μM	0.25 μM	1.00 μM	4.00 μM	IC ₅₀ (μM)
532917	23	65	76	93	0.2
588860	17	60	76	90	0.3
601282	48	68	81	88	0.1
601269	18	59	80	94	0.2
601276	34	64	81	91	0.1
601275	14	39	78	90	0.4
601344	52	84	92	94	<0.06
601383	53	81	86	94	<0.06
601382	41	76	88	94	0.1
601385	52	74	89	91	<0.06
601332	41	69	86	94	0.1
601345	36	75	86	95	0.1
601371	34	72	91	93	0.1
601384	50	78	91	95	<0.06
601380	28	57	83	92	0.2
601387	48	61	82	88	0.1
601341	28	65	83	91	0.2
601346	31	69	82	93	0.1
601335	24	56	85	92	0.2

10

20

【 1 3 8 8 】

30

40

50

【表 1 5 0】

表 1 5 8

ISIS 番号	0.06 μM	0.25 μM	1.00 μM	4.00 μM	IC ₅₀ (μM)
532917	31	66	86	93	0.1
588860	28	62	85	94	0.2
599208	24	50	71	89	0.3
599261	31	49	81	94	0.2
599267	41	48	80	88	0.2
599268	28	56	75	92	0.2
599313	14	24	71	92	0.5
599441	24	57	80	87	0.2
599494	13	55	86	94	0.3
599552	30	69	93	95	0.1
599553	34	71	93	96	0.1
599554	30	74	93	96	0.1
599568	40	77	90	97	0.1
599570	61	82	93	96	<0.06
599577	18	62	81	93	0.2
599581	27	60	80	94	0.2
599591	49	74	93	96	<0.06
599592	46	76	90	94	0.1
599593	44	72	91	95	0.1

10

20

【 1 3 8 9 】

30

40

50

【表 1 5 1】

表 1 5 9

ISIS 番号	0.06 μM	0.25 μM	1.00 μM	4.00 μM	IC ₅₀ (μM)
532917	25	56	84	92	0.2
588860	11	51	80	92	0.3
599547	23	60	82	90	0.2
599569	42	73	85	88	0.1
599578	29	49	82	89	0.2
599582	21	56	78	91	0.2
599590	24	62	80	90	0.2
601209	21	49	85	88	0.3
601210	34	64	86	92	0.1
601212	46	68	88	90	0.1
601213	54	80	90	92	<0.06
601214	38	77	88	95	0.1
601215	42	64	85	92	0.1
601216	45	57	76	89	0.1
601264	29	58	86	95	0.2
601278	51	82	83	93	<0.06
601279	44	80	92	96	0.1
601280	44	73	87	94	0.1
601281	51	80	91	94	<0.06

【 1 3 9 0】

実施例 1 2 5 : H e p G 2 細胞におけるヒト C F B の用量依存的アンチセンス阻害

上記の試験から、C F B mRNA のインビトロ阻害を呈するギャップマーを選択し、H e p G 2 細胞において、さまざまな用量で試験した。加えて、もう一つのデオキシ、M O E 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチド I S I S 5 8 8 8 7 0 と同じ配列 (C T C C T T C C G A G T C A G C 、 配列番号 5 4 9) 及び標的領域 (標的開始部位は配列番号 1 の 2 1 9 5 と配列番号 2 の 6 9 8 3) を持つデオキシ、M O E 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドの一つ、I S I S 5 9 4 4 3 0 を設計した。I S I S 5 9 4 4 3 0 は 3 - 1 0 - 3 (S) - c E t ギャップマーである。

【 1 3 9 1】

細胞を 1 ウェルあたり 2 0 , 0 0 0 細胞の密度でプレーティングし、エレクトロポレーションにより、以下の表に指定するとおり、0 . 0 1 μM 、0 . 0 4 μM 、0 . 1 2 μM 、0 . 3 7 μM 、1 . 1 1 μM 、3 . 3 3 μM 、及び 1 0 . 0 0 μM 濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした。約 1 6 時間の処理期間後に、R N A を細胞から単離し、C F B mRNA レベルを定量リアルタイム P C R によって測定した。ヒトプライマープロベセット R T S 3 4 5 9 を使って mRNA レベルを測定した。R I B O G R E E N (登録商標) によって測定される全 R N A 含有量に従って C F B mRNA レベルを調整した。結果を、無処理対照細胞との比較で、C F B の阻害パーセントとして表す。

【 1 3 9 2】

各オリゴヌクレオチドの 5 0 % 阻害濃度 (I C 5 0) も掲載する。アンチセンスオリゴヌクレオチド処理細胞では C F B mRNA レベルが用量依存的に低減した。

【 1 3 9 3】

10

20

30

40

50

【表 1 5 2】

表 1 6 0

ISIS 番号	0.01 μM	0.04 μM	0.12 μM	0.37 μM	1.11 μM	3.33 μM	10.00 μM	IC ₅₀ (μM)
588536	0	0	0	5	45	73	94	1.4
588548	0	0	0	19	52	78	90	1.2
588553	0	0	9	42	76	85	94	0.6
588555	0	52	23	58	78	83	95	0.3
588847	4	1	18	45	67	84	96	0.5
588848	0	3	13	38	67	83	95	0.6
594430	0	0	10	34	50	55	84	1.4

10

【 1 3 9 4 】

実施例 1 2 6 : ヒト C F B を標的とする M O E ギャップマーの C D 1 マウスにおける耐容性 C D 1 (登録商標) マウス (Charles River, マサチューセッツ州) は多目的マウスモデルであり、安全性及び効力の試験にはよく利用されている。このマウスを上述の試験から選択した I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、さまざまな血漿中化学マーカーのレベルの変化について評価した。

20

【 1 3 9 5 】

試験 1 (5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーを使用)

7 週齢雄 C D 1 マウスの群に、週に 1 回、6 週にわたって 1 0 0 m g / k g の I S I S オリゴヌクレオチドを皮下注射した。1つの雄 C D 1 マウス群には、週 1 回、6 週にわたって P B S を皮下注射した。1つのマウス群には、週 1 回、6 週にわたって、1 0 0 m g / k g の対照オリゴヌクレオチド I S I S 1 4 1 9 2 3 (C C T T C C C T G A A G G T T C C T C C , 本明細書では配列番号 8 0 9 と呼ぶ、既知のマウス標的がない 5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマー) を皮下注射した。最後の投薬の 4 8 時間後にマウスを安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

30

【 1 3 9 6 】

血漿中化学マーカー

肝臓機能及び腎臓機能に対する I S I S オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置 (Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル) を使って、トランスアミナーゼ及び B U N の血漿中レベルを測定した。結果を以下の表に掲載する。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を、アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させた I S I S オリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

【 1 3 9 7 】

40

50

【表 1 5 3】

表 1 6 1 : 4 0 日目における CD 1 マウス血漿中の血漿中化学マーカー

	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	BUN(mg/dL)
PBS	25	46	20
ISIS 532614	513	407	22
ISIS 532692	131	130	24
ISIS 532770	36	53	25
ISIS 532775	193	158	23
ISIS 532800	127	110	25
ISIS 532809	36	42	22
ISIS 532810	229	286	26
ISIS 532811	197	183	21
ISIS 532917	207	204	27
ISIS 532952	246	207	25
ISIS 141923	39	67	23

10

【 1 3 9 8 】

重量

40日目にマウスの 殺に先だってマウスの体重を測定した。肝臓、腎臓、及び脾臓の臓器重量もマウスの 殺後に測定した。結果を以下の表に掲載する。アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで重量を変化させた ISIS オリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

20

【 1 3 9 9 】

【表 1 5 4】

表 1 6 2 : 4 0 日目における CD 1 マウスの重量 (g)

	体重	腎臓	肝臓	脾臓
PBS	44	0.8	2.0	0.1
ISIS 532614	43	0.7	4.3	0.2
ISIS 532692	42	0.7	2.6	0.2
ISIS 532770	42	0.6	2.3	0.2
ISIS 532775	42	0.7	2.5	0.2
ISIS 532800	43	0.6	2.8	0.3
ISIS 532809	42	0.6	2.2	0.1
ISIS 532810	43	0.6	2.3	0.2
ISIS 532811	41	0.7	2.4	0.2
ISIS 532917	42	0.7	3.0	0.2
ISIS 532952	44	0.8	2.5	0.3
ISIS 141923	41	0.6	2.0	0.1

30

40

【 1 4 0 0 】

試験 2 (5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーを使用)

6 ~ 8 週齢の雄 CD 1 マウスの群に、週 1 回、6 週にわたって 1 0 0 m g / k g の I S I S オリゴヌクレオチドを皮下注射した。2つの雄 CD 1 マウス群には、週 1 回、6 週にわたって、P B S を皮下注射した。1つのマウス群には、週 1 回、6 週にわたって、1 0 0 m g / k g の対照オリゴヌクレオチド I S I S 1 4 1 9 2 3 を皮下注射した。マウスを最

50

後の投薬の48時間後に安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

【1401】

血漿中化学マーカー

肝臓機能及び腎臓機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置(Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル)を使って、トランスアミナーゼ、アルブミン、及びBUNの血漿中レベルを測定した。結果を以下の表に掲載する。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を、アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

【1402】

【表155】

10

表163：45日目のCD1マウス血漿における血漿中化学マーカー

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	アルブミン (g/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	39	53	2.9	29
PBS	50	97	2.9	30
ISIS 141923	163	174	4.1	25
ISIS 532810	321	297	2.5	26
ISIS 532952	182	199	2.7	27
ISIS 588534	276	248	2.6	29
ISIS 588536	48	60	2.9	31
ISIS 588537	72	79	4.0	25
ISIS 588538	63	67	4.5	29
ISIS 588539	238	177	3.9	28
ISIS 588545	496	256	4.4	24
ISIS 588547	323	210	4.4	25
ISIS 588548	61	63	4.2	27
ISIS 588549	127	132	4.1	23
ISIS 588551	302	282	4.2	22
ISIS 588552	76	98	4.0	30
ISIS 588558	1066	521	3.9	27
ISIS 588559	76	94	4.1	26
ISIS 588561	502	500	4.4	26
ISIS 588563	50	99	4.4	28

20

30

【1403】

重量

42日目にマウスの体重を測定した。45日目にマウスを殺した後、肝臓、腎臓、及び脾臓の臓器重量も測定した。結果を以下の表に掲載する。アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで重量を変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

【1404】

40

50

【表 1 5 6】

表 1 6 4 : 4 0 日目における C D 1 マウスの重量 (g)

	体重	腎臓	肝臓	脾臓
PBS	44	0.7	2.4	0.1
PBS	43	0.7	2.4	0.2
ISIS 141923	43	0.6	2.4	0.2
ISIS 532810	41	0.6	1.9	0.1
ISIS 532952	43	0.6	2.4	0.2
ISIS 588534	44	0.7	2.8	0.2
ISIS 588536	43	0.7	2.7	0.2
ISIS 588537	43	0.7	2.4	0.2
ISIS 588538	44	0.7	2.8	0.2
ISIS 588539	44	0.6	2.7	0.2
ISIS 588545	44	0.8	3.3	0.3
ISIS 588547	42	0.6	3.3	0.3
ISIS 588548	43	0.6	2.8	0.2
ISIS 588549	42	0.6	2.8	0.3
ISIS 588551	39	0.6	2.2	0.2
ISIS 588552	41	0.6	2.2	0.2
ISIS 588558	44	0.7	3.3	0.3
ISIS 588559	43	0.6	2.7	0.3
ISIS 588561	40	0.7	2.4	0.3
ISIS 588563	41	0.7	2.4	0.2

【 1 4 0 5 】

試験 3 (5 - 1 0 - 5 M O E ギャップマーを使用)

6 ~ 8 週齢の雄 C D 1 マウスの群に、週 1 回、6 週にわたって、1 0 0 m g / k g の I S I S オリゴヌクレオチドを皮下注射した。2 つの雄 C D 1 マウス群には、週 1 回、6 週にわたって、P B S を皮下注射した。マウスを最後の投薬の 4 8 時間後に安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

【 1 4 0 6 】

血漿中化学マーカー

肝臓機能及び腎臓機能に対する I S I S オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置 (Hitachi Olympus AU 4 0 0 e , ニューヨーク州メルビル) を使って、トランスアミナーゼ、アルブミン、及び B U N の血漿中レベルを測定した。結果を以下の表に掲載する。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を、アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させた I S I S オリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

【 1 4 0 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 5 7】

表 1 6 5 : 4 2 日目の CD 1 マウス血漿における血漿中化学マーカー

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	アルブ ミン (g/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	37	108	3.1	30
PBS	45	51	3.0	27
ISIS 588544	209	168	2.9	26
ISIS 588546	526	279	3.0	22
ISIS 588550	82	136	2.7	25
ISIS 588553	79	105	3.0	24
ISIS 588554	112	220	3.2	19
ISIS 588555	95	162	2.8	25
ISIS 588556	345	236	3.0	26
ISIS 588557	393	420	2.8	24
ISIS 588560	109	148	2.7	27
ISIS 588562	279	284	2.8	22
ISIS 588564	152	188	3.0	23
ISIS 588565	247	271	2.8	28

10

20

【 1 4 0 8 】

重量

4 2 日目にマウスの体重を測定した。4 2 日目にマウスを 殺した後、肝臓、腎臓、及び
 脾臓の臓器重量も測定した。結果を以下の表に掲載する。アンチセンスオリゴヌクレオチ
 ドに予想される範囲外にまで重量を変化させた I S I S オリゴヌクレオチドを、その後の
 試験では除外した。

【 1 4 0 9 】

30

40

50

【表 1 5 8】

表 1 6 6 : 4 0 日目における C D 1 マウスの重量 (g)

	体重	腎臓	肝臓	脾臓
PBS	42	0.7	2.4	0.1
PBS	41	0.7	2.4	0.2
ISIS 588544	44	0.6	1.9	0.1
ISIS 588546	43	0.6	2.4	0.2
ISIS 588550	41	0.7	2.8	0.2
ISIS 588553	44	0.7	2.7	0.2
ISIS 588554	40	0.7	2.4	0.2
ISIS 588555	44	0.7	2.8	0.2
ISIS 588556	39	0.6	2.7	0.2
ISIS 588557	41	0.8	3.3	0.3
ISIS 588560	38	0.6	3.2	0.3
ISIS 588562	41	0.6	2.8	0.2
ISIS 588564	40	0.6	2.8	0.3
ISIS 588565	39	0.6	2.2	0.2

10

20

【 1 4 1 0 】

試験 4 ((S) c E t ギャップマーならびにデオキシ、M O E 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドを使用)

10 週齢の雄 C D 1 マウスの群に、50 mg / k g の、上述の試験で得た I S I S オリゴヌクレオチドを、週 1 回、6 週にわたって、皮下注射した。加えて、2 つのオリゴヌクレオチド I S I S 5 9 4 4 3 1 及び I S I S 5 9 4 4 3 2 を 3 - 1 0 - 3 (S) - c E t ギャップマーとして設計し、それらもこの試験で調べた。I S I S 5 9 4 4 3 1 (A C C T C C T T C C G A G T C A 、配列番号 5 5 0) は、デオキシ、M O E 及び (S) - c E t ギャップマーである I S I S 5 8 8 8 7 1 と同じ領域 (標的開始部位は配列番号 1 の 2 1 9 7 及び配列番号 2 の 6 9 8 5) を標的とする。I S I S 5 9 4 4 3 2 (T G G T C A C A T T C C C T T C 、配列番号 5 4 2) は、デオキシ、M O E 及び (S) - c E t ギャップマーである I S I S 5 8 8 8 7 2 と同じ領域 (標的開始部位は配列番号 1 の 1 5 4 及び配列番号 2 の 1 8 7 5) を標的とする。

30

【 1 4 1 1 】

2 つの雄 C D 1 マウス群には、週 1 回、6 週にわたって、P B S を皮下注射した。マウスを最後の投薬の 4 8 時間後に安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

【 1 4 1 2 】

血漿中化学マーカー

肝臓機能及び腎臓機能に対する I S I S オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置 (H i t a c h i O l y m p u s A U 4 0 0 e , ニューヨーク州メルビル) を使って、トランスアミナーゼ、アルブミン、クレアチニン、及び B U N の血漿中レベルを測定した。結果を以下の表に掲載する。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を、アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させた I S I S オリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

40

【 1 4 1 3 】

50

【表 1 5 9】

表 1 6 7 : 4 2 日目の CD 1 マウス血漿における血漿中化学マーカー

	化学的特徴	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	アルブ ミン (g/dL)	クレアチ ニン (mg/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	-	71	77	2.7	0.2	29
PBS	-	30	36	2.7	0.2	26
ISIS 588834	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	436	510	2.8	0.2	25
ISIS 588835	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	70	98	3.0	0.2	27
ISIS 588836	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	442	312	2.7	0.2	27
ISIS 588846	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	50	75	2.5	0.1	28
ISIS 588847	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	44	71	2.6	0.1	24
ISIS 588848	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	47	70	2.4	0.1	27
ISIS 588857	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	1287	655	2.7	0.2	26
ISIS 588858	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	1169	676	2.5	0.2	26
ISIS 588859	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	1036	1300	3.2	0.2	25
ISIS 588861	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	749	466	3.1	0.1	24
ISIS 588862	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	1564	1283	2.9	0.2	22
ISIS 588863	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	477	362	2.8	0.1	23
ISIS 588864	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	118	165	2.9	0.2	27
ISIS 588866	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	843	784	3.2	0.2	25
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	89	99	2.4	0.1	28
ISIS 594431	3-10-3 (S)-cEt	590	433	3.0	0.2	24
ISIS 594432	3-10-3 (S)-cEt	2595	2865	2.4	0.1	25

【 1 4 1 4 】

重量

3 9 日目にマウスの体重を測定した。4 2 日目にマウスを 殺した後、肝臓、腎臓、及び
膵臓の臓器重量も測定した。結果を以下の表に掲載する。アンチセンスオリゴヌクレオチ
ドに予想される範囲外にまで重量を変化させた I S I S オリゴヌクレオチドを、その後の
試験では除外した。

【 1 4 1 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 6 0】

表 1 6 8 : CD 1 マウスの重量 (g)

	化学的特徴	体重	腎臓	肝臓	脾臓
PBS	-	37	0.6	2.1	0.1
PBS	-	45	0.7	2.5	0.2
ISIS 588834	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	40	0.6	3.2	0.2
ISIS 588835	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	38	0.7	2.8	0.3
ISIS 588836	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	41	0.7	2.3	0.2
ISIS 588837	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	38	0.6	2.4	0.3
ISIS 588846	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	39	0.6	2.3	0.2
ISIS 588847	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	40	0.7	2.5	0.2
ISIS 588848	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	43	0.7	2.6	0.3
ISIS 588857	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	39	0.6	3.3	0.2
ISIS 588858	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	37	0.6	3.4	0.2
ISIS 588859	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	41	0.7	2.5	0.3
ISIS 588861	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	39	0.6	2.6	0.4
ISIS 588862	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	34	0.6	2.5	0.4
ISIS 588863	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	40	0.6	2.7	0.3
ISIS 588864	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	40	0.7	2.3	0.2
ISIS 588866	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	45	0.7	3.0	0.2
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	39	0.6	2.2	0.2
ISIS 594431	3-10-3 (S)-cEt	36	0.6	3.2	0.2
ISIS 594432	3-10-3 (S)-cEt	31	0.4	1.9	0.1

【 1 4 1 6 】

試験 5 (MOE ギャップマー、(S)-cEt ギャップマーならびにデオキシ、MOE 及び (S)-cEt オリゴヌクレオチドを使用)

8 ~ 9 週齢の雄 CD 1 マウスの群に、週 1 回、6 週にわたって、50 mg / kg の ISIS オリゴヌクレオチドを皮下注射した。2 つの雄 CD 1 マウス群には、週 1 回、6 週にわたって、PBS を皮下注射した。マウスを最後の投薬の 48 時間後に安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

【 1 4 1 7 】

血漿中化学マーカー

10

20

30

40

50

肝臓機能及び腎臓機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置（Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル）を使って、トランスアミナーゼ、アルブミン、クレアチニン、及びBUNの血漿中レベルを測定した。結果を以下の表に掲載する。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を、アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

【1418】

【表161】

表169：42日目のCD1マウス血漿における血漿中化学マーカー

	化学的特徴	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	アルブ ミン (g/dL)	クレアチ ニン (mg/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	-	33	84	2.9	0.2	28
PBS	-	32	65	2.5	0.1	27
ISIS 532692	5-10-5 MOE	363	281	3.0	0.2	30
ISIS 532770	5-10-5 MOE	69	100	2.9	0.1	28
ISIS 532775	5-10-5 MOE	371	333	2.6	0.1	29
ISIS 532800	5-10-5 MOE	104	106	2.7	0.1	31
ISIS 532809	5-10-5 MOE	69	127	2.8	0.1	26
ISIS 588540	5-10-5 MOE	66	110	2.8	0.1	26
ISIS 588838	3-10-3 (S)-cEt	391	330	2.9	0.1	25
ISIS 588842	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	224	264	2.6	0.1	26
ISIS 588843	3-10-3 (S)-cEt	185	160	2.8	0.1	24
ISIS 588844	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	304	204	2.7	0.1	25
ISIS 588851	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	186	123	2.7	0.1	31
ISIS 588854	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	1232	925	2.7	0.1	25
ISIS 588855	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	425	321	2.7	0.1	28
ISIS 588856	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	78	101	2.4	0.1	31
ISIS 588865	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	126	145	2.5	0.1	23
ISIS 588867	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	108	112	2.5	0.1	32
ISIS 588868	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	61	124	2.5	0.1	28
ISIS 588870	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	48	69	2.4	0.1	31
ISIS 588871	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	723	881	2.5	0.1	24
ISIS 588872	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	649	654	2.7	0.1	26

【1419】

重量

40日目にマウスの体重を測定した。42日目にマウスを殺した後、肝臓、腎臓、及び脾臓の臓器重量も測定した。結果を以下の表に掲載する。アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで重量を変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

【1420】

【表162】

表170：CD1マウスの重量（g）

	化学的特徴	体重	腎臓	肝臓	脾臓
PBS	-	46	0.7	2.3	0.2
PBS	-	44	0.7	2.3	0.2
ISIS 532692	5-10-5 MOE	44	0.6	2.8	0.2
ISIS 532770	5-10-5 MOE	43	0.6	2.2	0.2
ISIS 532775	5-10-5 MOE	43	0.6	2.8	0.2
ISIS 532800	5-10-5 MOE	47	0.7	2.9	0.2
ISIS 532809	5-10-5 MOE	44	0.7	2.6	0.2
ISIS 588540	5-10-5 MOE	44	0.7	2.5	0.2
ISIS 588838	3-10-3 (S)-cEt	45	0.7	3.1	0.2
ISIS 588842	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	41	0.6	2.6	0.2
ISIS 588843	3-10-3 (S)-cEt	43	0.7	2.9	0.2
ISIS 588844	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	43	0.7	2.8	0.2
ISIS 588851	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	46	0.6	2.6	0.2
ISIS 588854	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	45	0.7	4.1	0.2
ISIS 588855	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	44	0.7	2.9	0.3
ISIS 588856	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	44	0.7	3.2	0.2
ISIS 588865	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	45	0.7	2.6	0.3
ISIS 588867	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	46	0.7	3.2	0.3
ISIS 588868	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	42	0.7	2.9	0.3
ISIS 588870	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	43	0.6	2.2	0.2
ISIS 588871	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	41	0.7	3.1	0.2
ISIS 588872	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	39	0.6	3.2	0.3

【1421】

試験6（デオキシ、MOE及び(S)-cEtオリゴヌクレオチドを使用）

8～9週齢の雄CD1マウスの群に、週1回、6週にわたって、50mg/kgのデオキシ、MOE、及び(S)-cEtオリゴヌクレオチドを皮下注射した。2つの雄CD1マ

10

20

30

40

50

ウス群には、週1回、6週にわたって、PBSを皮下注射した。マウスを最後の投薬の48時間後に安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

【1422】

血漿中化学マーカー

肝臓機能及び腎臓機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置(Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル)を使って、トランスアミナーゼ、アルブミン、クレアチニン、ビリルビン、及びBUNの血漿中レベルを測定した。結果を以下の表に掲載する。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を、アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

10

【1423】

【表163】

表171: 45日目のCD1マウス血漿における血漿中化学マーカー

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	アルブ ミン (g/dL)	クレア チニン (mg/dL)	ビリルビン (mg/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	39	78	3.4	0.2	0.2	31
PBS	37	59	2.9	0.1	0.2	27
ISIS 599552	167	208	3.0	0.1	0.2	32
ISIS 599553	43	86	2.9	0.1	0.2	28
ISIS 599554	57	101	2.2	0.2	0.2	31
ISIS 599569	469	530	3.5	0.2	0.3	27
ISIS 599577	37	84	2.9	0.1	0.1	31
ISIS 599578	45	104	2.8	0.1	0.2	30
ISIS 599581	54	88	3.1	0.1	0.2	31
ISIS 599590	1741	1466	3.1	0.1	0.3	25
ISIS 599591	2230	1183	3.2	0.1	0.3	27
ISIS 601209	68	104	2.9	0.1	0.2	30
ISIS 601212	1795	968	3.2	0.1	0.3	22
ISIS 601215	424	385	3.1	0.1	0.4	25
ISIS 601216	90	125	2.9	0.1	0.2	29
ISIS 601276	946	366	2.9	0.1	0.5	31
ISIS 601282	831	540	3.3	0.2	0.2	32

20

30

【1424】

重量

40日目にマウスの体重を測定した。45日目にマウスを殺した後、肝臓、腎臓、及び膵臓の臓器重量も測定した。結果を以下の表に掲載する。アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで重量を変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

40

【1425】

50

【表 1 6 4】

表 1 7 2 : CD 1 マウスの重量 (g)

	体重	腎臓	肝臓	脾臓
PBS	40	0.7	2.1	0.2
PBS	42	0.8	2.3	0.2
ISIS 599552	38	0.6	2.3	0.2
ISIS 599553	39	0.7	2.2	0.2
ISIS 599554	39	0.7	2.4	0.2
ISIS 599569	39	0.7	2.2	0.2
ISIS 599577	41	0.7	2.5	0.2
ISIS 599578	37	0.6	2.0	0.2
ISIS 599581	40	0.6	2.5	0.2
ISIS 599590	34	0.6	3.5	0.2
ISIS 599591	38	0.8	2.7	0.2
ISIS 601209	42	0.7	2.6	0.3
ISIS 601212	38	0.6	2.9	0.2
ISIS 601215	36	0.7	2.6	0.2
ISIS 601216	42	0.6	2.7	0.2
ISIS 601276	42	0.7	3.2	0.2
ISIS 601282	38	0.7	3.2	0.2

10

20

【 1 4 2 6】

試験 7 (MOE ギャップマーならびにデオキシ、MOE 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドを使用)

8 ~ 9 週齢の雄 CD 1 マウスの群に、週 1 回、6 週にわたって、100 mg / kg の ISIS オリゴヌクレオチドを皮下注射した。1つの雄 CD 1 マウス群に、週 1 回、6 週にわたって、PBS を皮下注射した。マウスを最後の投薬の 48 時間後に安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

30

【 1 4 2 7】

血漿中化学マーカー

肝臓機能及び腎臓機能に対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置 (Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル) を使って、トランスアミナーゼ、アルブミン、クレアチニン、及び BUN の血漿中レベルを測定した。結果を以下の表に掲載する。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を、アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させた ISIS オリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

40

【 1 4 2 8】

50

【表 1 6 5】

表 1 7 3 : 4 5 日目の CD 1 マウス血漿における血漿中化学マーカー

	化学的特徴	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	アルブ ミン (g/dL)	クレア チニン (mg/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	-	120	102	2.7	0.2	26
ISIS 588842	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	177	164	2.7	0.1	23
ISIS 588843	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	98	194	2.7	0.1	24
ISIS 588851	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	91	142	2.6	0.1	23
ISIS 588856	デオキシ、MOE 及 び (S)-cEt	78	110	2.7	0.1	23
ISIS 599024	3-10-4 MOE	91	108	2.7	0.1	23
ISIS 599087	5-7-5 MOE	198	183	2.6	0.2	28
ISIS 599093	5-7-5 MOE	3285	2518	2.6	0.2	24
ISIS 599149	4-8-5 MOE	30	64	2.9	0.2	25
ISIS 599155	4-8-5 MOE	145	189	2.6	0.2	25
ISIS 599202	5-8-5 MOE	150	128	2.8	0.2	23
ISIS 599203	5-8-5 MOE	111	127	2.8	0.2	24
ISIS 599208	5-8-5 MOE	146	178	2.9	0.2	22
ISIS 599261	3-10-5 MOE	144	165	2.8	0.2	26
ISIS 599267	3-10-5 MOE	96	132	2.6	0.2	27
ISIS 599268	3-10-5 MOE	87	115	2.6	0.1	23
ISIS 599322	6-7-6 MOE	115	138	2.7	0.1	22
ISIS 599374	5-9-5 MOE	375	271	2.6	0.1	21
ISIS 599378	5-9-5 MOE	77	99	2.7	0.1	23
ISIS 599441	6-8-6 MOE	150	250	2.9	0.1	23

【 1 4 2 9 】

重量

4 4 日目にマウスの体重を測定した。4 9 日目にマウスを 殺した後、肝臓、腎臓、及び
脾臓の臓器重量も測定した。結果を以下の表に掲載する。アンチセンスオリゴヌクレオチ
ドに予想される範囲外にまで重量を変化させた I S I S オリゴヌクレオチドを、その後の
試験では除外した。

【 1 4 3 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 6 6】

表 1 7 4 : CD 1 マウスの重量 (g)

	化学的特徴	体重	腎臓	肝臓	脾臓
PBS	-	39	0.6	1.9	0.1
ISIS 588842	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	38	0.5	2.1	0.1
ISIS 588843	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	41	0.6	2.4	0.2
ISIS 588851	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	42	0.6	2.2	0.2
ISIS 588856	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	42	0.7	2.6	0.2
ISIS 599024	3-10-4 MOE	41	0.6	4.0	0.2
ISIS 599087	5-7-5 MOE	44	0.8	2.6	0.3
ISIS 599093	5-7-5 MOE	39	0.6	2.3	0.2
ISIS 599149	4-8-5 MOE	42	0.7	2.8	0.2
ISIS 599155	4-8-5 MOE	41	0.7	2.1	0.2
ISIS 599202	5-8-5 MOE	43	0.6	2.6	0.2
ISIS 599203	5-8-5 MOE	42	0.6	2.6	0.2
ISIS 599208	5-8-5 MOE	40	0.6	2.1	0.2
ISIS 599261	3-10-5 MOE	39	0.7	3.4	0.3
ISIS 599267	3-10-5 MOE	42	0.8	2.5	0.3
ISIS 599268	3-10-5 MOE	41	0.7	2.1	0.2
ISIS 599322	6-7-6 MOE	43	0.6	2.2	0.2
ISIS 599374	5-9-5 MOE	37	0.6	2.2	0.2
ISIS 599378	5-9-5 MOE	43	0.7	2.7	0.2
ISIS 599441	6-8-6 MOE	42	0.6	2.5	0.3

【 1 4 3 1】

試験 8 (MOE ギャップマー、デオキシ、MOE 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチド、ならびに (S) - c E t ギャップマーを使用)

8 ~ 9 週齢の雄 CD 1 マウスの群に、週 1 回、6 週にわたって、100 mg / kg の MOE ギャップマー、または 50 mg / kg のデオキシ、MOE 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドもしくは (S) - c E t ギャップマーを皮下注射した。1 つの雄 CD 1 マウス群には、週 1 回、6 週にわたって、PBS を皮下注射した。マウスを最後の投薬の 48 時間後に安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

【 1 4 3 2】

血漿中化学マーカー

肝臓機能及び腎臓機能に対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置 (Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル) を使って、トランスアミナーゼ、アルブミン、クレアチニン、及び BUN の血漿中レベルを測定した。結果を以下の表に掲載する。

【 1 4 3 3】

10

20

30

40

50

【表 1 6 7】

表 1 7 5 : 4 3 日目の CD 1 マウス血漿における血漿中化学マーカー

	化学的特徴	用量 (mg/kg/ 週)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	アル ブ ミ ン (g/dL)	クレア チニン (mg/dL)	BUN (mg/dL)
PBS	-	-	37	57	2.5	0.08	26
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	57	73	2.5	0.07	24
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	74	126	2.8	0.10	26
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	83	73	2.5	0.07	23
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	106	102	2.7	0.09	27
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	66	62	2.6	0.10	24
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	48	67	2.6	0.08	23
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	65	106	2.5	0.10	25
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	78	90	2.6	0.09	25
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	94	89	2.5	0.08	23
ISIS 588848	デオキシ、 MOE 及び (S)-cEt	50	38	54	2.3	0.07	25
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	63	72	2.5	0.10	27

【 1 4 3 4 】

重量

3 6 日目にマウスの体重を測定した。4 3 日目にマウスを 殺した後、肝臓、腎臓、及び
膵臓の臓器重量も測定した。臓器重量に関する結果を体重に対する比として表し、P B S
対照比に対して標準化した。

【 1 4 3 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 6 8】

表 1 7 6 : CD 1 マウスの臓器重量/体重 (BW)

	化学的特徴	用量 (mg/kg/週)	腎臓/BW	肝臓/BW	脾臓/BW
PBS	-	-	1.0	1.0	1.0
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	1.4	1.1	1.0
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	1.5	1.1	0.9
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	1.3	1.2	0.9
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	1.3	1.2	1.0
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	1.6	1.1	1.0
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	1.7	1.2	1.0
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	1.5	1.2	1.0
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	1.5	1.0	0.8
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	1.8	1.2	1.0
ISIS 588848	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	50	1.3	1.0	0.9
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	1.4	1.1	0.9

10

20

【 1 4 3 6】

サイトカインアッセイ

すべてのマウス群から得た血液を、IL - 6、MDC、MIP 1、IP - 10、MCP 1、MIP - 1、及び RANTES などといったさまざまなサイトカインの測定のために、Antech Diagnostics に送った。結果を表 5 4 に掲載する。

【 1 4 3 7】

30

40

50

【表 1 6 9】

表 1 7 7 : CD 1 マウス血漿中のサイトカインレベル (pg/mL)

	化学的特徴	IL-6	MDC	MIP1 β	IP-10	MCP1	MIP-1 α	RANTES
PBS	-	70	16	23	20	17	6	2
ISIS 532770	5-10-5 MOE	101	18	146	116	101	24	6
ISIS 532800	5-10-5 MOE	78	17	83	53	105	1	3
ISIS 532809	5-10-5 MOE	66	19	60	32	55	20	4
ISIS 588540	5-10-5 MOE	51	18	126	70	75	4	3
ISIS 588544	5-10-5 MOE	157	14	94	34	102	1	3
ISIS 588548	5-10-5 MOE	164	12	90	66	84	10	4
ISIS 588550	5-10-5 MOE	58	21	222	124	157	3	5
ISIS 588553	5-10-5 MOE	62	14	183	60	103	9	4
ISIS 588555	5-10-5 MOE	70	19	172	171	178	16	9
ISIS 588848	デオキシ、 MOE 及び (S)-cEt	59	13	61	27	63	12	4
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	48	14	56	38	85	10	3

【 1 4 3 8 】

血液学的アッセイ

すべてのマウス群から得た血液を、ヘマトクリット (HCT) の測定、ならびに WBC、RBC、及び血小板などのさまざまな血球及び総ヘモグロビン (Hb) 含有量の測定のために、Antech Diagnostics に送った。結果を表 5 5 に掲載する。

【 1 4 3 9 】

10

20

30

40

50

【表 170】

表 178 : CD1 マウス血漿中の血液学的マーカー

	化学的特徴	HCT (%)	Hb (g/dL)	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	血小板 ($10^3/\mu\text{L}$)
PBS	-	46	15	7	9	960
ISIS 532770	5-10-5 MOE	45	14	5	9	879
ISIS 532800	5-10-5 MOE	45	14	5	9	690
ISIS 532809	5-10-5 MOE	46	14	6	9	1005
ISIS 588540	5-10-5 MOE	49	15	6	10	790
ISIS 588544	5-10-5 MOE	36	11	7	7	899
ISIS 588548	5-10-5 MOE	46	14	6	9	883
ISIS 588550	5-10-5 MOE	42	13	8	8	721
ISIS 588553	5-10-5 MOE	45	14	6	9	719
ISIS 588555	5-10-5 MOE	43	13	8	9	838
ISIS 588848	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	40	15	8	10	840
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	45	14	8	9	993

10

20

【1440】

実施例 127 : ヒトCFBを標的とするアンチオリゴヌクレオチドのスプレグ・ドーリーラットにおける耐容性

スプレグ・ドーリーラットは、安全性や効力の評価に使用される多目的モデルである。これらのラットを、上記実施例で述べた試験によって得たISISアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、さまざまな血漿中化学マーカーのレベルの変化を評価した。

【1441】

試験 1 (5 - 10 - 5 MOEギャップマーを使用)

7 ~ 8 週齢の雄スプレグ・ドーリーラットを12時間明/暗周期で飼育し、Purina通常ラット用飼料ダイエツト5001を不断給餌した。スプレグ・ドーリーラット各4匹の群に、週1回、6週にわたって、100mg/kgの5 - 10 - 5 MOEギャップマーを皮下注射した。ラット6匹の対照群1つには、週1回、6週にわたって、PBSを皮下注射した。最後の投薬の48時間後に、ラットを安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

30

【1442】

肝臓機能

肝臓機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置(Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル)を使って、トランスアミナーゼの血漿中レベルを測定した。ALT(アラニントランスアミナーゼ)とAST(アスパラギン酸トランスアミナーゼ)の血漿中レベルを測定し、結果をIU/Lの単位で表して、以下の表に掲載する。肝臓機能のいずれかのマーカーのレベルをアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

40

【1443】

50

【表 171】

表 179 : スプレーグ・ドローラットにおける肝臓機能マーカー

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)
PBS	66	134
ISIS 588544	101	329
ISIS 588550	69	157
ISIS 588553	88	304
ISIS 588554	202	243
ISIS 588555	94	113
ISIS 588556	102	117
ISIS 588560	206	317
ISIS 588564	292	594

10

【1444】

腎臓機能

腎臓機能に対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置 (Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル) を使って、血中尿素窒素 (BUN) 及びクレアチニンの血漿中レベルを測定した。結果を mg/dL の単位で表して、以下の表に掲載する。腎臓機能マーカーのいずれかのレベルをアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させた ISIS オリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

20

【1445】

【表 172】

表 180 : スプレーグ・ドローラットにおける腎臓機能マーカー (mg/dL)

	BUN	クレアチニン
PBS	18	3.5
ISIS 588544	21	3.1
ISIS 588550	21	3.0
ISIS 588553	22	2.8
ISIS 588554	23	3.0
ISIS 588555	22	3.5
ISIS 588556	21	3.2
ISIS 588560	26	2.4
ISIS 588564	24	2.7

30

【1446】

重量

体重測定は 39 日目に行った。42 日目の試験終了時に肝臓、心臓、脾臓及び腎臓の重量を測定した。それらを以下の表に掲載する。臓器重量をアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させた ISIS オリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

40

【1447】

50

【表 173】

表 181 : 重量 (g)

	体重	肝臓	脾臓	腎臓
PBS	422	16	1.2	3.9
ISIS 588544	353	15	1.7	2.9
ISIS 588550	321	14	2.1	3.2
ISIS 588553	313	15	2.3	3.2
ISIS 588554	265	11	1.6	2.7
ISIS 588555	345	14	1.4	3.3
ISIS 588556	328	13	1.7	3.1
ISIS 588560	270	13	2.4	3.0
ISIS 588564	253	12	2.9	3.0

10

【1448】

試験 2 (デオキシ、MOE 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドを使用)

9 ~ 10 週齢の雄スプレーグ・ドーリーラットを 12 時間明 / 暗周期で飼育し、P u r i n a 通常ラット飼料ダイエツト 5 0 0 1 を不断給餌した。スプレーグ・ドーリーラット各 4 匹の群に、週 1 回、6 週にわたって、1 0 0 m g / k g のデオキシ、MOE、及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドを皮下注射した。ラット各 3 匹の対照群 2 つには、週 1 回、6 週にわたって、P B S を皮下注射した。最後の投薬の 4 8 時間後に、ラットを安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

20

【1449】

肝臓機能

肝臓機能に対する I S I S オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置 (H i t a c h i O l y m p u s A U 4 0 0 e , ニューヨーク州メルビル) を使って、4 2 日目に、トランスアミナーゼの血漿中レベルを測定した。A L T (アラニントランスアミナーゼ) と A S T (アスパラギン酸トランスアミナーゼ) 及びアルブミンの血漿中レベルを測定し、それらの結果を以下の表に掲載する。肝臓機能のいずれかのマーカーのレベルをアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させた I S I S オリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

30

【1450】

40

50

【表 174】

表 182：スプレーグ・ドーリーラットにおける肝臓機能マーカー

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	アルブ ミン (g/dL)
PBS	55	150	3.4
PBS	64	91	3.5
ISIS 588554	52	92	3.2
ISIS 588835	971	844	4.1
ISIS 588842	317	359	3.8
ISIS 588843	327	753	2.9
ISIS 588846	70	111	3.2
ISIS 588847	65	100	3.0
ISIS 588864	91	109	3.0
ISIS 594430	85	106	3.7

10

【1451】

腎臓機能

腎臓機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置（Hitachi Olympus AU400e，ニューヨーク州メルビル）を使って、血中尿素窒素（BUN）及びクレアチニンの血漿中レベルを測定した。結果をmg/dLの単位で表して、以下の表に掲載する。腎臓機能マーカーのいずれかのレベルをアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

20

【1452】

【表 175】

表 183：スプレーグ・ドーリーラットにおける腎臓機能マーカー（mg/dL）

	BUN	クレアチニン
PBS	17	0.4
PBS	21	0.4
ISIS 588554	20	0.4
ISIS 588835	23	0.5
ISIS 588842	22	0.4
ISIS 588843	51	0.4
ISIS 588846	25	0.5
ISIS 588847	23	0.5
ISIS 588864	23	0.4
ISIS 594430	22	0.5

30

40

【1453】

重量

体重測定は39日目に行った。42日目の試験終了時に肝臓、心臓、脾臓及び腎臓の重量を測定した。それらを以下の表に掲載する。臓器重量をアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

50

【 1 4 5 4 】

【 表 1 7 6 】

表 1 8 4 : 重量 (g)

	体重	肝臓	脾臓	腎臓
PBS	466	16	0.9	3.8
PBS	485	16	0.9	3.6
ISIS 588554	393	15	2.3	2.6
ISIS 588835	387	16	1.0	3.3
ISIS 588842	414	22	1.5	3.7
ISIS 588843	427	20	2.5	4.2
ISIS 588846	366	16	2.1	3.3
ISIS 588847	402	15	1.6	3.1
ISIS 588864	364	15	2.1	3.8
ISIS 594430	420	16	1.2	3.6

10

【 1 4 5 5 】

試験 3 (M O E ギャップマーを使用)

9 ~ 10 週齢の雄スプレーグ・ドーリーラットを 12 時間明 / 暗周期で飼育し、P u r i n a 通常ラット飼料ダイエツト 5 0 0 1 を不断給餌した。スプレーグ・ドーリーラット各 4 匹の群に、週 1 回、6 週にわたって、1 0 0 m g / k g の M O E ギャップマーを皮下注射した。ラット 6 匹の対照群 1 つには、週 1 回、6 週にわたって、P B S を皮下注射した。最後の投薬の 4 8 時間後に、ラットを安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

20

【 1 4 5 6 】

肝臓機能

肝臓機能に対する I S I S オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置 (H i t a c h i O l y m p u s A U 4 0 0 e , ニューヨーク州メルビル) を使って、4 3 日目に、トランスアミナーゼの血漿中レベルを測定した。A L T (アラニントランスアミナーゼ) と A S T (アスパラギン酸トランスアミナーゼ) の血漿中レベルを測定し、結果を I U / L の単位で表して、以下の表に掲載する。肝臓機能のいずれかのマーカーのレベルをアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させた I S I S オリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

30

【 1 4 5 7 】

40

50

【表 177】

表 185 : スプレグ・ドーリーラットにおける肝臓機能マーカー

	化学的特徴	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	アルブミン (g/dL)
PBS	-	52	110	3.7
ISIS 588563	5-10-5 MOE	175	291	2.9
ISIS 599024	3-10-4 MOE	139	173	1.4
ISIS 599093	5-7-5 MOE	116	238	2.6
ISIS 599149	4-8-5 MOE	232	190	3.4
ISIS 599155	4-8-5 MOE	108	215	2.5
ISIS 599202	5-8-5 MOE	65	86	3.5
ISIS 599203	5-8-5 MOE	71	97	3.1
ISIS 599208	5-8-5 MOE	257	467	1.9
ISIS 599261	3-10-5 MOE	387	475	1.5
ISIS 599267	3-10-5 MOE	201	337	2.7

10

【1458】

腎臓機能

腎臓機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置(Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル)を使って、血中尿素窒素(BUN)及びクレアチニンの血漿中レベルを測定した。結果をmg/dLの単位で表して、以下の表に掲載する。腎臓機能マーカーのいずれかのレベルをアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

【1459】

【表 178】

表 186 : スプレグ・ドーリーラットにおける腎臓機能マーカー (mg/dL)

	化学的特徴	BUN	クレアチニン
PBS	-	16	0.3
ISIS 588563	5-10-5 MOE	26	0.4
ISIS 599024	3-10-4 MOE	135	1.2
ISIS 599093	5-7-5 MOE	29	0.4
ISIS 599149	4-8-5 MOE	23	0.4
ISIS 599155	4-8-5 MOE	29	0.4
ISIS 599202	5-8-5 MOE	19	0.4
ISIS 599203	5-8-5 MOE	22	0.4
ISIS 599208	5-8-5 MOE	26	0.3
ISIS 599261	3-10-5 MOE	228	1.6
ISIS 599267	3-10-5 MOE	24	0.4

30

40

【1460】

重量

体重測定は39日目に行った。42日目の試験終了時に肝臓、心臓、脾臓及び腎臓の重量を測定した。それらを以下の表に掲載する。臓器重量をアンチセンスオリゴヌクレオチド

50

に予想される範囲外にまで変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

【1461】

【表179】

表187：重量（g）

	化学的特徴	体重	肝臓	脾臓	腎臓
PBS	-	471	16	1.0	4.1
ISIS 588563	5-10-5 MOE	311	16	3.4	4.1
ISIS 599024	3-10-4 MOE	297	11	1.0	3.5
ISIS 599093	5-7-5 MOE	332	18	4.1	5.0
ISIS 599149	4-8-5 MOE	388	16	2.3	3.7
ISIS 599155	4-8-5 MOE	290	15	2.9	4.5
ISIS 599202	5-8-5 MOE	359	13	1.3	3.2
ISIS 599203	5-8-5 MOE	334	14	1.8	3.3
ISIS 599208	5-8-5 MOE	353	29	4.7	4.6
ISIS 599261	3-10-5 MOE	277	10	0.9	3.2
ISIS 599267	3-10-5 MOE	344	21	3.9	4.7

10

20

【1462】

試験4（MOEギャップマーを使用）

9～10週齢の雄スプレーグ・ドーリーラットを12時間明/暗周期で飼育し、Purina通常ラット飼料ダイエツト5001を不断給餌した。スプレーグ・ドーリーラット各4匹の群に、週1回、6週にわたって、100mg/kgのMOEギャップマーを皮下注射した。ラット6匹の対照群1つには、週1回、6週にわたって、PBSを皮下注射した。最後の投薬の48時間後に、ラットを安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

【1463】

肝臓機能

肝臓機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置（Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル）を使って、42日目に、トランスアミナーゼの血漿中レベルを測定した。ALT（アラントランスアミナーゼ）とAST（アスパラギン酸トランスアミナーゼ）の血漿中レベルを測定し、結果をIU/Lの単位で表して、以下の表に掲載する。肝臓機能のいずれかのマーカーのレベルをアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

【1464】

30

40

50

【表 180】

表 188 : スプレーグ・ドーリーラットにおける肝臓機能マーカー

	化学的特徴	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	アルブミン (g/dL)
PBS	-	48	77	3.9
ISIS 532800	5-10-5 MOE	72	111	3.4
ISIS 532809	5-10-5 MOE	59	89	3.8
ISIS 588540	5-10-5 MOE	146	259	3.8
ISIS 599268	3-10-5 MOE	175	206	2.7
ISIS 599322	6-7-6 MOE	523	567	3.3
ISIS 599374	5-9-5 MOE	114	176	3.0
ISIS 599378	5-9-5 MOE	124	116	3.2
ISIS 599380	5-9-5 MOE	148	210	3.4
ISIS 599441	6-8-6 MOE	51	91	2.6

10

【1465】

腎臓機能

腎臓機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置(Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル)を使って、血中尿素窒素(BUN)及びクレアチニンの血漿中レベルを測定した。結果をmg/dLの単位で表して、以下の表に掲載する。腎臓機能マーカーのいずれかのレベルをアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

20

【1466】

【表 181】

表 189 : スプレーグ・ドーリーラットにおける腎臓機能マーカー (mg/dL)

	化学的特徴	BUN	クレアチニン
PBS	-	15	0.4
ISIS 532800	5-10-5 MOE	26	0.5
ISIS 532809	5-10-5 MOE	18	0.5
ISIS 588540	5-10-5 MOE	22	0.5
ISIS 599268	3-10-5 MOE	28	0.5
ISIS 599322	6-7-6 MOE	24	0.5
ISIS 599374	5-9-5 MOE	29	0.5
ISIS 599378	5-9-5 MOE	22	0.4
ISIS 599380	5-9-5 MOE	26	0.5
ISIS 599441	6-8-6 MOE	24	0.4

30

40

【1467】

重量

体重測定は39日目に行った。42日目の試験終了時に肝臓、心臓、脾臓及び腎臓の重量を測定した。それらを以下の表に掲載する。臓器重量をアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

【1468】

50

【表 182】

表 190 : 重量 (g)

	化学的特徴	体重	肝臓	脾臓	腎臓
PBS	-	502	16	0.9	3.7
ISIS 532800	5-10-5 MOE	376	16	2.0	3.4
ISIS 532809	5-10-5 MOE	430	16	1.4	3.4
ISIS 588540	5-10-5 MOE	391	16	1.8	3.5
ISIS 599268	3-10-5 MOE	332	16	3.6	3.6
ISIS 599322	6-7-6 MOE	348	13	2.1	3.4
ISIS 599374	5-9-5 MOE	302	12	2.0	3.3
ISIS 599378	5-9-5 MOE	332	11	1.1	2.8
ISIS 599380	5-9-5 MOE	350	11	1.5	3.3
ISIS 599441	6-8-6 MOE	368	16	2.5	3.3

10

【1469】

試験 5 (MOE ギャップマーならびにデオキシ、MOE 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドを使用)

9 ~ 10 週齢の雄スプレーグ・ドーリーラットを 12 時間明 / 暗周期で飼育し、P u r i n a 通常ラット飼料ダイエツト 5 0 0 1 を不断給餌した。スプレーグ・ドーリーラット各 4 匹の群に、週 1 回、6 週にわたって、1 0 0 m g / k g の MOE ギャップマーまたは 5 0 m g / k g のデオキシ、MOE 及び (S) - c E t オリゴヌクレオチドを皮下注射した。ラット 4 匹の対照群 1 つには、週 1 回、6 週にわたって、P B S を皮下注射した。最後の投薬の 4 8 時間後に、ラットを安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

20

【1470】

肝臓機能

肝臓機能に対する I S I S オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置 (H i t a c h i O l y m p u s A U 4 0 0 e , ニューヨーク州メルビル) を使って、4 2 日目に、トランスアミナーゼの血漿中レベルを測定した。A L T (アラニントランスアミナーゼ) と A S T (アスパラギン酸トランスアミナーゼ) の血漿中レベルを測定し、結果を I U / L の単位で表して、以下の表に掲載する。肝臓機能のいずれかのマーカーのレベルをアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させた I S I S オリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

30

【1471】

40

50

【表 1 8 3】

表 1 9 1 : スプレーグ・ドーリーラットにおける肝臓機能マーカー

	化学的特徴	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	アルブ ミン (g/dL)
PBS	-	49	74	3.3
ISIS 532770	5-10-5 MOE	95	132	3.3
ISIS 588851	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	47	72	3.1
ISIS 588856	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	56	75	3.0
ISIS 588865	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	62	84	2.9
ISIS 588867	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	73	214	2.9
ISIS 588868	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	59	83	3.1
ISIS 588870	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	144	144	3.4

10

【 1 4 7 2】

腎臓機能

腎臓機能に対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置 (Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル) を使って、血中尿素窒素 (BUN) 及びクレアチニンの血漿中レベル及び尿中レベルを測定した。結果を mg/dL の単位で表して以下の表に掲載する。腎臓機能マーカーのいずれかのレベルをアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させた ISIS オリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

20

【 1 4 7 3】

【表 1 8 4】

表 1 9 2 : スプレーグ・ドーリーラットの血漿における腎臓機能マーカー (mg/dL)

	化学的特徴	BUN	クレアチニン
PBS	-	18	0.3
ISIS 532770	5-10-5 MOE	20	0.4
ISIS 588851	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	20	0.4
ISIS 588856	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	22	0.4
ISIS 588865	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	24	0.5
ISIS 588867	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	22	0.4
ISIS 588868	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	19	0.4
ISIS 588870	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	20	0.5

30

【 1 4 7 4】

40

50

【表 185】

表 193 : スプレーグ・ドーリーラットの尿における腎臓機能マーカー (mg/dL)

	化学的特徴	総タンパク質	クレアチニン
PBS	-	80	92
ISIS 532770	5-10-5 MOE	466	69
ISIS 588851	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	273	64
ISIS 588856	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	259	68
ISIS 588865	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	277	67
ISIS 588867	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	337	68
ISIS 588868	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	326	75
ISIS 588870	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	388	82

10

【1475】

重量

体重測定は39日目に行った。42日目の試験終了時に肝臓、心臓、脾臓及び腎臓の重量を測定した。それらを以下の表に掲載する。臓器重量をアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

20

【1476】

【表 186】

表 194 : 重量 (g)

	化学的特徴	体重	肝臓	脾臓	腎臓
PBS	-	489	16	0.9	3.5
ISIS 532770	5-10-5 MOE	372	15	1.7	3.1
ISIS 588851	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	285	14	1.4	3.2
ISIS 588856	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	415	15	1.1	3.3
ISIS 588865	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	362	14	2.0	3.3
ISIS 588867	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	406	15	2.4	3.4
ISIS 588868	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	399	15	1.5	3.4
ISIS 588870	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	446	14	1.4	3.3

30

【1477】

試験6 (MOEギャップマー、デオキシ、MOE及び(S)-cEtオリゴヌクレオチド、ならびに(S)-cEtギャップマーを使用)

雄ラットを12時間明/暗周期で飼育し、Purina通常ラット飼料ダイエツト5001を不断給餌した。ラット各4匹の群に、週1回、6週にわたって、100mg/kgのMOEギャップマーまたは50mg/kgのデオキシ、MOE及び(S)-cEtオリゴヌクレオチドもしくは(S)-cEtギャップマーを皮下注射した。ラット4匹の対照群1つには、週1回、6週にわたって、PBSを皮下注射した。最後の投薬の48時間後に、ラットを安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

40

【1478】

肝臓機能

肝臓機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置(Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル)を使って、42日目に、トランスアミナーゼの血漿中レベルを測定した。ALT(アラニントランスアミナーゼ)とAST(アスパラギン酸トランスアミナーゼ)の血漿中レベルを測定

50

し、結果をIU/Lの単位で表して、以下の表に掲載する。

【1479】

【表187】

表195：肝臓機能マーカー

	化学的特徴	用量 (mg/kg/週)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	アルブミン(g/dL)
PBS	-	-	54	73	4.3
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	57	114	4.4
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	176	180	4.3
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	71	132	4.1
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	89	202	4.4
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	75	152	3.9
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	50	71	4.1
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	80	133	3.6
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	59	112	3.9
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	97	142	3.8
ISIS 588848	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	50	53	82	3.9
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	198	172	4.4

【1480】

腎臓機能

腎臓機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析装置(Hitachi Olympus AU400e, ニューヨーク州メルビル)を使って、総タンパク質及びクレアチニンの尿中レベルを測定した。結果を以下の表に掲載する。腎臓機能マーカーのいずれかのレベルをアンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲外にまで変化させたISISオリゴヌクレオチドを、その後の試験では除外した。

【1481】

10

20

30

40

50

【表 188】

表 196 : ラットの尿における総タンパク質/クレアチニン比

	化学的特徴	用量 (mg/kg/週)	P/C比
PBS	-	-	1.1
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	8.3
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	6.5
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	6.1
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	10.1
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	7.9
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	6.6
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	7.6
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	7.0
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	6.2
ISIS 588848	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	50	5.2
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	5.3

10

【1482】

重量

体重測定は39日目に行った。42日目の試験終了時に肝臓、心臓、脾臓及び腎臓の重量を測定した。それらを以下の表に掲載する。臓器重量に関する結果を体重に対する比として表し、PBS対照比に対して標準化した。

【1483】

【表 189】

表 197 : 臓器重量/体重 (BW) 比

	化学的特徴	用量 (mg/kg/週)	脾臓 /BW	肝臓/BW	腎臓 /BW
PBS	-	-	1.0	1.0	1.0
ISIS 532770	5-10-5 MOE	100	2.0	1.2	1.0
ISIS 532800	5-10-5 MOE	100	2.8	1.3	1.0
ISIS 532809	5-10-5 MOE	100	2.2	1.1	1.0
ISIS 588540	5-10-5 MOE	100	2.2	1.4	1.0
ISIS 588544	5-10-5 MOE	100	2.5	1.3	1.1
ISIS 588548	5-10-5 MOE	100	2.1	1.3	1.1
ISIS 588550	5-10-5 MOE	100	3.9	1.4	1.1
ISIS 588553	5-10-5 MOE	100	4.1	1.4	1.4
ISIS 588555	5-10-5 MOE	100	1.8	1.3	1.0
ISIS 588848	デオキシ、MOE 及び (S)-cEt	50	3.1	1.3	1.1
ISIS 594430	3-10-3 (S)-cEt	50	1.7	1.0	1.1

30

40

【1484】

実施例 128 : hCFBマウス中のCFB mRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効力

50

選ばれた化合物を、ヒトCFBトランスジェニックマウス樹立系統#6における効力について試験した。ヒトCFB遺伝子は第6染色体の位置31913721-31919861に位置する。ヒトCFB遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製するために、CFB配列を含有するフォスミド(ABC14-50933200C23)を選択した。Cla I(31926612)及びAge I(31926815)制限酵素を使って、CFB遺伝子を含有する前核注入用の22,127bpフラグメントを生成させた。Pvu Iを使った制限酵素解析によってDNAを確認した。前記22,127bpのDNAフラグメントをC57BL/6NTac胚に注入した。6つの陽性ファウンダーを育てた。肝臓ヒトCFB mRNAを発現するファウンダー#6を第3世代まで交雑した。第3世代マウスからの子孫を使って、ヒトCFB ASOをヒトCFB mRNAの低減について評価した。

10

【1485】

処置

マウス各3匹の群に、第1週は週に2回、50mg/kgのISISオリゴヌクレオチドを皮下注射し、次に、さらに3週にわたって、週に1回、50mg/kgのISISオリゴヌクレオチドを投与した。マウス4匹の対照群1つに、第1週は週に2回、その後さらに3週にわたって週に1回、PBSを皮下注射した。最後の投薬の48時間後にマウスを安楽死させ、さらなる分析のために臓器及び血漿を収集した。

【1486】

RNA分析

投薬期間の終了時に、CFB mRNAレベルのリアルタイムPCR分析用に、肝臓と腎臓からRNAを抽出した。ヒトCFB mRNAレベルはヒトプライマープローブセットRTS3459を使って測定した。CFB mRNAレベルをRIBOGREEN(登録商標)及びハウスキーピング遺伝子シクロフィリンに対して標準化した。結果は対照と比較したCFB mRNA発現の阻害パーセントとして算出した。すべてのアンチセンスオリゴヌクレオチドが肝臓においてヒトCFB mRNAレベルの阻害を達成した。

20

【1487】

【表190】

表198: hCFBマウスにおけるCFB mRNAレベルの低減パーセント

30

ISIS番号	RIBOGREENに対して標準化	シクロフィリンに対して標準化
532770	86	87
532800	88	87
532809	69	69
588540	95	94
588544	91	91
588548	78	77
588550	89	88
588553	94	94
588555	94	94
588848	83	82
594430	78	76

40

【1488】

実施例129: マウスCFBのインビボアンチセンス阻害

マウスCFB mRNA(GENBANKアクセッション番号NM_008198.2, 本明細書には配列番号5として組み込まれる)を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオ

50

チドをいくつか設計した。各オリゴヌクレオチドの標的開始部位と配列を以下の表に記載する。以下の表のキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは5'-10'-5' MOEギャップマーとして設計された。これらのギャップマーは20ヌクレオシド長であり、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で構成され、両側(5'側及び3'側)にそれぞれ5ヌクレオシドを含むウイングが隣接している。5'ウイングセグメント中の各ヌクレオシド及び3'ウイングセグメント中の各ヌクレオシドは2'-MOE修飾を有する。ヌクレオシド間連結部は、各ギャップマーの全体を通して、ホスホロチオエート(P=S)連結部である。シトシン残基は、各ギャップマーの全体を通してすべて、5'-メチルシトシンである。

【1489】

【表191】

表199：マウスCFBを標的とするギャップマー

ISIS番号	配列	配列番号5上の 標的開始部位	配列 番号
516269	GCATAAGAGGGTACCAGCTG	2593	804
516272	GTCCTTTAGCCAGGGCAGCA	2642	805
516323	TCCACCCATGTTGTGCAAGC	1568	806
516330	CCACACCATGCCACAGAGAC	1826	807
516341	TTCCGAGTCAGGCTCTTCCC	2308	808

【1490】

処置

C57BL/6マウス各4匹の群に、3週にわたる週1回の投与で、50mg/kgのISIS516269、ISIS516272、ISIS516323、ISIS516330、またはISIS516341を注射した。対照マウス群には、3週にわたる週1回の投与で、リン酸緩衝食塩水(PBS)を注射した。

【1491】

CFB RNA分析

試験の最後に、プライマープロベセットRTS3430(フォワード配列GGGCAACACAGCAATTTGTGA,本明細書では配列番号816と呼ぶ;リバーズ配列TGGCTACCCACCTTCTTGT,本明細書では配列番号817と呼ぶ;プローブ配列CTGGATACTGTCCCAATCCCGGTATTCCX,本明細書では配列番号818と呼ぶ)を用いるCFBのリアルタイムPCR分析用に、肝臓組織からRNAを抽出した。RIBOGREEN(登録商標)を使ってmRNAレベルを標準化した。以下の表に示すとおり、一部のアンチセンスオリゴヌクレオチドはPBS対照と比較してマウスCFBの低減を達成した。結果を、対照と比較したCFBの阻害パーセントとして表す。

【1492】

【表192】

表200：C57BL/6マウスにおけるマウスCFB mRNAの阻害パーセント

ISIS番号	%
516269	29
516272	72
516323	77
516330	62
516341	72

10

20

30

40

50

【 1 4 9 3 】

タンパク質分析

ヤギ抗CFB抗体 (Sigma Aldrich) を用いるウェスタンブロットによって、腎臓、肝臓、血漿、及び眼におけるCFBタンパク質レベルを測定した。結果を、PBS対照と比較したCFBの阻害パーセントとして表す。「n/a」は、当該試料では測定が行われなかったことを示す。以下の表に示すとおり、ISISオリゴヌクレオチドによるCFBのアンチセンス阻害は、さまざまな組織においてCFBタンパク質の低減をもたらした。以下の表に示すとおり、ISISオリゴヌクレオチドの全身性投与は、眼におけるCFBレベルを低減するのに有効であった。

【 1 4 9 4 】

【表 1 9 3】

表 2 0 1 : C 5 7 B L / 6 マウスにおけるマウスCFBタンパク質の阻害パーセント

ISIS番号	腎臓	肝臓	血漿	眼
516269	20	58	n/a	70
516272	48	74	n/a	99
516323	73	85	90	93
516330	77	80	n/a	n/a
516341	80	88	68	n/a

【 1 4 9 5 】

実施例 1 3 0 : マウスCFBの用量依存的アンチセンス阻害

C 5 7 B L / 6 マウス各 4 匹の群に、6 週にわたる週 1 回の投与で、2 5 m g / k g、5 0 m g / k g、または 1 0 0 m g / k g の I S I S 5 1 6 2 7 2、及び I S I S 5 1 6 3 2 3 を注射した。別の 2 つのマウス群に、6 週にわたる週 1 回の投与で、1 0 0 m g / k g の I S I S 5 1 6 3 3 0 または I S I S 5 1 6 3 4 1 を注射した。2 つの対照マウス群には、6 週にわたる週 1 回の投与で、リン酸緩衝食塩水 (P B S) を注射した。

【 1 4 9 6 】

CFB RNA分析

プライマープロブセット R T S 3 4 3 0 を用いるCFBのリアルタイムPCR分析のために、肝臓組織と腎臓組織からRNAを抽出した。R I B O G R E E N (登録商標) を使ってmRNAレベルを標準化した。以下の表に示すとおり、アンチセンスオリゴヌクレオチドはPBS対照との比較でマウスCFBの用量依存的低減を達成した。結果を、対照と比較したCFBの阻害パーセントとして表す。

【 1 4 9 7 】

10

20

30

40

50

【表 194】

表 202 : C57BL/6 マウスにおけるマウスCFB mRNAの阻害パーセント

ISIS番号	用量 (mg/kg/週)	肝臓	腎臓
516272	25	39	32
	50	73	36
	100	87	42
516323	25	36	41
	50	65	47
	100	79	71
516330	100	85	45
516341	200	89	65

10

【1498】

タンパク質分析

ヤギ抗CFB抗体 (Sigma Aldrich) を用いるウェスタンブロットにより、血漿中のCFBタンパク質レベルを測定した。以下の表に示すように、ISISオリゴヌクレオチドによるCFBのアンチセンス阻害は、CFBタンパク質の低減をもたらした。結果を、PBS対照と比較したCFBの阻害パーセントとして表す。「n/a」は、当該試料で測定が行われなかったことを示す。

20

【1499】

眼におけるCFBタンパク質レベルもウェスタンブロットで測定した。すべての処置群が、95%のCFB阻害を示し、一部の試料測定値はアッセイの検出レベル未満であった。

【1500】

【表 195】

表 203 : C57BL/6 マウスにおけるマウスCFBタンパク質の阻害パーセント

ISIS番号	用量(mg/kg/週)	肝臓
516272	25	32
	50	70
	100	83
516323	25	43
	50	80
	100	90
516330	100	n/a
516341	200	n/a

30

【1501】

実施例 131 : NZB/W F1 マウスモデルにおけるCFBのアンチセンス阻害の効果
NZB/W F1 は狼瘡の最も古い古典的モデルであり、これらのマウスは、狼瘡患者の表現型に匹敵する重度の狼瘡様表現型を発症する (Theofilopoulos, A. N. and Dixon, F. J. *Advances in Immunology*, vol. 37, pp. 269 - 390, 1985)。これらの狼瘡様表現型には、リンパ節腫脹、脾腫、抗dsDNA IgG (その大半はIgG2a及びIgG3である) を含む血清中抗核自己抗体 (ANA) の上昇、及び5~6月齢で明白になり10~12月齢で腎不全及び死亡につながる免疫複合体媒介性糸球体腎炎 (GN) が含まれる。

40

【1502】

50

試験 1

C F Bを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置が、前記マウスモデルにおける腎臓病理を改善することを実証するための試験を行った。17週齢の雌NZB/W F1マウスをJackson Laboratoriesから購入した。マウス各16匹の群に用量100µg/kg/週のISIS 516272またはISIS 516323を20週にわたって与えた。マウス16匹のもう一つの群には、用量100µg/kg/週の対照オリゴヌクレオチドISIS 141923を20週にわたって与えた。マウス10匹のもう一つの群にはPBSを20週にわたって投与し、それを対照群として、他のすべての群をこの対照群と比較した。最後の注射を行った48時間後に、最終エンドポイントを収集した。

10

【1503】

C F B RNA分析

プライマープローブセットRTS 3430を用いるC F BのリアルタイムPCR分析用に、肝臓組織と腎臓組織からRNAを抽出した。RIBOGREEN（登録商標）を使ってmRNAレベルを標準化した。以下の表に示すとおり、一部のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、PBS対照に対してマウスC F Bの低減を達成した。結果を、対照と比較したC F Bの阻害パーセントとして表す。

【1504】

【表196】

20

表204：NZB/W F1マウスにおけるマウスC F B mRNAの阻害パーセント

ISIS番号	肝臓	腎臓
516272	55	25
516323	63	43
141923	0	0

【1505】

タンパク尿

このマウスモデルでは60%の動物にタンパク尿が予想される。臨床分析装置を使って総タンパク質対クレアチニン比を算出することにより、重症タンパク尿の累積発生率を測定した。結果を以下の表に掲載する。これらの結果は、C F Bを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置が、PBS対照マウス及び対照オリゴヌクレオチド処置マウスと比較して、マウスにおけるタンパク尿の低減を達成したことを実証している。

30

【1506】

【表197】

表205：NZB/W F1マウスにおける重症タンパク尿の累積発生率（パーセント）

	%
PBS	40
ISIS 516272	6
ISIS 516323	0
ISIS 141923	25

40

【1507】

生存率

マウスの数を処置開始時に記録し、20週目に再び記録することにより、マウスの生存率を監視した。結果を以下の表に掲載する。これらの結果は、C F Bを標的とするアンチオリゴヌクレオチドによる処置が、マウスの生存率を、PBS対照マウス及び対照オリゴヌ

50

クレオチド処置マウスと比較して増加させたことを実証している。

【1508】

【表198】

表206：生き残ったマウスの数及び生存率（％）

	1週目	20週目	20週目での生存率（％）
PBS	10	6	60
ISIS 516272	16	15	94
ISIS 516323	16	16	100
ISIS 141923	16	12	75

10

【1509】

糸球体沈着

腎臓の糸球体におけるC3沈着及びIgG沈着の量を、抗C3抗体を用いる免疫組織化学によって測定した。結果を以下の表に掲載する。これらの結果は、CFBを標的とするアンチオリゴヌクレオチドによる処置が、PBS対照マウス及び対照オリゴヌクレオチド処置マウスと比較して、腎臓糸球体におけるC3沈着の低減とIgG沈着の低減をどちらも達成したことを実証している。

【1510】

20

【表199】

表207：NZB/W F1マウスにおける糸球体沈着の阻害パーセント

ISIS番号	C3	IgG
516272	45	20
516323	48	2
141923	0	0

【1511】

試験2

30

16週齢の雌NZB/W F1マウスをJackson Laboratoriesから購入した。マウス10匹の群に、用量100µg/kg/週のISIS516323を12週にわたって与えた。マウス10匹のもう一つの群には、用量100µg/kg/週の対照オリゴヌクレオチドISIS141923を12週にわたって与えた。マウス10匹のもう一つの群には、PBSを12週にわたって投与し、それを対照群として、他のすべての群をこの対照群と比較した。最後の注射を行った48時間後に、最終エンドポイントを収集した。

【1512】

CFB RNA分析

プライマープローブセットRTS3430を用いるCFBのリアルタイムPCR分析用に、肝臓組織と腎臓組織からRNAを抽出した。以下の表に示すように、ISIS516323による処置はPBS対照に対してマウスCFBの低減を達成した。結果を、対照と比較したCFBの阻害パーセントとして表す。

40

【1513】

50

【表 200】

表 208 : NZB/W F1 マウスにおけるマウス CFB mRNA の阻害パーセント

ISIS番号	肝臓	腎臓
516323	75	46
141923	0	6

【1514】

タンパク尿

尿中総タンパク質対クレアチニン比を測定すると共に、総マイクロアルブミンレベルを測定することにより、重症タンパク尿の累積発生率を評価した。結果を以下の表に掲載する。これらの結果は、CFBを標的とするアンチオリゴヌクレオチドによる処置が、PBS対照マウス及び対照オリゴヌクレオチド処置マウスと比較して、マウスにおけるタンパク尿を低減したことを実証している。

10

【1515】

【表 201】

表 209 : 尿中マイクロアルブミンレベル (mg/dl) として測定した NZB/W F1 マウスにおけるタンパク尿

ISIS番号	0週目	6週目	8週目	10週目
516323	0	0	5.4	0.4
141923	0	8.28	8.6	5.6

20

【1516】

【表 202】

表 210 : 総タンパク質対クレアチニン比として測定した NZB/W F1 マウスにおけるタンパク尿

ISIS番号	0週目	6週目	8週目	10週目
516323	5.5	7.8	8.6	7.2
141923	6.9	10.0	13.5	7.2

30

【1517】

生存率

マウスの数を処置開始時に記録し、12週目に再び記録することにより、マウスの生存率を監視した。結果を以下の表に掲載する。これらの結果は、CFBを標的とするアンチオリゴヌクレオチドによる処置が、マウスにおける生存率を、PBS対照マウス及び対照オリゴヌクレオチド処置マウスと比較して増加させたことを実証している。

【1518】

【表 203】

表 211 : 生き残ったマウスの数

	1週目	12週目
PBS	10	9
ISIS 516323	10	10
ISIS 141923	10	9

40

【1519】

実施例 132 : MRL マウスモデルにおける CFB のアンチセンス阻害の効果

MRL / lpr ループス腎炎マウスモデルは、二重陰性 (CD4⁻CD8⁻) 及び B22

50

0 + T細胞の蓄積に起因するリンパ節腫脹を特徴とするSLE様表現型を発症する。これらのマウスは死亡率の増進を呈する。加えて、これらのマウスは循環免疫グロブリン濃度が高く、それらには、ANA、抗ssDNA、抗dsDNA、抗Sm、及びリウマトイド因子などといった自己抗体レベルの上昇も含まれていて、多量の免疫複合体をもたらす(Andrews, B. et al., J. Exp. Med. 148: 1198-1215, 1978)。

【1520】

処置

CFBを標的とするアンチオリゴヌクレオチドによる処置が前記マウスモデルにおける腎病理を逆転させるかどうかを調べるための試験を行った。14週齢の雌MRL/lprマウスをJackson Laboratoriesから購入した。マウス10匹の1群に用量50µg/kg/週のISIS516323を7週にわたって与えた。マウス10匹のもう一つの群には用量50µg/kg/週の対照オリゴヌクレオチドISIS141923を7週にわたって与えた。マウス10匹のもう一つの群にはPBSを7週にわたって投与し、それを対照群として、他のすべての群をこの対照群と比較した。最後の注射を行った48時間後に、最終エンドポイントを収集した。

10

【1521】

CFB RNA分析

プライマープローブセットRTS3430を用いるCFBのリアルタイムPCR用に、肝臓組織からRNAを抽出した。以下の表に示すとおり、ISIS516323は、PBS対照と比較してCFBを低減した。結果を、対照と比較したCFBの阻害パーセントとして表す。

20

【1522】

【表204】

表212: MRL/lprマウスにおけるマウスCFB mRNAの阻害パーセント

ISIS番号	%
516323	68
141923	4

30

【1523】

腎病理

腎病理を2つの方法で評価した。腎臓の組織切片をヘマトキシリンとエオシンで染色した。PBS対照は、糸球体硬化症の一症状である多数の糸球体半月体及び管状円柱(multiglomerular crescents tubular casts)の存在を示す。これに対し、ISIS516323で処置したマウスからの切片には、半月体及び管状円柱(crescents tubular casts)が存在せず、ボウマン嚢のごくわずかな線維性変化、中等度~重度の分節性メサンギウム細胞増殖及び糸球体基底膜肥厚を示した。

40

【1524】

抗C3抗体を用いる免疫組織化学によって腎臓におけるC3の蓄積も評価した。1腎臓あたり10個の糸球体をキャプチャし陽性C3染色の強度を算出することによって計算される強度スコア化システムにより、全腎臓C3免疫組織化学強度スコアを算出した。結果を以下の表に掲載する。これらの結果は、ISIS516323による処置が腎C3蓄積を対照群と比較して低減したことを実証している。

【1525】

50

【表 205】

表 213 : MRL/lpr マウスにおける腎 C3 蓄積

	全腎臓C3強度スコア	平均PBSに対する C3定量(面積/総面積)%
PBS	2.5	100
ISIS 516323	1.6	68
ISIS 141923	2.2	99

10

【1526】

血漿中 C3 レベル

CFBの低減は代替補体経路の活性化を阻害する。これは、C3消費を防止し、血漿中C3レベルの見掛け上の上昇につながる。終末採血により、臨床分析装置で血漿中C3レベルを測定した。結果を以下の表に掲載する。これらの結果は、ISIS 516323による処置が血漿中のC3レベルを対照群と比較して増加させたこと ($p < 0.001$) を実証している。

【1527】

【表 206】

20

表 214 : MRL/lpr マウスにおける血漿中 C3 レベル (mg/dL)

ISIS番号	C3
516323	28
141923	16

これらの結果は、CFBを標的とするアンチオリゴヌクレオチドによる処置が狼瘡マウスモデルにおける腎病理を逆転させることを示している。

【1528】

実施例 133 : CFH Het マウスモデルにおける CFB のアンチセンス阻害の効果

CFHヘテロ接合 (CFH Het, CFH⁺/-) マウスモデルは、突然変異型H因子タンパク質を完全長マウスタンパク質と共に発現する (Pickering, M. C. et al., J. Exp. Med. 2007. 204: 1249-56)。これらのマウスでは、6月齢までは腎組織構造が正常な状態を保っている。

30

【1529】

試験 1

6週齢のCFH⁺/-マウス各8匹の群に用量75mg/kg/週のISIS 516323またはISIS 516341を6週にわたって与えた。マウス8匹のもう一つの群には用量75mg/kg/週の対照オリゴヌクレオチドISIS 141923を6週にわたって与えた。マウス8匹のもう一つの群にはPBSを6週にわたって投与し、それを対照群として、他のすべての群をこの対照群と比較した。最後の注射を行った48時間後に、最終エンドポイントを収集した。

40

【1530】

CFB RNA分析

プライマープローブセットRTS 3430を用いるCFBのリアルタイムPCR分析用に、肝臓組織と腎臓組織からRNAを抽出した。以下の表に示すとおり、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、PBS対照と比較して、CFBを低減した。結果を、対照と比較したCFBの阻害パーセントとして表す。

【1531】

50

【表 2 0 7】

表 2 1 5 : CFH^{+/−}マウスにおけるマウスCFB mRNAの阻害パーセント

ISIS番号	肝臓	腎臓
516323	80	38
516341	90	44
141923	0	17

【 1 5 3 2】

10

血漿中C3レベル

CFBの低減は代替補体経路の活性化を阻害する。これは、C3消費を防止し、血漿中C3レベルの見掛けの上昇につながる。終末採血により、臨床分析装置で、血漿中C3レベルを測定した。結果を以下の表に掲載する。これらの結果は、ISIS516323による処置が血漿中のC3レベルを正常レベルまで増加させたことを実証している。

【 1 5 3 3】

【表 2 0 8】

表 2 1 6 : CFH^{+/−}マウスにおける血漿中C3レベル (mg/dL)

ISIS番号	C3
516323	15
516341	17
141923	8

20

【 1 5 3 4】

試験 2

CFH^{+/−}マウス各5匹の群に、用量12.5mg/kg/週、25mg/kg/週、50mg/kg/週、75mg/kg/週、または100mg/kg/週のISIS516323またはISIS516341を、6週にわたって与えた。マウス5匹のもう一つの群には用量75µg/kg/週の対照オリゴヌクレオチドISIS141923を6週にわたって与えた。マウス5匹のもう一つの群には、PBSを6週にわたって投与し、それを対照群として、他のすべての群をこの対照群と比較した。最後の注射を行った48時間後に、最終エンドポイントを収集した。

30

【 1 5 3 5】

CFB RNA分析

プライマープローブセットRTS3430を用いるCFBのリアルタイムPCR分析用に、肝臓組織と腎臓組織からRNAを抽出した。以下の表に示すとおり、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、CFBをPBS対照と比較して用量依存的に低減した。結果を、対照と比較したCFBの阻害パーセントとして表す。

40

【 1 5 3 6】

50

【表 209】

表 217 : CFH^{+/+}マウスの肝臓におけるマウスCFB mRNAの阻害パーセント

ISIS番号	用量 (mg/kg/週)	%
516323	12.5	34
	25	51
	50	72
	75	79
	100	92
516341	12.5	38
	25	57
	50	89
	75	92
	100	90
141923	75	13

10

【1537】

血漿中C3レベル

CFBの低減は代替補体経路の活性化を阻害する。これは、C3消費を防止し、血漿中C3レベルの見掛け上の上昇につながる。終末血漿収集により、臨床分析装置で血漿中C3レベルを測定した。結果を以下の表に掲載する。これらの結果は、CFBを標的とするISISオリゴヌクレオチドによる処置が、血漿中のC3レベルを増加させることを実証している。

【1538】

【表 210】

表 218 : CFH^{+/+}マウスにおける血漿中C3レベル (mg/dL)

	用量 (mg/kg/週)	C3
PBS	-	10.1
516323	12.5	11.4
	25	15.5
	50	17.0
	75	18.3
	100	18.8
516341	12.5	12.1
	25	16.3
	50	18.6
	75	22.1
	100	19.1
141923	75	8.9

30

40

【1539】

実施例 134 : ヒトCFBを標的とするISISオリゴヌクレオチドの、カニクイザルにおける効果

50

カニクイザルを、上記実施例で述べた試験から選択したISISアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置した。アンチセンスオリゴヌクレオチドの効力と耐容性、ならびに肝臓及び腎臓におけるそれらの薬物動態プロファイルを評価した。

【1540】

この試験を企画した時点で、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）データベースにカニクイザルゲノム配列がなかったため、カニクイザル遺伝子配列との交差反応性を確認することはできなかった。その代わりに、カニクイザルに使用するISISアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列を、ホモロジーについて、アカゲザル配列と比較した。アカゲザル配列に対してホモロジーを有するISISオリゴヌクレオチドはカニクイザル配列とも十分に交差反応性であると予想される。試験したヒト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（GENBANKアクセッション番号NW_001116486.1、ヌクレオチド536000から545000までを切り出したもの、本明細書では配列番号3と呼ぶ）と交差反応性である。ヒトオリゴヌクレオチドとアカゲザル配列の間の相補性が大きいほど、そのヒトオリゴヌクレオチドがアカゲザル配列と交差反応できる可能性は高くなる。以下の表には、配列番号3を標的とする各オリゴヌクレオチドの開始部位と終止部位を掲載する。「開始部位」とは、アカゲザル遺伝子配列中で当該ギャップマーの標的になる最も5'側のヌクレオチドを示す。「ミスマッチ」は、アカゲザルゲノム配列とミスマッチしているヒトオリゴヌクレオチド中の核酸塩基の数を示す。

10

【1541】

【表211】

20

表219：アカゲザルCFBゲノム配列（配列番号3）に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド

ISIS番号	標的開始部位	ミスマッチ	化学的特徴	配列番号
532770	6788	0	5-10-5 MOE	198
532800	7500	0	5-10-5 MOE	228
532809	7614	0	5-10-5 MOE	237
588540	7627	1	5-10-5 MOE	440
588544	7631	1	5-10-5 MOE	444
588548	7635	1	5-10-5 MOE	448
588550	7637	1	5-10-5 MOE	450
588553	7640	1	5-10-5 MOE	453
588555	7643	0	5-10-5 MOE	455
588848	7639	1	デオキシ、MOE 及び cEt	598
594430	6790	0	3-10-3 cEt	549

30

【1542】

処置

40

試験に先だって、サルを少なくとも30日間にわたって隔離し続け、その期間中は全身の健康状態について動物を毎日観察した。サルは2~4歳で、体重は2~4kgであった。ランダムに割り当てた雄カニクイザル各4~6匹の11群に対し、背中の中の四ヶ所に時計回りに（すなわち左、上、右、及び下）、ISISオリゴヌクレオチドまたはPBSを、各回1部位ずつ、皮下注射した。最初の1週間はサルに初回負荷量のPBSまたは40mg/kgのISIS532800、ISIS532809、ISIS588540、ISIS588544、ISIS588548、ISIS588550、ISIS588553、ISIS588555、ISIS588848、またはISIS594430を4回（1日目、3日目、5日目、及び7日目）与え、次にPBSまたは40mg/kgのISISオリゴヌクレオチドを、週1回、12週にわたって投与した（14日目、21日目、2

50

8日目、35日目、42日目、49日目、56日目、63日目、70日目、77日目、及び84日目)。ISIS532770は、2匹の雄カニクイザル及び2匹の雌カニクイザルを含む群による別個の試験において、類似する条件で調べた。

【1543】

肝標的の低減

RNA分析

86日目に、肝臓試料及び腎臓試料を、二つ一組（それぞれ約250mg）にして、CFB mRNA分析用に採取した。殺から約10分以内の剖検時に試料を液体窒素中で急速冷凍した。

【1544】

CFBのmRNA発現量を測定するためのリアルタイムPCR分析用に、RNAを肝臓及び腎臓から抽出した。結果を、RIBOGREEN（登録商標）で標準化し、PBS対照と比較した、mRNAの変化率（パーセント）として掲載する。また、ハウスキーピング遺伝子であるシクロフィリンAでも、RNAレベルを標準化した。RNAレベルは、上述のプライマープローブセットRTS3459、またはRTS4445_MGB（フォワード配列CGAAGAAGCTCAGTGAAATCAA、本明細書では配列番号819と呼ぶ；リバース配列TGCCCTGGAGGGCCCTCTT、本明細書では配列番号820と呼ぶ；プローブ配列AGACCACAAGTTGAAGTC、本明細書では配列番号815と呼ぶ）を使って測定した。

【1545】

以下の表に示すとおり、ISISアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置は、PBS対照との比較で、CFB mRNAの低減をもたらした。CFB mRNAレベルの分析により、前記ISISオリゴヌクレオチドのいくつかは、肝臓及び/または腎臓におけるCFBレベルを低減することが明らかになった。ここで「0」は、発現レベルが阻害されなかったことを示す。「*」は、当該オリゴヌクレオチドを類似する条件の別個の試験で調べたことを示す。

【1546】

【表212】

表220：PBS対照と比較したカニクイザル肝臓におけるCFB mRNAの阻害パーセント

ISIS番号	RTS3459/ シクロフィリンA	RTS3459/ RIBOGREEN	RTS445_MGB/ シクロフィリンA	RTS445_MGB/ RIBOGREEN
532770*	12	37	24	45
532800	54	45	56	46
588540	31	27	28	24
588548	68	67	68	67
588550	53	39	51	37
588553	74	59	74	59
588555	73	71	71	69
588848	9	0	6	0
594430	24	26	23	25

【1547】

10

20

30

40

50

【表 2 1 3】

表 2 2 1 : P B S 対照と比較したカニクイザル腎臓における C F B mRNA の阻害パーセント

ISIS番号	RTS3459/ シクロフィリンA	RTS3459/ RIBOGREEN	RTS445_MGB/ シクロフィリンA	RTS445_MGB/ RIBOGREEN
532770*	34	56	2	31
532800	36	30	43	37
588540	70	71	67	69
588548	83	84	82	83
588550	81	77	78	74
588553	86	84	86	85
588555	32	34	48	50
588848	89	91	87	90
594430	33	37	19	23

10

【 1 5 4 8 】

タンパク質分析

8 5 日目に利用可能なすべての動物から約 1 m L の血液を採取して、E D T A のカリウム塩が入っているチューブに入れた。その血液試料を氷または K r y o r a c k に直ちに入れ、遠心分離 (3 0 0 0 r p m 、 4 で 1 0 分間) することにより、採取から 6 0 分以内に血漿 (約 0 . 4 m L) を得た。ポリクローナル抗 B 因子抗体を用いる放射状免疫拡散法 (R I D) により、C F B の血漿中レベルを血漿で測定した。結果を以下の表に掲載する。I S I S 5 3 2 7 7 0 は別個の試験で調べ、その群では血漿中タンパク質レベルを 9 1 日目または 9 2 日目に測定した。

20

【 1 5 4 9 】

血漿中 C F B の分析により、I S I S オリゴヌクレオチドはタンパク質レベルを持続的に低減することが明らかになった。別個の試験で調べた I S I S 5 3 2 7 7 0 は、9 1 / 9 2 日目に、ベースライン値と比較して、C F B タンパク質レベルを 5 0 % 低減した。血漿中 C F B タンパク質レベルの低減は、対応する動物群における肝臓 C F B mRNA レベルの低減とよく相関している。

30

【 1 5 5 0 】

40

50

【表 2 1 4】

表 2 2 2 : カニクイザルにおける血漿中タンパク質レベル (%ベースライン値)

	1日目	30日目	58日目	72日目	86日目
PBS	113	115	95	83	86
ISIS 532800	117	68	52	39	34
ISIS 532809	104	121	100	80	71
ISIS 588540	108	72	61	40	38
ISIS 588544	118	74	53	33	29
ISIS 588548	110	41	28	20	16
ISIS 588550	104	64	54	38	37
ISIS 588553	97	42	35	18	16
ISIS 588555	107	35	37	18	18
ISIS 588848	116	95	92	69	71
ISIS 594430	104	64	59	45	46

10

【 1 5 5 1】

耐容性試験

20

体重測定

動物の総合的健康に対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、体重及び臓器重量を測定した。それを以下の表に掲載する。「*」は、当該オリゴヌクレオチドが別個の試験において類似の条件で調べられたこと、そして雄サルと雌サルから得られた測定値の平均であることを示す。これらの結果は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置が体重及び臓器重量に及ぼす効果は、アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲内であったことを示している。

【 1 5 5 2】

【表 2 1 5】

30

表 2 2 3 : カニクイザルの最終体重 (g)

	1日目	14日目	28日目	42日目	56日目	70日目	84日目
PBS	2887	2953	3028	3094	3125	3143	3193
ISIS 532770*	2963	2947	2966	3050	3097	3138	3160
ISIS 532800	2886	2976	3072	3149	3220	3269	3265
ISIS 532809	2755	2836	2927	2983	3019	3071	3098
ISIS 588540	2779	2834	2907	2934	2981	3034	3057
ISIS 588544	2837	2896	3009	3064	3132	3163	3199
ISIS 588548	2694	2816	2882	2990	3073	3149	3161
ISIS 588550	2855	2988	3062	3188	3219	3282	3323
ISIS 588553	3033	3156	3256	3335	3379	3372	3442
ISIS 588555	2757	2863	2965	3022	3075	3088	3158
ISIS 588848	2850	3018	3032	3187	3230	3212	3291
ISIS 594430	2884	2963	2953	3149	3187	3204	3256

40

【 1 5 5 3】

50

【表 2 1 6】

表 2 2 4 : カニクイザルの最終臓器重量 (g)

	脾臓	心臓	腎臓	肝臓
PBS	2.8	11.6	11.9	55.8
ISIS 532770*	5.0	11.3	20.6	77.9
ISIS 532800	6.2	11.9	18.6	94.4
ISIS 588540	4.0	11.4	13.5	67.1
ISIS 588548	4.1	11.7	17.3	72.0
ISIS 588550	5.8	10.9	18.5	81.8
ISIS 588553	5.0	12.7	17.2	85.9
ISIS 588555	4.7	11.8	15.9	88.3
ISIS 588848	5.0	12.7	14.4	75.7
ISIS 594430	3.9	11.9	14.8	69.9

10

【 1 5 5 4】

肝臓機能

肝臓機能に対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、すべての試験群から血液試料を集めた。血液試料は、橈側皮静脈、伏在静脈、または大腿静脈から、投薬の 48 時間後に集めた。採血に先だつてサルを終夜絶食させた。血清を分離するために、抗凝固剤が入っていないチューブに血液 (1.5 mL) を集めた。そのチューブを最低 90 分間室温に保ってから、遠心分離 (約 3,000 rpm で 10 分間) することにより、血清を得た。東芝 200FR NEO 化学分析装置 (東芝、日本) を使って、さまざまな肝臓機能マーカーのレベルを測定した。

20

【 1 5 5 5】

ALT と AST の血漿中レベルを測定した。その結果を IU/L の単位で以下の表に掲載する。肝臓機能マーカーの一つであるビリルビンも同様に測定し、mg/dL の単位で以下の表に掲載する。「*」は、当該オリゴヌクレオチドが別個の試験において類似の条件で調べられたこと、そして雄サルと雌サルから得られた測定値の平均であることを示す。これらの結果は、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの大半が、アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲から外れる影響を、肝臓機能に及ぼさなかったことを示している。

30

【 1 5 5 6】

40

50

【表 2 1 7】

表 2 2 5 : 8 6 日目のカニクイザル血漿における肝臓化学マーカーレベル

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ビリルビン (mg/dL)
PBS	71	57	0.3
ISIS 532770*	59	58	0.1
ISIS 532800	65	86	0.1
ISIS 532809	35	58	0.1
ISIS 588540	70	88	0.2
ISIS 588544	55	97	0.2
ISIS 588548	61	85	0.2
ISIS 588550	94	84	0.2
ISIS 588553	44	65	0.2
ISIS 588555	63	84	0.2
ISIS 588848	69	65	0.2
ISIS 594430	86	53	0.2

10

【 1 5 5 7 】

腎臓機能

腎臓機能に対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、すべての試験群から血液試料を集めた。血液試料は、橈側皮静脈、伏在静脈、または大腿静脈から、投薬の 48 時間後に集めた。採血に先だってサルを終夜絶食させた。血清を分離するために、抗凝固剤が入っていないチューブに血液を集めた。そのチューブを最低 90 分間室温に保ってから、遠心分離（約 3,000 rpm で 10 分間）することにより、血清を得た。東芝 200FR NEO 化学分析装置（東芝、日本）を使って、BUN 及びクレアチニンのレベルを測定した。結果を mg/dL の単位で表して、以下の表に掲載する。「*」は、当該オリゴヌクレオチドが別個の試験において類似の条件で調べられたこと、そして雄サルと雌サルから得られた測定値の平均であることを示す。

20

30

【 1 5 5 8 】

尿検査のために、氷上の清浄なケージパンを使って、朝、すべての動物から新鮮尿を集めた。採尿の前日は終夜、飼料を除去したが、水は供給した。東芝 200FR NEO 化学分析装置（東芝、日本）を使って、尿試料（約 1 mL）をタンパク質対/クレアチニン（P/C）比について分析した。「n.d.」は、尿タンパク質レベルが分析装置の検出限界未満であったことを示している。

【 1 5 5 9 】

血漿及び尿の化学的データは、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの大半が、アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲から外れる影響を、腎臓機能に及ぼさなかったことを示している。

40

【 1 5 6 0 】

50

【表 2 1 8】

表 2 2 6 : 8 6 日目のカニクイザル血漿における腎化学マーカーレベル (mg/dL)

	BUN	クレアチニン	総タンパク質
PBS	28	0.9	8.0
ISIS 532770*	20	0.9	6.9
ISIS 532800	25	0.9	7.5
ISIS 532809	23	0.8	7.4
ISIS 588540	30	0.8	7.5
ISIS 588544	26	0.9	7.4
ISIS 588548	25	0.9	7.6
ISIS 588550	24	0.9	7.2
ISIS 588553	25	0.8	7.2
ISIS 588555	25	0.8	7.6
ISIS 588848	24	0.9	7.5
ISIS 594430	25	0.8	7.2

10

【 1 5 6 1】

【表 2 1 9】

表 2 2 7 : 4 4 日目及び8 6 日目のカニクイザル尿における腎化学マーカーレベル

	44日目	86日目
PBS	0.03	n.d.
ISIS 532800	0.01	n.d.
ISIS 532809	0.01	n.d.
ISIS 588540	0.03	n.d.
ISIS 588544	0.01	0.09
ISIS 588548	0.01	0.01
ISIS 588550	0.04	0.01
ISIS 588553	0.05	n.d.
ISIS 588555	0.03	0.03
ISIS 588848	0.09	n.d.
ISIS 594430	0.03	n.d.

20

30

【 1 5 6 2】

血液学

カニクイザル中の ISIS オリゴヌクレオチドが血液学的パラメータに及ぼす影響を評価するために、利用可能な試験動物のそれぞれから、血液約 0.5 mL の血液試料を、K₂-EDTA が入っているチューブに集めた。ADVIA 120 血液分析装置 (Bayer、米国) を使って、試料を、赤血球 (RBC) 数、白血球 (WBC) 数、個別白血球数、例えば単球、好中球、リンパ球の数、ならびに血小板数、ヘモグロビン含量及びヘマトクリットについて分析した。データを以下の表に掲載する。「*」は、当該オリゴヌクレオチドが別個の試験において類似の条件で調べられたこと、そして雄サルと雌サルから得られた測定値の平均であることを示す。

40

【 1 5 6 3】

50

このデータは、前記オリゴヌクレオチドが、この用量では、アンチセンスオリゴヌクレオチドに予想される範囲から外れる変化を血液学的パラメータに引き起こさなかったことを示している。

【 1 5 6 4 】

【表 2 2 0】

表 2 2 8 : カニクイザルにおける血球数

	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	血小板 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	好中球 (% WBC)	リンパ球 (%総数)	単球 (%総数)
PBS	5.8	347	9.4	42.7	53.1	3.0
ISIS 532770*	5.4	386	10.8	22.3	71.7	3.3
ISIS 532800	5.6	360	13.1	29.5	61.1	6.5
ISIS 532809	5.2	400	11.5	56.6	38.2	2.5
ISIS 588540	5.5	367	11.7	50.9	42.7	2.1
ISIS 588544	5.2	373	14.3	56.6	37.6	4.3
ISIS 588548	5.1	373	9.7	40.4	54.3	3.9
ISIS 588550	6.1	343	9.9	32.1	61.7	4.6
ISIS 588553	5.2	424	9.3	41.7	53.2	3.6
ISIS 588555	5.1	411	9.6	45.1	49.7	3.5
ISIS 588848	5.7	370	10.0	39.8	55.8	3.1
ISIS 594430	5.7	477	10.6	47.3	47.8	3.6

10

20

【 1 5 6 5 】

【表 2 2 1】

表 2 2 9 : カニクイザルにおける血液学的パラメータ

	ヘモグロビン (g/dL)	HCT (%)
PBS	14.1	46.6
ISIS 532770*	12.4	40.9
ISIS 532800	12.3	40.5
ISIS 532809	12.2	40.4
ISIS 588540	12.5	41.5
ISIS 588544	11.9	38.1
ISIS 588548	12.3	39.6
ISIS 588550	13.4	45.0
ISIS 588553	12.6	39.8
ISIS 588555	11.6	38.1
ISIS 588848	13.2	42.7
ISIS 594430	13.4	43.1

30

40

【 1 5 6 6 】

オリゴヌクレオチド濃度の測定

腎臓組織及び肝臓組織における完全長オリゴヌクレオチドの濃度を測定した。使用した方法は、以前に公表された方法 (Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999) の変法であり、フェノール-クロロホルム (液-液) 抽出と、それに

50

続く固相抽出からなる。組織試料中濃度は、定量下限 (L L O Q) が約 $1.14 \mu\text{g/g}$ である検量線を使って算出した。結果を、 $\mu\text{g/g}$ - 肝臓または腎臓組織の単位で、以下の表に掲載する。

【 1 5 6 7 】

【表 2 2 2】

表 2 3 0 : アンチセンスオリゴヌクレオチドの分布

	腎 臓 ($\mu\text{g/g}$)	肝 臓 ($\mu\text{g/g}$)	腎臓/肝臓 比
ISIS 532800	3881	1633	2.4
ISIS 588540	3074	1410	2.2
ISIS 588548	3703	1233	3.0
ISIS 588550	4242	860	4.9
ISIS 588553	3096	736	4.2
ISIS 588555	4147	1860	2.2
ISIS 588848	2235	738	3.0
ISIS 594430	1548	752	2.1

10

【 1 5 6 8 】

実施例 1 3 5 : ヒト C F B を標的とする非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド及び 5' - T H A - G a l N A c 3 共役アンチセンスオリゴヌクレオチドの、トランスジェニックマウスにおける 6 週間効力試験

同じ核酸塩基配列を有する 2 つのアンチセンスオリゴヌクレオチド、すなわち非共役アンチセンスオリゴヌクレオチド I S I S 5 8 8 5 4 0 と、5' - T H A - G a l N A c 3 - 共役アンチセンスオリゴヌクレオチド I S I S 6 9 6 8 4 4 とを、ヒト C F B トランスジェニックマウス (h C F B - T g マウス) で調べた。

【 1 5 6 9 】

マウスに、6 週にわたって、I S I S 6 9 6 8 4 4 を 0 . 1、1 . 2 5、0 . 5、2 . 0、6 . 0、または 1 2 . 0 m g / k g / 週の用量で皮下投与するか、I S I S 5 8 8 5 4 0 を 2、6、1 2、2 5、または 5 0 m g / k g / 週の用量で皮下投与した。対照マウス群には 6 週にわたって P B S を皮下投与した。最後の投与の 4 8 時間後にマウスを殺した。肝 m R N A レベル s を q R T - P C R で分析した。

30

【 1 5 7 0 】

試験 1

結果を以下の表に掲載する。これらの結果は、C F B を標的とする 5' - T H A - G a l N A c 3 - 共役アンチセンスオリゴヌクレオチドの方が同じ配列を持つ非共役アンチセンスオリゴヌクレオチドよりも強力であることを実証している。

【 1 5 7 1 】

【表 2 2 3】

40

表 2 3 1 : C F B を標的とするアンチオリゴヌクレオチドの効力

	ED ₅₀ (mg/kg)	ED ₇₅ (mg/kg)
ISIS588540	4.52	9.26
ISIS696844	0.52	1.12

【 1 5 7 2 】

試験 2

50

肝臓 mRNA レベルを、同 mRNA の異なる領域を標的とする 2 つの異なるプライマープロブセットで測定し、RIBO GREEN (登録商標) (RGB) またはシクロフィリンのどちらかに対して標準化した。プライマープロブセットは上述の RTS3459、及び RTS3460 (フォワード配列 CGAAGCAGCTCAATGAAATCAA, 本明細書では配列番号 813 と呼ぶ; リバース配列 TGCCTGGAGGGCCTTCTT, 本明細書では配列番号 814 と呼ぶ; プロブ配列 AGACCACAAGTTGAAGTC, 本明細書では配列番号 815 と呼ぶ) であった。結果を以下の表に掲載する。これらの結果は、使用したプライマープロブセットとは無関係に、CFB を標的とする 5' - THA - GalNAc3 - 共役アンチセンスオリゴヌクレオチドの方が同じ配列を持つ非共役アンチセンスオリゴヌクレオチドより強力であることを実証している。

10

【1573】

【表224】

表231: CFBを標的とするアンチオリゴヌクレオチドの効力

	ED ₅₀ RTS345 9 (RGB)	ED ₅₀ RTS346 0 (RGB)	ED ₅₀ RTS3459 (シクロ フィリン)	ED ₅₀ RTS3460 (シクロフ イリン)	ED ₇₅ RTS3459 (RGB)	ED ₇₅ RTS346 0 (RGB)	ED ₇₅ RTS3459 (シクロフィ リン)	ED ₇₅ RTS3460 (シクロフ イリン)
ISIS 58854 0	4.5	4.1	5.2	5.4	9.3	10.0	10.0	9.3
ISIS 69684 4	0.5	0.5	0.6	0.5	1.1	1.3	1.2	0.9

20

出願時の請求項

〔項1〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号1の核酸塩基30~49、48~63、150~169、151~170、152~171、154~169、154~173、156~171、156~175、157~176、158~173、158~177、480~499、600~619、638~657、644~663、738~757、1089~1108、1135~1154、1141~1160、1147~1166、1150~1169、1153~1172、1159~1178、1162~1181、1165~1184、1171~1186、1171~1190、1173~1188、1173~1192、1175~1190、1175~1194、1177~1196、1183~1202、1208~1227、1235~1254、1298~1317、1304~1323、1310~1329、1316~1335、1319~1338、1322~1341、1328~1347、1349~1368、1355~1374、1393~1412、1396~1415、1399~1418、1405~1424、1421~1440、1621~1640、1646~1665、1646~1665、1647~1666、1689~1708、1749~1768、1763~1782、1912~1931、2073~2092、2085~2104、2166~2185、2172~2191、2189~2208、2191~2210、2193~2212、2195~2210、2195~2214、2196~2215、2197~2212、2197~2216、2202~2221、2223~2238、2223~2242、2225~2240、2226~2245、2227~2242、2227~2246、2238~2257、2241~2260、2267~2286、2361~2380、2388~2407、2397~

30

40

50

2 4 1 6、 2 4 4 8 ~ 2 4 6 7、 2 4 5 3 ~ 2 4 7 2、 2 4 5 5 ~ 2 4 7 4、 2 4 5 7 ~
 2 4 7 2、 2 4 5 7 ~ 2 4 7 6、 2 4 5 9 ~ 2 4 7 4、 2 4 5 9 ~ 2 4 7 8、 2 4 6 1 ~
 2 4 7 6、 2 4 6 1 ~ 2 4 8 0、 2 5 3 2 ~ 2 5 5 1、 2 5 5 0 ~ 2 5 6 9、 2 5 5 1 ~
 2 5 6 6、 2 5 5 1 ~ 2 5 7 0、 2 5 5 2 ~ 2 5 6 8、 2 5 5 2 ~ 2 5 7 0、 2 5 5 2 ~
 2 5 7 1、 2 5 5 3 ~ 2 5 6 8、 2 5 5 3 ~ 2 5 7 0、 2 5 5 3 ~ 2 5 7 1、 2 5 5 3 ~
 2 5 7 2、 2 5 5 4 ~ 2 5 7 1、 2 5 5 4 ~ 2 5 7 2、 2 5 5 4 ~ 2 5 7 3、 2 5 5 5 ~
 2 5 7 0、 2 5 5 5 ~ 2 5 7 2、 2 5 5 5 ~ 2 5 7 4、 2 5 5 6 ~ 2 5 7 3、 2 5 5 6 ~
 2 5 7 4、 2 5 5 6 ~ 2 5 7 5、 2 5 5 7 ~ 2 5 7 3、 2 5 5 7 ~ 2 5 7 4、 2 5 5 7 ~
 2 5 7 5、 2 5 5 7 ~ 2 5 7 6、 2 5 5 8 ~ 2 5 7 5、 2 5 5 8 ~ 2 5 7 6、 2 5 5 8 ~
 2 5 7 7、 2 5 5 9 ~ 2 5 7 6、 2 5 5 9 ~ 2 5 7 7、 2 5 5 9 ~ 2 5 7 8、 2 5 6 0 ~ 10
 2 5 7 7、 2 5 6 0 ~ 2 5 7 8、 2 5 6 0 ~ 2 5 7 9、 2 5 6 1 ~ 2 5 7 6、 2 5 6 1 ~
 2 5 7 8、 2 5 6 1 ~ 2 5 7 9、 2 5 6 1 ~ 2 5 8 0、 2 5 6 2 ~ 2 5 7 7、 2 5 6 2 ~
 2 5 7 9、 2 5 6 2 ~ 2 5 8 1、 2 5 6 3 ~ 2 5 7 8、 2 5 6 3 ~ 2 5 8 0、 2 5 6 3 ~
 2 5 8 2、 2 5 6 4 ~ 2 5 8 1、 2 5 6 4 ~ 2 5 8 3、 2 5 6 5 ~ 2 5 8 4、 2 5 6 6 ~
 2 5 8 3、 2 5 6 6 ~ 2 5 8 5、 2 5 6 7 ~ 2 5 8 2、 2 5 6 7 ~ 2 5 8 4、 2 5 6 7 ~
 2 5 8 6、 2 5 6 8 ~ 2 5 8 3、 2 5 6 8 ~ 2 5 8 5、 2 5 6 8 ~ 2 5 8 7、 2 5 6 9 ~
 2 5 8 6、 2 5 6 9 ~ 2 5 8 8、 2 5 7 0 ~ 2 5 8 5、 2 5 7 0 ~ 2 5 8 7、 2 5 7 0 ~
 2 5 8 9、 2 5 7 1 ~ 2 5 8 6、 2 5 7 1 ~ 2 5 8 8、 2 5 7 1 ~ 2 5 9 0、 2 5 7 2 ~
 2 5 8 9、 2 5 7 2 ~ 2 5 9 0、 2 5 7 2 ~ 2 5 9 1、 2 5 7 3 ~ 2 5 9 0、 2 5 7 3 ~
 2 5 9 2、 2 5 7 4 ~ 2 5 9 0、 2 5 7 4 ~ 2 5 9 1、 2 5 7 4 ~ 2 5 9 3、 2 5 7 5 ~ 20
 2 5 9 0、 2 5 7 5 ~ 2 5 9 1、 2 5 7 5 ~ 2 5 9 2、 2 5 7 5 ~ 2 5 9 4、 2 5 7 6 ~
 2 5 9 3、 2 5 7 6 ~ 2 5 9 5、 2 5 7 7 ~ 2 5 9 4、 2 5 7 7 ~ 2 5 9 5、 2 5 7 7 ~
 2 5 9 6、 2 5 7 8 ~ 2 5 9 4、 2 5 7 8 ~ 2 5 9 6、 2 5 7 8 ~ 2 5 9 7、 2 5 7 9 ~
 2 5 9 8、 2 5 8 0 ~ 2 5 9 6、 2 5 8 0 ~ 2 5 9 7、 2 5 8 0 ~ 2 5 9 8、 2 5 8 0 ~
 2 5 9 9、 2 5 8 1 ~ 2 5 9 7、 2 5 8 1 ~ 2 5 9 8、 2 5 8 1 ~ 2 5 9 9、 2 5 8 1 ~
 2 6 0 0、 2 5 8 2 ~ 2 5 9 8、 2 5 8 2 ~ 2 5 9 9、 2 5 8 2 ~ 2 6 0 0、 2 5 8 2 ~
 2 6 0 1、 2 5 8 3 ~ 2 5 9 9、 2 5 8 3 ~ 2 6 0 0、 2 5 8 3 ~ 2 6 0 1、 2 5 8 3 ~
 2 6 0 2、 2 5 8 4 ~ 2 6 0 0、 2 5 8 4 ~ 2 6 0 1、 2 5 8 4 ~ 2 6 0 2、 2 5 8 4 ~
 2 6 0 3、 2 5 8 5 ~ 2 6 0 1、 2 5 8 5 ~ 2 6 0 3、 2 5 8 5 ~ 2 6 0 4、 2 5 8 6 ~
 2 6 0 1、 2 5 8 6 ~ 2 6 0 2、 2 5 8 6 ~ 2 6 0 4、 2 5 8 6 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 7 ~ 30
 2 6 0 2、 2 5 8 7 ~ 2 6 0 3、 2 5 8 7 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 7 ~ 2 6 0 6、 2 5 8 8 ~
 2 6 0 3、 2 5 8 8 ~ 2 6 0 4、 2 5 8 8 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 8 ~ 2 6 0 6、 2 5 8 8 ~
 2 6 0 7、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 4、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 6、 2 5 8 9 ~
 2 6 0 7、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 5、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 6、 2 5 9 0 ~
 2 6 0 7、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 1 ~
 2 6 0 7、 2 5 9 1 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 1 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 1 ~ 2 6 1 0、 2 5 9 2 ~
 2 6 0 7、 2 5 9 2 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 2 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 2 ~ 2 6 1 0、 2 5 9 2 ~
 2 6 1 1、 2 5 9 3 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 3 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 3 ~ 2 6 1 0、 2 5 9 3 ~
 2 6 1 2、 2 5 9 4 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 4 ~ 2 6 1 0、 2 5 9 4 ~ 2 6 1 1、 2 5 9 4 ~
 2 6 1 2、 2 5 9 4 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 0、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 1、 2 5 9 5 ~ 40
 2 6 1 2、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 4、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 1、 2 5 9 6 ~
 2 6 1 2、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 4、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 5、 2 5 9 7 ~
 2 6 1 2、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 2、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 4、 2 5 9 7 ~
 2 6 1 5、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 6、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 4、 2 5 9 8 ~
 2 6 1 5、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 6、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 7、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 4、 2 5 9 9 ~
 2 6 1 5、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 6、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 7、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 8、 2 6 0 0 ~
 2 6 1 5、 2 6 0 0 ~ 2 6 1 6、 2 6 0 0 ~ 2 6 1 7、 2 6 0 0 ~ 2 6 1 8、 2 6 0 0 ~
 2 6 1 9、 2 6 0 1 ~ 2 6 1 6、 2 6 0 1 ~ 2 6 1 7、 2 6 0 1 ~ 2 6 1 8、 2 6 0 1 ~
 2 6 1 9、 2 6 0 1 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 2 ~ 2 6 1 7、 2 6 0 2 ~ 2 6 1 8、 2 6 0 2 ~
 2 6 1 9、 2 6 0 2 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 2 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 3 ~ 2 6 1 8、 2 6 0 3 ~ 50

2619、2603～2620、2603～2621、2603～2622、2604～
 2619、2604～2620、2604～2621、2604～2622、2604～
 2623、2605～2620、2605～2621、2605～2622、2605～
 2623、2605～2624、2606～2621、2606～2622、2606～
 2623、2606～2624、2606～2625、2607～2622、2607～
 2623、2607～2624、2607～2625、2607～2626、2608～
 2623、2608～2624、2608～2625、2608～2626、2608～
 2627、2609～2624、2609～2625、2609～2626、2609～
 2627、2609～2628、2610～2625、2610～2626、2610～
 2627、2610～2628、2610～2629、2611～2626、2611～
 2627、2611～2628、2611～2629、2611～2630、2612～
 2627、2612～2628、2612～2629、2612～2630、2612～
 2631、2613～2628、2613～2629、2613～2630、2613～
 2631、2614～2629、2614～2630、2614～2631、2615～
 2630、2615～2631、または2616～2631内で相補的な8～80個の連
 結されたヌクレオチドからなり、かつ該修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号1に対して
 少なくとも85%、90%、95%、または100%相補的である、前記化合物。

〔項2〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチド
 が、配列番号1の核酸塩基30～49、48～63、150～169、151～170、
 152～171、154～169、154～173、156～171、156～175、
 157～176、158～173、158～177、480～499、600～619、
 638～657、644～663、738～757、1089～1108、1135～1
 154、1141～1160、1147～1166、1150～1169、1153～1
 172、1159～1178、1162～1181、1165～1184、1171～1
 186、1171～1190、1173～1188、1173～1192、1175～1
 190、1175～1194、1177～1196、1183～1202、1208～1
 227、1235～1254、1298～1317、1304～1323、1310～1
 329、1316～1335、1319～1338、1322～1341、1328～1
 347、1349～1368、1355～1374、1393～1412、1396～1
 415、1399～1418、1405～1424、1421～1440、1621～1
 640、1646～1665、1646～1665、1647～1666、1689～1
 708、1749～1768、1763～1782、1912～1931、2073～2
 092、2085～2104、2166～2185、2172～2191、2189～2
 208、2191～2210、2193～2212、2195～2210、2195～2
 214、2196～2215、2197～2212、2197～2216、2202～2
 221、2223～2238、2223～2242、2225～2240、2226～2
 245、2227～2242、2227～2246、2238～2257、2241～2
 260、2267～2286、2361～2380、2388～2407、2397～2
 416、2448～2467、2453～2472、2455～2474、2457～
 2472、2457～2476、2459～2474、2459～2478、2461～
 2476、2461～2480、2532～2551、2550～2569、2551～
 2566、2551～2570、2552～2568、2552～2570、2552～
 2571、2553～2568、2553～2570、2553～2571、2553～
 2572、2554～2571、2554～2572、2554～2573、2555～
 2570、2555～2572、2555～2574、2556～2573、2556～
 2574、2556～2575、2557～2573、2557～2574、2557～
 2575、2557～2576、2558～2575、2558～2576、2558～
 2577、2559～2576、2559～2577、2559～2578、2560～
 2577、2560～2578、2560～2579、2561～2576、2561～

10

20

30

40

50

2 5 7 8、 2 5 6 1 ~ 2 5 7 9、 2 5 6 1 ~ 2 5 8 0、 2 5 6 2 ~ 2 5 7 7、 2 5 6 2 ~
 2 5 7 9、 2 5 6 2 ~ 2 5 8 1、 2 5 6 3 ~ 2 5 7 8、 2 5 6 3 ~ 2 5 8 0、 2 5 6 3 ~
 2 5 8 2、 2 5 6 4 ~ 2 5 8 1、 2 5 6 4 ~ 2 5 8 3、 2 5 6 5 ~ 2 5 8 4、 2 5 6 6 ~
 2 5 8 3、 2 5 6 6 ~ 2 5 8 5、 2 5 6 7 ~ 2 5 8 2、 2 5 6 7 ~ 2 5 8 4、 2 5 6 7 ~
 2 5 8 6、 2 5 6 8 ~ 2 5 8 3、 2 5 6 8 ~ 2 5 8 5、 2 5 6 8 ~ 2 5 8 7、 2 5 6 9 ~
 2 5 8 6、 2 5 6 9 ~ 2 5 8 8、 2 5 7 0 ~ 2 5 8 5、 2 5 7 0 ~ 2 5 8 7、 2 5 7 0 ~
 2 5 8 9、 2 5 7 1 ~ 2 5 8 6、 2 5 7 1 ~ 2 5 8 8、 2 5 7 1 ~ 2 5 9 0、 2 5 7 2 ~
 2 5 8 9、 2 5 7 2 ~ 2 5 9 0、 2 5 7 2 ~ 2 5 9 1、 2 5 7 3 ~ 2 5 9 0、 2 5 7 3 ~
 2 5 9 2、 2 5 7 4 ~ 2 5 9 0、 2 5 7 4 ~ 2 5 9 1、 2 5 7 4 ~ 2 5 9 3、 2 5 7 5 ~
 2 5 9 0、 2 5 7 5 ~ 2 5 9 1、 2 5 7 5 ~ 2 5 9 2、 2 5 7 5 ~ 2 5 9 4、 2 5 7 6 ~ 10
 2 5 9 3、 2 5 7 6 ~ 2 5 9 5、 2 5 7 7 ~ 2 5 9 4、 2 5 7 7 ~ 2 5 9 5、 2 5 7 7 ~
 2 5 9 6、 2 5 7 8 ~ 2 5 9 4、 2 5 7 8 ~ 2 5 9 6、 2 5 7 8 ~ 2 5 9 7、 2 5 7 9 ~
 2 5 9 8、 2 5 8 0 ~ 2 5 9 6、 2 5 8 0 ~ 2 5 9 7、 2 5 8 0 ~ 2 5 9 8、 2 5 8 0 ~
 2 5 9 9、 2 5 8 1 ~ 2 5 9 7、 2 5 8 1 ~ 2 5 9 8、 2 5 8 1 ~ 2 5 9 9、 2 5 8 1 ~
 2 6 0 0、 2 5 8 2 ~ 2 5 9 8、 2 5 8 2 ~ 2 5 9 9、 2 5 8 2 ~ 2 6 0 0、 2 5 8 2 ~
 2 6 0 1、 2 5 8 3 ~ 2 5 9 9、 2 5 8 3 ~ 2 6 0 0、 2 5 8 3 ~ 2 6 0 1、 2 5 8 3 ~
 2 6 0 2、 2 5 8 4 ~ 2 6 0 0、 2 5 8 4 ~ 2 6 0 1、 2 5 8 4 ~ 2 6 0 2、 2 5 8 4 ~
 2 6 0 3、 2 5 8 5 ~ 2 6 0 1、 2 5 8 5 ~ 2 6 0 3、 2 5 8 5 ~ 2 6 0 4、 2 5 8 6 ~
 2 6 0 1、 2 5 8 6 ~ 2 6 0 2、 2 5 8 6 ~ 2 6 0 4、 2 5 8 6 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 7 ~
 2 6 0 2、 2 5 8 7 ~ 2 6 0 3、 2 5 8 7 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 7 ~ 2 6 0 6、 2 5 8 8 ~ 20
 2 6 0 3、 2 5 8 8 ~ 2 6 0 4、 2 5 8 8 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 8 ~ 2 6 0 6、 2 5 8 8 ~
 2 6 0 7、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 4、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 5、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 6、 2 5 8 9 ~
 2 6 0 7、 2 5 8 9 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 5、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 6、 2 5 9 0 ~
 2 6 0 7、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 0 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 1 ~
 2 6 0 7、 2 5 9 1 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 1 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 1 ~ 2 6 1 0、 2 5 9 2 ~
 2 6 0 7、 2 5 9 2 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 2 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 2 ~ 2 6 1 0、 2 5 9 2 ~
 2 6 1 1、 2 5 9 3 ~ 2 6 0 8、 2 5 9 3 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 3 ~ 2 6 1 0、 2 5 9 3 ~
 2 6 1 2、 2 5 9 4 ~ 2 6 0 9、 2 5 9 4 ~ 2 6 1 0、 2 5 9 4 ~ 2 6 1 1、 2 5 9 4 ~
 2 6 1 2、 2 5 9 4 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 0、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 1、 2 5 9 5 ~
 2 6 1 2、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 5 ~ 2 6 1 4、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 1、 2 5 9 6 ~ 30
 2 6 1 2、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 4、 2 5 9 6 ~ 2 6 1 5、 2 5 9 7 ~
 2 6 1 2、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 2、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 4、 2 5 9 7 ~
 2 6 1 5、 2 5 9 7 ~ 2 6 1 6、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 3、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 4、 2 5 9 8 ~
 2 6 1 5、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 6、 2 5 9 8 ~ 2 6 1 7、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 4、 2 5 9 9 ~
 2 6 1 5、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 6、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 7、 2 5 9 9 ~ 2 6 1 8、 2 6 0 0 ~
 2 6 1 5、 2 6 0 0 ~ 2 6 1 6、 2 6 0 0 ~ 2 6 1 7、 2 6 0 0 ~ 2 6 1 8、 2 6 0 0 ~
 2 6 1 9、 2 6 0 1 ~ 2 6 1 6、 2 6 0 1 ~ 2 6 1 7、 2 6 0 1 ~ 2 6 1 8、 2 6 0 1 ~
 2 6 1 9、 2 6 0 1 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 2 ~ 2 6 1 7、 2 6 0 2 ~ 2 6 1 8、 2 6 0 2 ~
 2 6 1 9、 2 6 0 2 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 2 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 3 ~ 2 6 1 8、 2 6 0 3 ~
 2 6 1 9、 2 6 0 3 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 3 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 3 ~ 2 6 2 2、 2 6 0 4 ~ 40
 2 6 1 9、 2 6 0 4 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 4 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 4 ~ 2 6 2 2、 2 6 0 4 ~
 2 6 2 3、 2 6 0 5 ~ 2 6 2 0、 2 6 0 5 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 5 ~ 2 6 2 2、 2 6 0 5 ~
 2 6 2 3、 2 6 0 5 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 6 ~ 2 6 2 1、 2 6 0 6 ~ 2 6 2 2、 2 6 0 6 ~
 2 6 2 3、 2 6 0 6 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 6 ~ 2 6 2 5、 2 6 0 7 ~ 2 6 2 2、 2 6 0 7 ~
 2 6 2 3、 2 6 0 7 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 7 ~ 2 6 2 5、 2 6 0 7 ~ 2 6 2 6、 2 6 0 8 ~
 2 6 2 3、 2 6 0 8 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 8 ~ 2 6 2 5、 2 6 0 8 ~ 2 6 2 6、 2 6 0 8 ~
 2 6 2 7、 2 6 0 9 ~ 2 6 2 4、 2 6 0 9 ~ 2 6 2 5、 2 6 0 9 ~ 2 6 2 6、 2 6 0 9 ~
 2 6 2 7、 2 6 0 9 ~ 2 6 2 8、 2 6 1 0 ~ 2 6 2 5、 2 6 1 0 ~ 2 6 2 6、 2 6 1 0 ~
 2 6 2 7、 2 6 1 0 ~ 2 6 2 8、 2 6 1 0 ~ 2 6 2 9、 2 6 1 1 ~ 2 6 2 6、 2 6 1 1 ~
 2 6 2 7、 2 6 1 1 ~ 2 6 2 8、 2 6 1 1 ~ 2 6 2 9、 2 6 1 1 ~ 2 6 3 0、 2 6 1 2 ~ 50

2627、2612～2628、2612～2629、2612～2630、2612～2631、2613～2628、2613～2629、2613～2630、2613～2631、2614～2629、2614～2630、2614～2631、2615～2630、2615～2631、または2616～2631のうちの長さが等しい部分に100%相補的な少なくとも8個の連続する核酸塩基部分を含む核酸塩基配列を有する8～80個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ前記修飾オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配列が、配列番号1に対して少なくとも85%、90%、95%、または100%相補的である、前記化合物。

〔項3〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号2の核酸塩基1608～1627、1685～1704、1686～1705、1751～1770、1769～1784、1871～1890、1872～1891、1873～1892、1875～1890、1875～1894、1877～1892、1877～1896、1878～1897、1879～1894、1879～1898、2288～2307、2808～2827、2846～2865、2852～2871、2946～2965、3773～3792、3819～3838、3825～3844、3831～3850、3834～3853、3837～3856、3843～3862、4151～4166、4151～4170、4153～4172、4159～4178、4184～4203、4211～4230、4609～4628、4612～4631、4615～4634、4621～4640、4642～4661、4648～4667、4686～4705、4689～4708、4692～4711、4698～4717、4714～4733、5270～5289、5295～5314、5296～5315、5830～5849、5890～5909、5904～5923、6406～6425、6662～6681、6674～6693、6954～6973、6960～6979、6977～6996、6979～6998、6981～7000、6983～6998、6983～7002、6984～7003、6985～7000、6985～7004、6990～7009、7122～7141、7125～7144、7151～7170、7353～7372、7362～7381、7683～7702、7688～7707、7690～7709、7692～7707、7692～7711、7694～7709、7694～7713、7696～7711、7696～7715、7767～7786、7785～7804、7786～7801、7787～7803、7787～7805、7787～7806、7788～7806、7789～7806、7789～7807、7789～7808、7790～7805、7790～7807、7790～7809、7791～7808、7791～7809、7791～7810、7792～7808、7792～7809、7792～7810、7792～7811、7793～7810、7793～7811、7793～7812、7794～7811、7794～7812、7794～7813、7795～7812、7795～7813、7795～7814、7796～7811、7796～7813、7796～7814、7796～7815、7797～7812、7797～7814、7797～7816、7798～7813、7798～7815、7798～7817、7799～7816、7799～7818、7800～7819、7801～7818、7801～7820、7802～7817、7802～7819、7802～7821、7803～7818、7803～7820、7803～7822、7804～7821、7804～7823、7805～7820、7805～7822、7805～7824、7806～7821、7806～7823、7806～7825、7807～7824、7807～7825、7807～7826、7808～7825、7808～7827、7809～7825、7809～7826、7809～7828、7810～7825、7810～7826、7810～7827、7810～7829、7811～7828、7811～7830、7812～7829、7812～7830、7812～7831、7813～7829、7813～7831、7813～78

10

20

30

40

50

32、7814～7833、7815～7831、7815～7832、7815～78
 33、7815～7834、7816～7832、7816～7833、7816～78
 34、7816～7835、7817～7833、7817～7834、7817～78
 35、7817～7836、7818～7834、7818～7835、7818～78
 36、7818～7837、7819～7835、7819～7836、7819～78
 37、7819～7838、7820～7836、7820～7838、7820～78
 39、7821～7836、7821～7837、7821～7839、7821～78
 40、7822～7837、7822～7838、7822～7840、7822～78
 41、7823～7838、7823～7839、7823～7839、7823～78
 40、7823～7841、7823～7842、7824～7839、7824～78
 40、7824～7840、7824～7841、7824～7842、7824～78
 43、7825～7840、7825～7841、7825～7842、7825～78
 43、7825～7844、7826～7842、7826～7843、7826～78
 44、7826～7845、7827～7842、7827～7843、7827～78
 44、7827～7845、7827～7846、7828～7843、7828～78
 44、7828～7845、7828～7847、7829～7844、7829～78
 45、7829～7846、7829～7847、7829～7848、7830～78
 45、7830～7846、7830～7847、7830～7848、7830～78
 49、7831～7846、7831～7847、7831～7848、7831～78
 49、7831～7850、7832～7847、7832～7848、7832～78
 49、7832～7850、7832～7851、7833～7848、7833～78
 49、7833～7850、7833～7851、7833～7852、7834～78
 49、7834～7850、7834～7851、7834～7852、7834～78
 53、7835～7850、7835～7851、7835～7852、7835～78
 53、7835～7854、7836～7851、7836～7852、7836～78
 53、7836～7854、7836～7855、7837～7852、7837～78
 53、7837～7854、7837～7855、7837～7856、7838～78
 53、7838～7854、7838～7855、7838～7856、7838～78
 57、7839～7854、7839～7855、7839～7856、7839～78
 57、7839～7858、7840～7855、7840～7856、7840～78
 57、7840～7858、7840～7859、7841～7856、7841～78
 57、7841～7858、7841～7859、7841～7860、7842～78
 57、7842～7858、7842～7859、7842～7860、7842～78
 61、7843～7858、7843～7859、7843～7860、7843～78
 61、7843～7862、7844～7859、7844～7860、7844～78
 61、7844～7862、7845～7860、7845～7861、7845～78
 62、7846～7861、または7846～7862内で相補的な8～80個の連結さ
 れたヌクレオシドからなり、かつ該修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号2に対して少な
 くとも85%、90%、95%、または100%相補的である、前記化合物。

〔項4〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチド
 が、配列番号2の核酸塩基1608～1627、1685～1704、1686～170
 5、1751～1770、1769～1784、1871～1890、1872～189
 1、1873～1892、1875～1890、1875～1894、1877～189
 2、1877～1896、1878～1897、1879～1894、1879～189
 8、2288～2307、2808～2827、2846～2865、2852～287
 1、2946～2965、3773～3792、3819～3838、3825～384
 4、3831～3850、3834～3853、3837～3856、3843～386
 2、4151～4166、4151～4170、4153～4172、4159～417
 8、4184～4203、4211～4230、4609～4628、4612～463

10

20

30

40

50

1、 4 6 1 5 ~ 4 6 3 4、 4 6 2 1 ~ 4 6 4 0、 4 6 4 2 ~ 4 6 6 1、 4 6 4 8 ~ 4 6 6
7、 4 6 8 6 ~ 4 7 0 5、 4 6 8 9 ~ 4 7 0 8、 4 6 9 2 ~ 4 7 1 1、 4 6 9 8 ~ 4 7 1
7、 4 7 1 4 ~ 4 7 3 3、 5 2 7 0 ~ 5 2 8 9、 5 2 9 5 ~ 5 3 1 4、 5 2 9 6 ~ 5 3 1
5、 5 8 3 0 ~ 5 8 4 9、 5 8 9 0 ~ 5 9 0 9、 5 9 0 4 ~ 5 9 2 3、 6 4 0 6 ~ 6 4 2
5、 6 6 6 2 ~ 6 6 8 1、 6 6 7 4 ~ 6 6 9 3、 6 9 5 4 ~ 6 9 7 3、 6 9 6 0 ~ 6 9 7
9、 6 9 7 7 ~ 6 9 9 6、 6 9 7 9 ~ 6 9 9 8、 6 9 8 1 ~ 7 0 0 0、 6 9 8 3 ~ 6 9 9
8、 6 9 8 3 ~ 7 0 0 2、 6 9 8 4 ~ 7 0 0 3、 6 9 8 5 ~ 7 0 0 0、 6 9 8 5 ~ 7 0 0
4、 6 9 9 0 ~ 7 0 0 9、 7 1 2 2 ~ 7 1 4 1、 7 1 2 5 ~ 7 1 4 4、 7 1 5 1 ~ 7 1 7
0、 7 3 5 3 ~ 7 3 7 2、 7 3 6 2 ~ 7 3 8 1、 7 6 8 3 ~ 7 7 0 2、 7 6 8 8 ~ 7 7 0
7、 7 6 9 0 ~ 7 7 0 9、 7 6 9 2 ~ 7 7 0 7、 7 6 9 2 ~ 7 7 1 1、 7 6 9 4 ~ 7 7 0
9、 7 6 9 4 ~ 7 7 1 3、 7 6 9 6 ~ 7 7 1 1、 7 6 9 6 ~ 7 7 1 5、 7 7 6 7 ~ 7 7 8
6、 7 7 8 5 ~ 7 8 0 4、 7 7 8 6 ~ 7 8 0 1、 7 7 8 7 ~ 7 8 0 3、 7 7 8 7 ~ 7 8 0
5、 7 7 8 7 ~ 7 8 0 6、 7 7 8 8 ~ 7 8 0 3、 7 7 8 8 ~ 7 8 0 5、 7 7 8 8 ~ 7 8 0
6、 7 7 8 8 ~ 7 8 0 7、 7 7 8 9 ~ 7 8 0 6、 7 7 8 9 ~ 7 8 0 7、 7 7 8 9 ~ 7 8 0
8、 7 7 9 0 ~ 7 8 0 5、 7 7 9 0 ~ 7 8 0 7、 7 7 9 0 ~ 7 8 0 9、 7 7 9 1 ~ 7 8 0
8、 7 7 9 1 ~ 7 8 0 9、 7 7 9 1 ~ 7 8 1 0、 7 7 9 2 ~ 7 8 0 8、 7 7 9 2 ~ 7 8 0
9、 7 7 9 2 ~ 7 8 1 0、 7 7 9 2 ~ 7 8 1 1、 7 7 9 3 ~ 7 8 1 0、 7 7 9 3 ~ 7 8 1
1、 7 7 9 3 ~ 7 8 1 2、 7 7 9 4 ~ 7 8 1 1、 7 7 9 4 ~ 7 8 1 2、 7 7 9 4 ~ 7 8 1
3、 7 7 9 5 ~ 7 8 1 2、 7 7 9 5 ~ 7 8 1 3、 7 7 9 5 ~ 7 8 1 4、 7 7 9 6 ~ 7 8 1
1、 7 7 9 6 ~ 7 8 1 3、 7 7 9 6 ~ 7 8 1 4、 7 7 9 6 ~ 7 8 1 5、 7 7 9 7 ~ 7 8 1
2、 7 7 9 7 ~ 7 8 1 4、 7 7 9 7 ~ 7 8 1 6、 7 7 9 8 ~ 7 8 1 3、 7 7 9 8 ~ 7 8 1
5、 7 7 9 8 ~ 7 8 1 7、 7 7 9 9 ~ 7 8 1 6、 7 7 9 9 ~ 7 8 1 8、 7 8 0 0 ~ 7 8 1
9、 7 8 0 1 ~ 7 8 1 8、 7 8 0 1 ~ 7 8 2 0、 7 8 0 2 ~ 7 8 1 7、 7 8 0 2 ~ 7 8 1
9、 7 8 0 2 ~ 7 8 2 1、 7 8 0 3 ~ 7 8 1 8、 7 8 0 3 ~ 7 8 2 0、 7 8 0 3 ~ 7 8 2
2、 7 8 0 4 ~ 7 8 2 1、 7 8 0 4 ~ 7 8 2 3、 7 8 0 5 ~ 7 8 2 0、 7 8 0 5 ~ 7 8 2
2、 7 8 0 5 ~ 7 8 2 4、 7 8 0 6 ~ 7 8 2 1、 7 8 0 6 ~ 7 8 2 3、 7 8 0 6 ~ 7 8 2
5、 7 8 0 7 ~ 7 8 2 4、 7 8 0 7 ~ 7 8 2 5、 7 8 0 7 ~ 7 8 2 6、 7 8 0 8 ~ 7 8 2
5、 7 8 0 8 ~ 7 8 2 7、 7 8 0 9 ~ 7 8 2 5、 7 8 0 9 ~ 7 8 2 6、 7 8 0 9 ~ 7 8 2
8、 7 8 1 0 ~ 7 8 2 5、 7 8 1 0 ~ 7 8 2 6、 7 8 1 0 ~ 7 8 2 7、 7 8 1 0 ~ 7 8 2
9、 7 8 1 1 ~ 7 8 2 8、 7 8 1 1 ~ 7 8 3 0、 7 8 1 2 ~ 7 8 2 9、 7 8 1 2 ~ 7 8 3
0、 7 8 1 2 ~ 7 8 3 1、 7 8 1 3 ~ 7 8 2 9、 7 8 1 3 ~ 7 8 3 1、 7 8 1 3 ~ 7 8 3
2、 7 8 1 4 ~ 7 8 3 3、 7 8 1 5 ~ 7 8 3 1、 7 8 1 5 ~ 7 8 3 2、 7 8 1 5 ~ 7 8 3
3、 7 8 1 5 ~ 7 8 3 4、 7 8 1 6 ~ 7 8 3 2、 7 8 1 6 ~ 7 8 3 3、 7 8 1 6 ~ 7 8 3
4、 7 8 1 6 ~ 7 8 3 5、 7 8 1 7 ~ 7 8 3 3、 7 8 1 7 ~ 7 8 3 4、 7 8 1 7 ~ 7 8 3
5、 7 8 1 7 ~ 7 8 3 6、 7 8 1 8 ~ 7 8 3 4、 7 8 1 8 ~ 7 8 3 5、 7 8 1 8 ~ 7 8 3
6、 7 8 1 8 ~ 7 8 3 7、 7 8 1 9 ~ 7 8 3 5、 7 8 1 9 ~ 7 8 3 6、 7 8 1 9 ~ 7 8 3
7、 7 8 1 9 ~ 7 8 3 8、 7 8 2 0 ~ 7 8 3 6、 7 8 2 0 ~ 7 8 3 8、 7 8 2 0 ~ 7 8 3
9、 7 8 2 1 ~ 7 8 3 6、 7 8 2 1 ~ 7 8 3 7、 7 8 2 1 ~ 7 8 3 9、 7 8 2 1 ~ 7 8 4
0、 7 8 2 2 ~ 7 8 3 7、 7 8 2 2 ~ 7 8 3 8、 7 8 2 2 ~ 7 8 4 0、 7 8 2 2 ~ 7 8 4
1、 7 8 2 3 ~ 7 8 3 8、 7 8 2 3 ~ 7 8 3 9、 7 8 2 3 ~ 7 8 3 9、 7 8 2 3 ~ 7 8
4 0、 7 8 2 3 ~ 7 8 4 1、 7 8 2 3 ~ 7 8 4 2、 7 8 2 4 ~ 7 8 3 9、 7 8 2 4 ~ 7 8
4 0、 7 8 2 4 ~ 7 8 4 0、 7 8 2 4 ~ 7 8 4 1、 7 8 2 4 ~ 7 8 4 2、 7 8 2 4 ~ 7 8
4 3、 7 8 2 5 ~ 7 8 4 0、 7 8 2 5 ~ 7 8 4 1、 7 8 2 5 ~ 7 8 4 2、 7 8 2 5 ~ 7 8
4 3、 7 8 2 5 ~ 7 8 4 4、 7 8 2 6 ~ 7 8 4 2、 7 8 2 6 ~ 7 8 4 3、 7 8 2 6 ~ 7 8
4 4、 7 8 2 6 ~ 7 8 4 5、 7 8 2 7 ~ 7 8 4 2、 7 8 2 7 ~ 7 8 4 3、 7 8 2 7 ~ 7 8
4 4、 7 8 2 7 ~ 7 8 4 5、 7 8 2 7 ~ 7 8 4 6、 7 8 2 8 ~ 7 8 4 3、 7 8 2 8 ~ 7 8
4 4、 7 8 2 8 ~ 7 8 4 5、 7 8 2 8 ~ 7 8 4 7、 7 8 2 9 ~ 7 8 4 4、 7 8 2 9 ~ 7 8
4 5、 7 8 2 9 ~ 7 8 4 6、 7 8 2 9 ~ 7 8 4 7、 7 8 2 9 ~ 7 8 4 8、 7 8 3 0 ~ 7 8
4 5、 7 8 3 0 ~ 7 8 4 6、 7 8 3 0 ~ 7 8 4 7、 7 8 3 0 ~ 7 8 4 8、 7 8 3 0 ~ 7 8
4 9、 7 8 3 1 ~ 7 8 4 6、 7 8 3 1 ~ 7 8 4 7、 7 8 3 1 ~ 7 8 4 8、 7 8 3 1 ~ 7 8

10

20

30

40

50

49、7831～7850、7832～7847、7832～7848、7832～7849、7832～7850、7832～7851、7833～7848、7833～7849、7833～7850、7833～7851、7833～7852、7834～7849、7834～7850、7834～7851、7834～7852、7834～7853、7835～7850、7835～7851、7835～7852、7835～7853、7835～7854、7836～7851、7836～7852、7836～7853、7836～7854、7836～7855、7837～7852、7837～7853、7837～7854、7837～7855、7837～7856、7838～7853、7838～7854、7838～7855、7838～7856、7838～7857、7839～7854、7839～7855、7839～7856、7839～7857、7839～7858、7840～7855、7840～7856、7840～7857、7840～7858、7840～7859、7841～7856、7841～7857、7841～7858、7841～7859、7841～7860、7842～7858、7842～7859、7842～7860、7842～7861、7843～7858、7843～7859、7843～7860、7843～7861、7843～7862、7844～7859、7844～7860、7844～7861、7844～7862、7845～7860、7845～7861、7845～7862、7846～7861、及び7846～7862のうちの長さが等しい部分に100%相補的な少なくとも8個の連続する核酸塩基部分を含む核酸塩基配列を有する8～80個の連結されたヌクレオチドからなり、かつ前記修飾オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配列は、配列番号2に対して少なくとも85%、90%、95%、または100%相補的である、前記化合物。

10

20

〔項5〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドがCFB核酸の3'UTRを標的とする、前記化合物。

〔項6〕

前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号1の核酸塩基配列を有するCFB核酸のヌクレオチド2574～2626内を標的とする、請求項5に記載の化合物。

〔項7〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号1の核酸塩基配列を有するCFB核酸の核酸塩基2457～2631、2457～2472、2457～2474、2457～2476、2457～2566、2457～2570、2457～2571、2457～2572、2457～2573、2457～2574、2457～2575、2457～2576、2457～2577、2457～2578、2457～2579、2457～2580、2457～2581、2457～2582、2457～2583、2457～2584、2457～2585、2457～2586、2457～2587、2457～2588、2457～2589、2457～2590、2457～2591、2457～2592、2457～2593、2457～2594、2457～2595、2457～2596、2457～2597、2457～2598、2457～2599、2457～2600、2457～2601、2457～2602、2457～2603、2457～2604、2457～2605、2457～2606、2457～2607、2457～2608、2457～2609、2457～2610、2457～2611、2457～2612、2457～2613、2457～2614、2457～2615、2457～2616、2457～2617、2457～2618、2457～2619、2457～2620、2457～2621、2457～2622、2457～2623、2457～2624、2457～2625、2457～2626、2457～2627、2457～2628、2457～2629、2457～2630、2457～2631、2459～2474、2459～2476、2459～2566、2459～2570、2459～2571、2459～2572、2459～2573、2459～2574、2459～2575、2459～2576、2

30

40

50

2626、2600～2627、2600～2628、2600～2629、2600～
 2630、2600～2631、2601～2616、2601～2617、2601～
 2618、2601～2619、2601～2620、2601～2621、2601～
 2622、2601～2623、2601～2624、2601～2625、2601～
 2626、2601～2627、2601～2628、2601～2629、2601～
 2630、2601～2631、2602～2618、2602～2619、2602～
 2620、2602～2621、2602～2622、2602～2623、2602～
 2624、2602～2625、2602～2626、2602～2627、2602～
 2628、2602～2629、2602～2630、2602～2631、2603～
 2620、2603～2621、2603～2622、2603～2623、2603～ 10
 2624、2603～2625、2603～2626、2603～2627、2603～
 2628、2603～2629、2603～2630、2603～2631、2604～
 2619、2604～2620、2604～2621、2604～2622、2604～
 2623、2604～2624、2604～2625、2604～2626、2604～
 2627、2604～2628、2604～2629、2604～2630、2604～
 2631、2605～2620、2605～2621、2605～2622、2605～
 2623、2605～2624、2605～2625、2605～2626、2605～
 2627、2605～2628、2605～2629、2605～2630、2605～
 2631、2606～2621、2606～2622、2606～2623、2606～
 2624、2606～2625、2606～2626、2606～2627、2606～ 20
 2628、2606～2629、2606～2630、2606～2631、2607～
 2622、2607～2623、2607～2624、2607～2625、2607～
 2626、2607～2627、2607～2628、2607～2629、2607～
 2630、2607～2631、2608～2623、2608～2624、2608～
 2625、2608～2626、2608～2627、2608～2628、2608～
 2629、2608～2630、2608～2631、2609～2624、2609～
 2625、2609～2626、2609～2627、2609～2628、2609～
 2629、2609～2630、2609～2631、2610～2625、2610～
 2626、2610～2627、2610～2628、2610～2629、2610～
 2630、2610～2631、2611～2626、2611～2627、2611～ 30
 2628、2611～2629、2611～2630、2611～2631、2612～
 2627、2612～2628、2612～2629、2612～2630、2612～
 2631、2613～2628、2613～2629、2613～2630、2613～
 2631、2614～2629、2614～2630、2614～2631、2615～
 2630、2615～2631、または2616～2631のうちの長さが等しい部分に
 相補的な少なくとも8個の連続する核酸塩基部分を含む核酸塩基配列を有する8～80個
 の連結されたヌクレオシドからなり、かつ前記修飾オリゴヌクレオチドの前記核酸塩基配
 列が配列番号1に相補的である、前記化合物。

〔項8〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチド
 が、配列番号1のヌクレオチド2193～2212、2195～2210、2457～2
 476、2571～2590、2584～2603、2588～2607、2592～2
 611、2594～2613、2597～2616、2600～2619、または259
 6～2611内で相補的な8～80個の連結されたヌクレオシドからなる、前記化合物。

〔項9〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチド
 が、配列番号198、228、237、440、444、448、450、453、45
 5、549、及び598のいずれか一つを含む核酸塩基配列を有する8～80個の連結さ
 れたヌクレオシドからなる、前記化合物。

〔項10〕

10

20

30

40

50

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号 198、228、237、440、444、448、450、453、455、549、及び 598 のいずれか一つからなる核酸塩基配列を有する、前記化合物。〔項 11〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが 10～30 個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号 6～808 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 8 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、前記化合物。

〔項 12〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが 10～30 個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号 6～808 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 9 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、前記化合物。

10

〔項 13〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが 10～30 個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号 6～808 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 10 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、前記化合物。

〔項 14〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが 10～30 個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号 6～808 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 11 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、前記化合物。

20

〔項 15〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが 10～30 個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号 6～808 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 12 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する、前記化合物。

〔項 16〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが 10～30 個の連結されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号 6～808 のいずれか一つの核酸塩基配列を含む核酸塩基配列を有する、前記化合物。

30

〔項 17〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが配列番号 6～808 のいずれか一つの核酸塩基配列からなる、前記化合物。

〔項 18〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号 84、238、239、317、412、413、420、421、426、434、436、437、438、439、440、442、443、444、445、446、448、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、464、465、472、473、514、515、542、543、544、545、546、551、553、555、556、599、600、601、602、610、616、617、618、662、666、670、676、677、678、688、689、713、723、729、730、740、741、742、743、744、745、746、747、748、749、755、756、768、783、793、833、及び 867 のいずれか一つの少なくとも 8 核酸塩基部分を含む核酸塩基配列を有する、前記化合物。

40

〔項 19〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号 198、228、237、440、444、448、450、453、45

50

5、549、及び598のいずれか一つを含む核酸塩基配列を有する10～30個の連結されたヌクレオシドからなり、前記修飾オリゴヌクレオチドが、連結されたデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、連結されたヌクレオシドからなる5'ウイングセグメント、及び連結されたヌクレオシドからなる3'ウイングセグメントを含み、前記ギャップセグメントは前記5'ウイングセグメントと前記3'ウイングセグメントの間に配置されており、かつ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、前記化合物。

〔項20〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号198、228、237、440、444、448、450、453、または455に示す配列からなる核酸塩基配列を有する20個の連結されたヌクレオシドからなり、前記修飾オリゴヌクレオチドが

10

10個の連結されたデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、5個の連結されたヌクレオシドからなる5'ウイングセグメント、及び5個の連結されたヌクレオシドからなる3'ウイングセグメント

を含み、前記ギャップセグメントは前記5'ウイングセグメントと前記3'ウイングセグメントの間に配置されており、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、各ヌクレオシド間連結部はホスホロチオエート連結部であり、かつ各シトシンが5-メチルシトシンである、前記化合物。

20

〔項21〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号598に示す配列からなる核酸塩基配列を有する16個の連結されたヌクレオシドからなり、前記修飾オリゴヌクレオチドが

10個の連結されたデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、3個の連結されたヌクレオシドからなる5'ウイングセグメント、及び3個の連結されたヌクレオシドからなる3'ウイングセグメント

を含み、前記ギャップセグメントは前記5'ウイングセグメントと前記3'ウイングセグメントの間に配置されており、前記5'ウイングセグメントは2'-O-メトキシエチル糖、2'-O-メトキシエチル糖、及びcEt糖を5'3'方向に含み、前記3'ウイングセグメントはcEt糖、cEt糖、及び2'-O-メトキシエチル糖を5'3'方向に含み、各ヌクレオシド間連結部はホスホロチオエート連結部であり、かつ各シトシンが5-メチルシトシンである、前記化合物。

〔項22〕

修飾オリゴヌクレオチドと共役基とを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドが、配列番号549に示す配列からなる核酸塩基配列を有する16個の連結されたヌクレオシドからなり、前記修飾オリゴヌクレオチドが

10個の連結されたデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、3個の連結されたヌクレオシドからなる5'ウイングセグメント、及び3個の連結されたヌクレオシドからなる3'ウイングセグメント

を含み、前記ギャップセグメントは前記5'ウイングセグメントと前記3'ウイングセグメントの間に配置されており、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドはcEt糖を含み、各ヌクレオシド間連結部はホスホロチオエート連結部であり、かつ各シトシンが5-メチルシトシンである、前記化合物。

40

〔項23〕

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号1または配列番号2に少なくとも80%、85%、90%、95%または100%相補的である、請求項1～22のいずれか一項に記載の化合物。

〔項24〕

前記修飾オリゴヌクレオチドが、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間連結部、少なくとも

50

も1つの修飾糖、または少なくとも1つの修飾核酸塩基を含む、請求項1～23のいずれか一項に記載の化合物。

〔項25〕

前記修飾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、請求項24に記載の化合物。

〔項26〕

前記修飾オリゴヌクレオチドが、少なくとも1つのホスホジエステルヌクレオシド間連結部を含む、請求項25に記載の化合物。

〔項27〕

前記修飾オリゴヌクレオチドが、少なくとも2つのホスホジエステルヌクレオシド間連結部を含む、請求項25に記載の化合物。

10

〔項28〕

前記修飾オリゴヌクレオチドが、少なくとも3つのホスホジエステルヌクレオシド間連結部を含む、請求項25に記載の化合物。

〔項29〕

前記修飾オリゴヌクレオチドが、少なくとも4つのホスホジエステルヌクレオシド間連結部を含む、請求項25に記載の化合物。

〔項30〕

前記修飾オリゴヌクレオチドが、少なくとも5つのホスホジエステルヌクレオシド間連結部を含む、請求項25に記載の化合物。

20

〔項31〕

前記修飾オリゴヌクレオチドが、少なくとも6つのホスホジエステルヌクレオシド間連結部を含む、請求項25に記載の化合物。

〔項32〕

前記修飾オリゴヌクレオチドが、少なくとも7つのホスホジエステルヌクレオシド間連結部を含む、請求項25に記載の化合物。

〔項33〕

前記修飾オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシド間連結部が、ホスホジエステルヌクレオシド間連結部及びホスホロチオエートヌクレオシド間連結部から選択される、請求項26～32のいずれか一項に記載の化合物。

30

〔項34〕

前記修飾オリゴヌクレオチド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を含む、請求項25に記載の化合物。

〔項35〕

前記修飾糖が二環式糖である、請求項24～34のいずれか一項に記載の化合物。

〔項36〕

前記二環式糖が、 $4' - (CH_2) - O - 2' (LNA)$ 、 $4' - (CH)_2 - O - 2' (ENA)$ 、及び $4' - CH(CH_3) - O - 2' (cet)$ からなる群より選択される、請求項35に記載の化合物。

〔項37〕

前記修飾糖が $2' - O -$ メトキシエチルである、請求項24～34のいずれか一項に記載の化合物。

40

〔項38〕

前記修飾核酸塩基が5-メチルシトシンである、請求項24～37のいずれか一項に記載の化合物。

〔項39〕

前記修飾オリゴヌクレオチドが

- (a) 連結されたデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント、
- (b) 連結されたヌクレオシドからなる5'ウイングセグメント、及び
- (c) 連結されたヌクレオシドからなる3'ウイングセグメント；

50

を含み、前記ギャップセグメントが前記5'ウイングセグメント及び前記3'ウイングセグメントに直接隣り合うように、前記5'ウイングセグメントと前記3'ウイングセグメントの間に配置され、各ウイングセグメントの各ヌクレオシドが修飾糖を含む、請求項1~38のいずれか一項に記載の化合物。

〔項40〕

一本鎖である、請求項1~39のいずれか一項に記載の化合物。

〔項41〕

二本鎖である、請求項1~39のいずれか一項に記載の化合物。

〔項42〕

リボヌクレオチドを含む、請求項1~41のいずれか一項に記載の化合物。

10

〔項43〕

デオキシリボヌクレオチドを含む、請求項1~41のいずれか一項に記載の化合物。

〔項44〕

前記修飾オリゴヌクレオチドが10~30個の連結されたヌクレオシドからなる、請求項1~43のいずれか一項に記載の化合物。

〔項45〕

前記修飾オリゴヌクレオチドが12~30個の連結されたヌクレオシドからなる、請求項1~43のいずれか一項に記載の化合物。

〔項46〕

前記修飾オリゴヌクレオチドが15~30個の連結されたヌクレオシドからなる、請求項1~43のいずれか一項に記載の化合物。

20

〔項47〕

ISIS532770、ISIS532800、ISIS532809、ISIS588540、ISIS588544、ISIS588548、ISIS588550、ISIS588553、ISIS588555、ISIS588848、またはISIS594430と、共役基とからなる化合物。

〔項48〕

前記共役基が前記修飾オリゴヌクレオチドの5'端で前記修飾オリゴヌクレオチドに連結されている、請求項1~47のいずれか一項に記載の化合物。

〔項49〕

前記共役基が前記修飾オリゴヌクレオチドの3'端で前記修飾オリゴヌクレオチドに連結されている、請求項1~47のいずれか一項に記載の化合物。

30

〔項50〕

前記共役基が厳密に1つのリガンドを含む、請求項1~49のいずれか一項に記載の化合物。

〔項51〕

前記共役基が厳密に2つのリガンドを含む、請求項1~49のいずれか一項に記載の化合物。

〔項52〕

前記共役基が3つ以上のリガンドを含む、請求項1~49のいずれか一項に記載の化合物。

40

〔項53〕

前記共役基が厳密に3つのリガンドを含む、請求項1~49のいずれか一項に記載の化合物。

〔項54〕

各リガンドが多糖、修飾多糖、マンノース、ガラクトース、マンノース誘導体、ガラクトース誘導体、D-マンノピラノース、L-マンノピラノース、D-アラビノース、L-ガラクトース、D-キシロフラノース、L-キシロフラノース、D-グルコース、L-グルコース、D-ガラクトース、L-ガラクトース、 α -D-マンノフラノース、 β -D-マンノフラノース、 α -D-マンノピラノース、 β -D-マンノピラノース、 α -D-グルコピラノース、 β -D-グルコピラノース、 α -D-グルコフラノース、 β -D-グルコ

50

フラノース、 - D - フルクトフラノース、 - D - フルクトピラノース、 - D - ガラクトピラノース、 - D - ガラクトピラノース、 - D - ガラクトフラノース、 - D - ガラクトフラノース、グルコサミン、シアル酸、 - D - ガラクトサミン、N - アセチルガラクトサミン、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、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、N - グリコロイル - ノイラミン酸、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、4 - チオ - - D - ガラクトピラノース、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 - グルコ - ヘプトピラノシド、2 , 5 - アンヒドロ - D - アロノニトリル、リボース、D - リボース、D - 4 - チオリボース、L - リボース、L - 4 - チオリボースのなかから選択される、請求項 5 0 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の化合物。

10

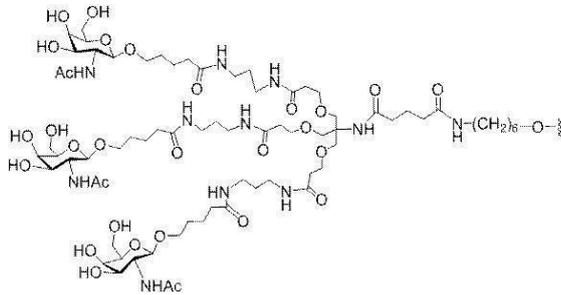
〔項 5 5〕

各リガンドが N - アセチルガラクトサミンである、請求項 5 4 に記載の化合物。

〔項 5 6〕

前記共役基が

【化 1 0 0 1】



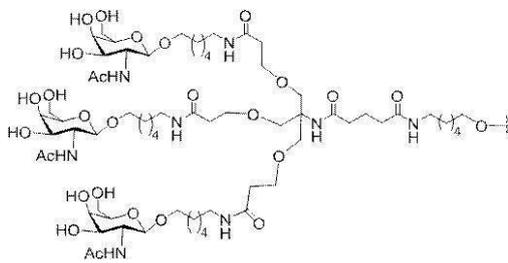
20

を含む、請求項 1 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 5 7〕

前記共役基が

【化 1 0 0 2】



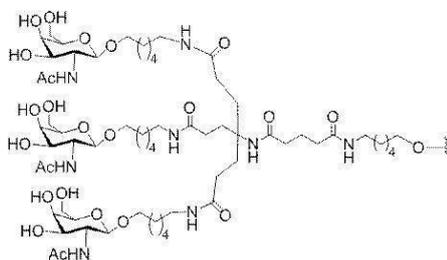
30

を含む、請求項 1 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 5 8〕

前記共役基が

【化 1 0 0 3】



40

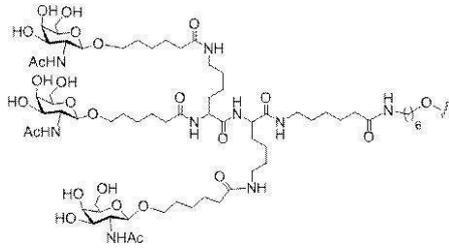
50

を含む、請求項 1 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 5 9]

前記共役基が

【化 1 0 0 4】



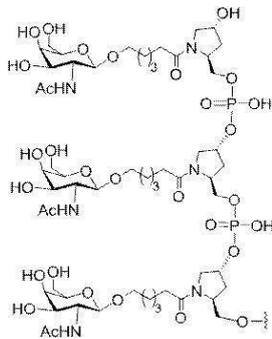
10

を含む、請求項 1 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 6 0]

前記共役基が

【化 1 0 0 5】



20

を含む、請求項 1 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の化合物。

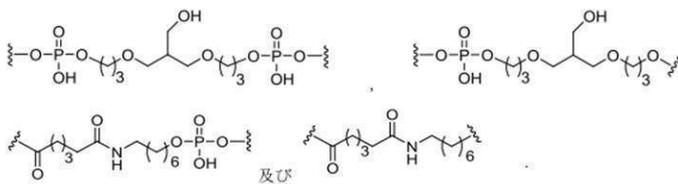
[項 6 1]

前記共役基が少なくとも 1 つのリン連結基または中性連結基を含む、請求項 4 9 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 6 2]

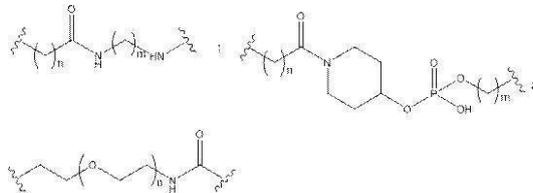
前記共役基が

【化 1 0 0 6】



30

【化 1 0 0 7】



40

;
[式中、

n は 1 ~ 1 2 であり、かつ

m は 1 ~ 1 2 である]

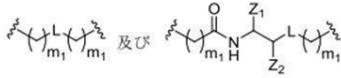
50

のなかから選択される構造を含む、請求項 1 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 6 3]

前記共役基が、

【化 1 0 0 8】



[式中、

L は、リン連結基または中性連結基のどちらかであり、

Z₁ は、C(=O)O-R₂であり、

Z₂ は、H、C₁-C₆アルキルまたは置換C₁-C₆アルキルであり、

R₂ は、H、C₁-C₆アルキルまたは置換C₁-C₆アルキルであり、かつ

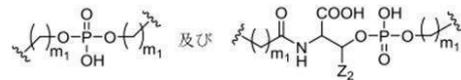
各 m₁ は、独立して、0 ~ 20 であって、各テザーにつき少なくとも 1 つの m₁ は 0 より大きい]

のなかから選択される構造を有するテザーを有する、請求項 1 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 6 4]

前記共役基が、

【化 1 0 0 9】



[式中、

Z₂ は、H または C H₃ であり、かつ

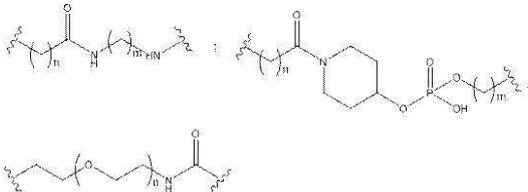
各 m₁ は、独立して、0 ~ 20 であって、各テザーにつき少なくとも 1 つの m₁ は 0 より大きい]

のなかから選択される構造を有するテザーを有する、請求項 6 3 に記載の化合物。

[項 6 5]

前記共役基が

【化 1 0 0 1 0】



[式中、

n は 1 ~ 1 2 であり、かつ

m は 1 ~ 1 2 である]

のなかから選択される構造を有するテザーを有する、請求項 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の化合物。

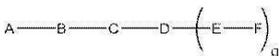
[項 6 6]

前記共役基が、前記修飾オリゴヌクレオチドに共有結合で取り付けられている、請求項 1 ~ 6 5 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 6 7]

式：

【化 1 0 0 1 1】



10

20

30

40

50

[式中、

A は前記修飾オリゴヌクレオチドであり、

B は前記切断可能部分であり、

C は前記共役リンカーであり、

D は前記分岐基であり、

各 E はテザーであり、

各 F はリガンドであり、かつ

q は 1 と 5 の間の整数である]

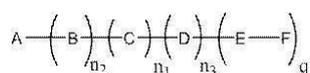
によって表される構造を有する、請求項 1 ~ 66 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 68]

10

式：

【化 10012】



[式中、

A は前記修飾オリゴヌクレオチドであり、

B は前記切断可能部分であり、

C は前記共役リンカーであり、

D は前記分岐基であり、

各 E はテザーであり、

各 F はリガンドであり、

各 n は独立して 0 または 1 であり、かつ

q は 1 と 5 の間の整数である]

によって表される構造を有する、請求項 1 ~ 66 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 69]

20

式：

【化 10013】



[式中、

A は前記修飾オリゴヌクレオチドであり、

B は前記切断可能部分であり、

C は前記共役リンカーであり、

各 E はテザーであり、

各 F はリガンドであり、かつ

q は 1 と 5 の間の整数である]

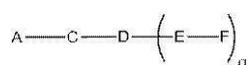
によって表される構造を有する、請求項 1 ~ 66 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 70]

40

式：

【化 10014】



[式中、

A は前記修飾オリゴヌクレオチドであり、

C は前記共役リンカーであり、

D は前記分岐基であり、

各 E はテザーであり、

50

各 F はリガンドであり、かつ

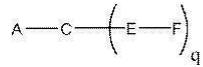
q は 1 と 5 の間の整数である]

によって表される構造を有する、請求項 1 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 7 1]

式：

【化 1 0 0 1 5】



[式中、

A は前記修飾オリゴヌクレオチドであり、

C は前記共役リンカーであり、

各 E はテザーであり、

各 F はリガンドであり、かつ

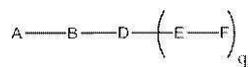
q は 1 と 5 の間の整数である]

によって表される構造を有する、請求項 1 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 7 2]

式：

【化 1 0 0 1 6】



[式中、

A は前記修飾オリゴヌクレオチドであり、

B は前記切断可能部分であり、

D は前記分岐基であり、

各 E はテザーであり、

各 F はリガンドであり、かつ

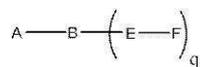
q は 1 と 5 の間の整数である]

によって表される構造を有する、請求項 1 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 7 3]

式：

【化 1 0 0 1 7】



[式中、

A は前記修飾オリゴヌクレオチドであり、

B は前記切断可能部分であり、

各 E はテザーであり、

各 F はリガンドであり、かつ

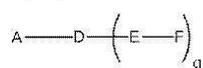
q は 1 と 5 の間の整数である]

によって表される構造を有する、請求項 1 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 7 4]

式：

【化 1 0 0 1 8】



[式中、

10

20

30

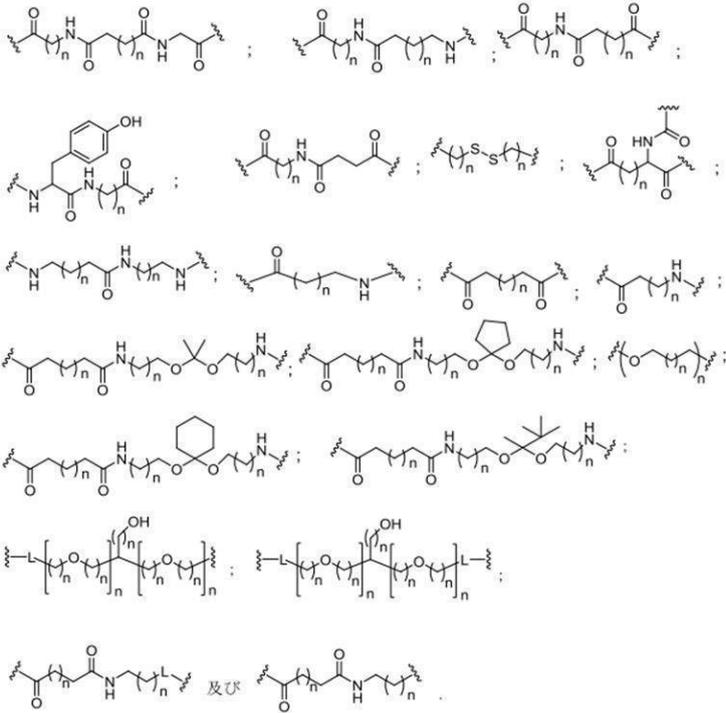
40

50

A は前記修飾オリゴヌクレオチドであり、
 D は前記分岐基であり、
 各 E はテザーであり、
 各 F はリガンドであり、かつ
 q は 1 と 5 の間の整数である]
 によって表される構造を有する、請求項 1 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の化合物。
 [項 7 5]

前記共役リンカーが

【化 1 0 0 1 9】



10

20

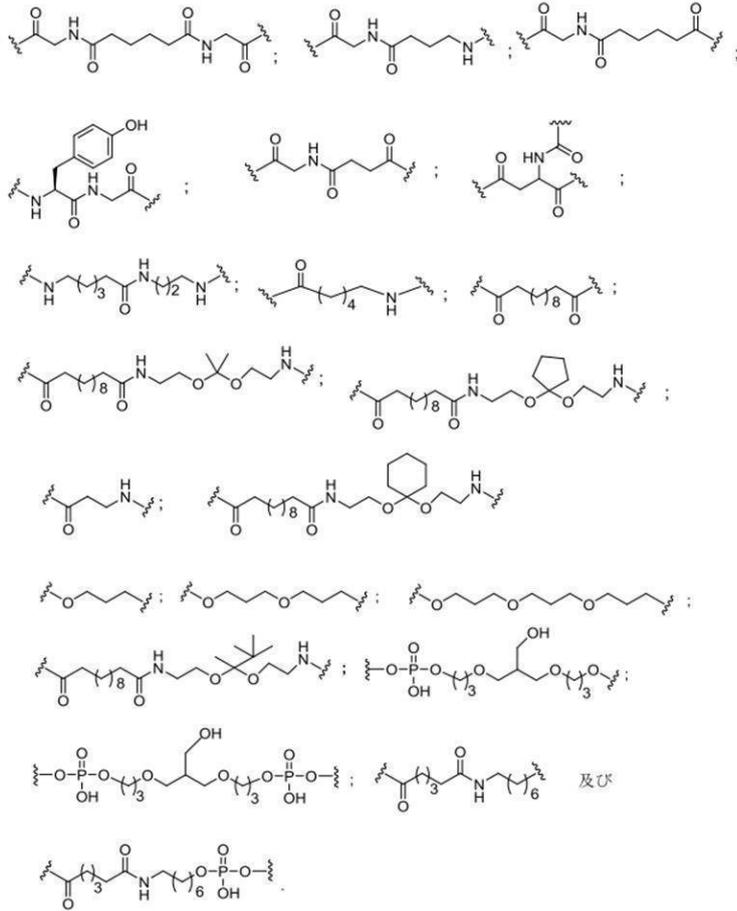
[式中、
 各 L は、独立して、リン連結基または中性連結基であり、かつ
 各 n は、独立して、1 ~ 20 である]
 のなかから選択される構造を有する、請求項 1 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の化合物。 [項 7 6]
 前記共役リンカーが

30

40

50

【化 1 0 0 2 0】

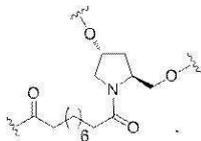


10

のなかから選択される構造を有する、請求項 1 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の化合物。〔項 7 7〕

前記共役リンカーが以下の構造を有する、請求項 1 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の化合物：

【化 1 0 0 2 1】

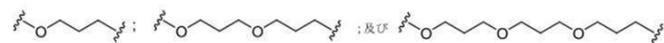


30

〔項 7 8〕

前記共役リンカーが

【化 1 0 0 2 2】



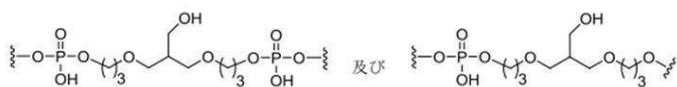
40

のなかから選択される構造を有する、請求項 1 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 7 9〕

前記共役リンカーが

【化 1 0 0 2 3】



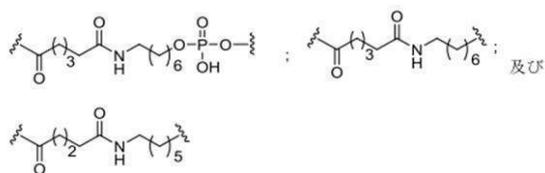
のなかから選択される構造を有する、請求項 1 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 8 0〕

50

前記共役リンカーが

【化 1 0 0 2 4】



のなかから選択される構造を有する、請求項 1 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 8 1〕

10

前記共役リンカーがピロリジンを含む、請求項 1 ~ 8 0 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 8 2〕

前記共役リンカーがピロリジンを含まない、請求項 1 ~ 8 0 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 8 3〕

前記共役リンカーが P E G を含む、請求項 1 ~ 8 2 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 8 4〕

前記共役リンカーがアミドを含む、請求項 1 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 8 5〕

前記共役リンカーが少なくとも 2 つのアミドを含む、請求項 1 ~ 8 4 のいずれか一項に記載の化合物。

20

〔項 8 6〕

前記共役リンカーがアミドを含まない、請求項 1 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 8 7〕

前記共役リンカーがポリアミドを含む、請求項 1 ~ 8 6 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 8 8〕

前記共役リンカーがアミンを含む、請求項 1 ~ 8 7 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 8 9〕

前記共役リンカーが 1 つ以上のジスルフィド結合を含む、請求項 1 ~ 8 8 のいずれか一項に記載の化合物。

30

〔項 9 0〕

前記共役リンカーがタンパク質結合部分を含む、請求項 1 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 9 1〕

前記タンパク質結合部分が脂質を含む、請求項 9 0 に記載の化合物。

〔項 9 2〕

前記タンパク質結合部分が、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1 - ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1, 3 - ビス - O (ヘキサデシル) グリセロール、グラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1, 3 - プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O 3 - (オレオイル) リトコール酸、O 3 - (オレオイル) コレン酸、ジメトキシトリチル、またはフェノキサジン)、ビタミン (例えば葉酸、ビタミン A、ビタミン E、ビオチン、ピリドキサル)、ペプチド、炭水化物 (例えば単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、多糖)、エンドソーム溶解成分、ステロイド (例えばウバオール、ヘシゲニン (h e c i g e n i n)、ジオスゲニン)、テルペン (例えばトリテルペン、例えばサルササポゲニン、フリーデリン、エピフリーデラノール誘導体化リトコール酸)、またはカチオン性脂質のなかから選択される、請求項 9 0 に記載の化合物。

40

〔項 9 3〕

前記タンパク質結合部分が、C 1 6 ~ C 2 2 長鎖飽和または不飽和脂肪酸、コレステロール、コール酸、ビタミン E、アダマンタンまたは 1 - ペンタフルオロプロピルのなかから

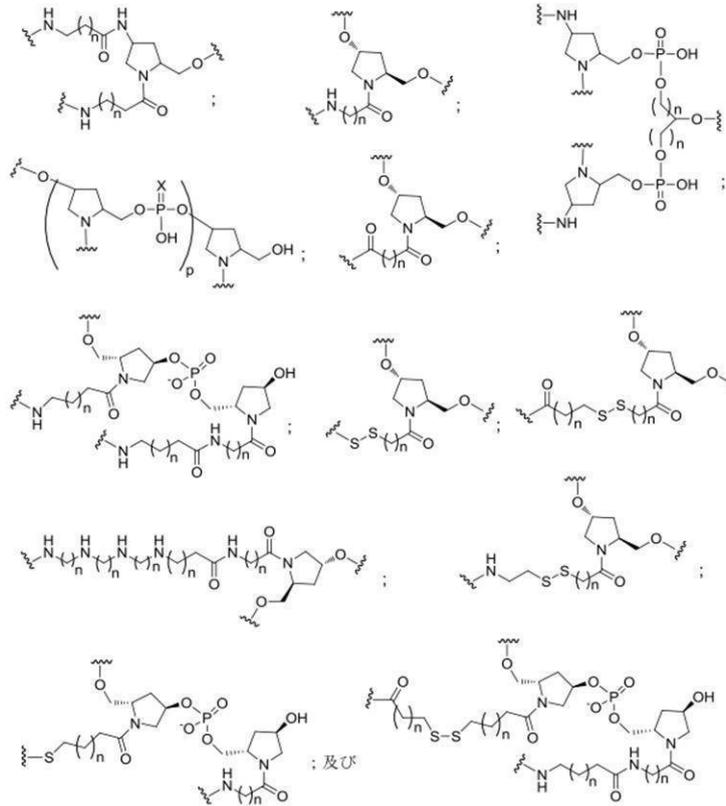
50

選択される、請求項 9 0 に記載の化合物。

[項 9 4]

前記共役リンカーが

【化 1 0 0 2 5】



10

20

[式中、各 n は、独立して、1 ~ 2 0 であり、かつ p は 1 ~ 6 である]

のなかから選択される構造を有する、請求項 1 ~ 9 3 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 9 5]

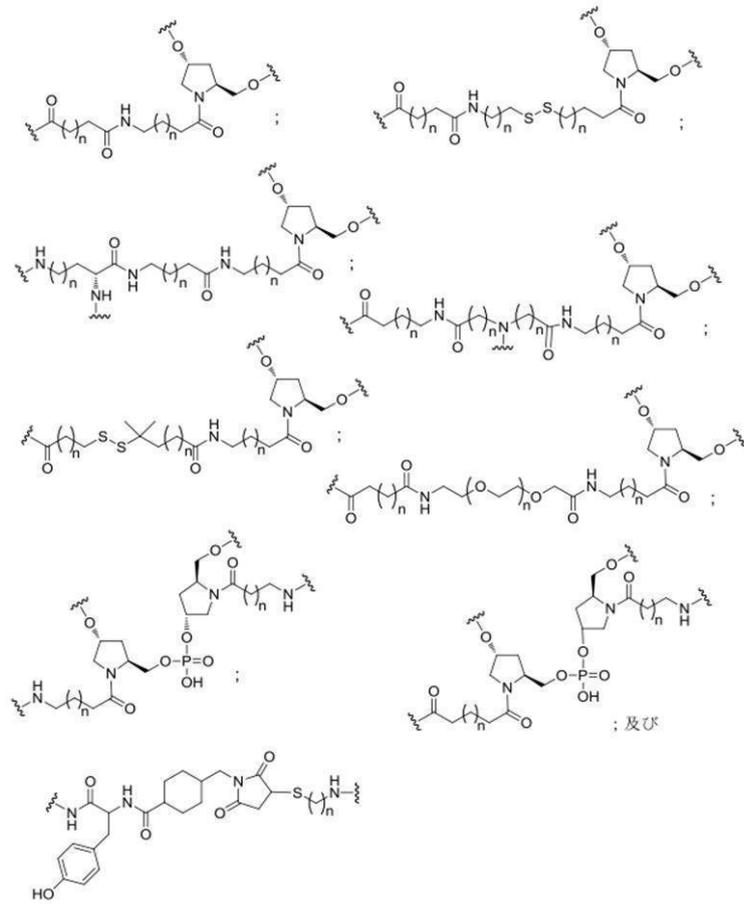
前記共役リンカーが

30

40

50

【化 1 0 0 2 6】



10

20

[式中、各 n は、独立して、1 ~ 20 である]

のなかから選択される構造を有する、請求項 1 ~ 94 のいずれか一項に記載の化合物。〔項 96〕

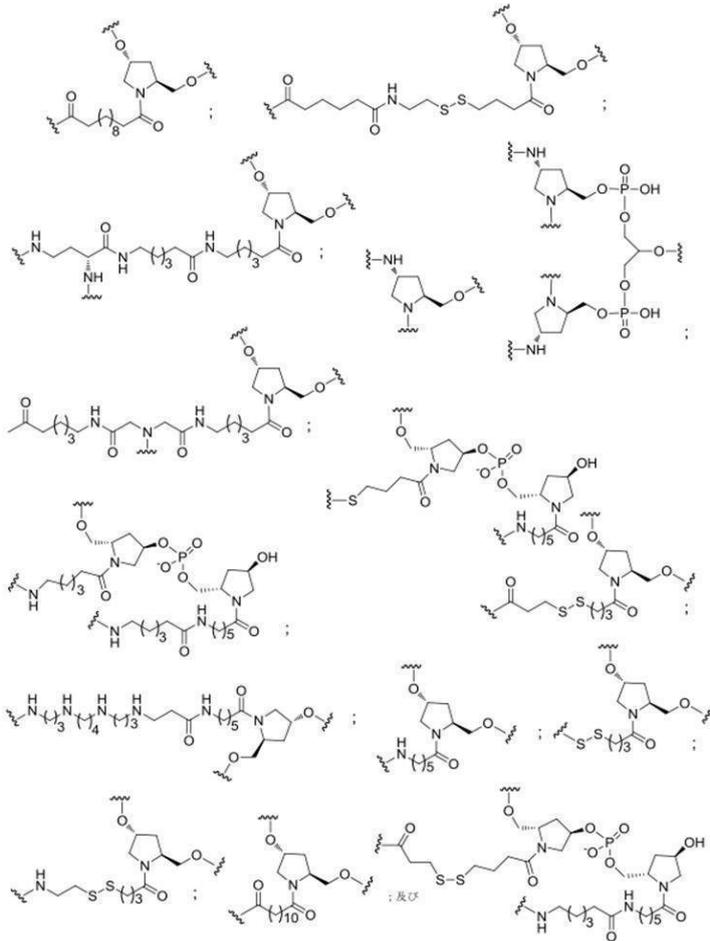
前記共役リンカーが

30

40

50

【化 1 0 0 2 7】



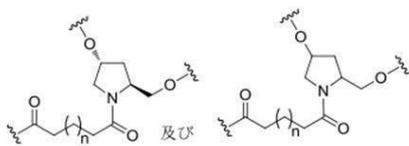
10

のなかから選択される構造を有する、請求項 1 ~ 9 4 のいずれか一項に記載の化合物。〔項 9 7〕

前記共役リンカーが

30

【化 1 0 0 2 8】



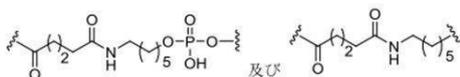
[式中、 n は 1 ~ 2 0 である]

のなかから選択される構造を有する、請求項 1 ~ 9 4 のいずれか一項に記載の化合物。〔項 9 8〕

前記共役リンカーが

40

【化 1 0 0 2 9】

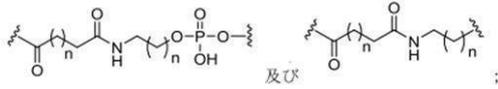


のなかから選択される構造を有する、請求項 1 ~ 9 4 のいずれか一項に記載の化合物。〔項 9 9〕

前記共役リンカーが

50

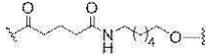
【化 1 0 0 3 0】



[式中、各 n は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、または7である]
 のなかから選択される構造を有する、請求項 1 ~ 9 4 のいずれか一項に記載の化合物。〔
 項 1 0 0〕

前記共役リンカーが以下の構造を有する、請求項 1 ~ 9 4 のいずれか一項に記載の化合物：

【化 1 0 0 3 1】

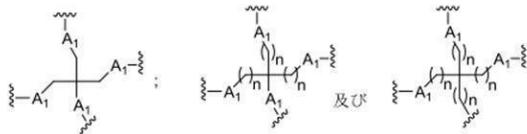


10

〔 項 1 0 1 〕

前記分岐基が以下の構造のうちの一つを有する、請求項 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載
 の化合物：

【化 1 0 0 3 2】



20

[式中、

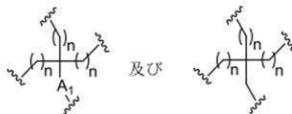
各 A_1 は、独立して、O、S、C = O または NH であり、かつ

各 n は、独立して、1 ~ 2 0 である]。

〔 項 1 0 2 〕

前記分岐基が以下の構造のうちの一つを有する、請求項 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載
 の化合物：

【化 1 0 0 3 3】



30

[式中、

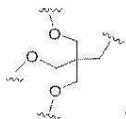
各 A_1 は、独立して、O、S、C = O または NH であり、かつ

各 n は、独立して、1 ~ 2 0 である]。

〔 項 1 0 3 〕

前記分岐基が以下の構造を有する、請求項 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の化合物：

【化 1 0 0 3 4】

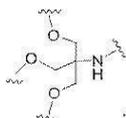


40

〔 項 1 0 4 〕

前記分岐基が以下の構造を有する、請求項 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の化合物：

【化 1 0 0 3 5】



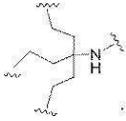
50

。

〔項 105〕

前記分岐基が以下の構造を有する、請求項 1 ~ 100 のいずれか一項に記載の化合物：

【化 10036】

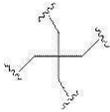


。

〔項 106〕

前記分岐基が以下の構造を有する、請求項 1 ~ 100 のいずれか一項に記載の化合物：

【化 10037】



10

。

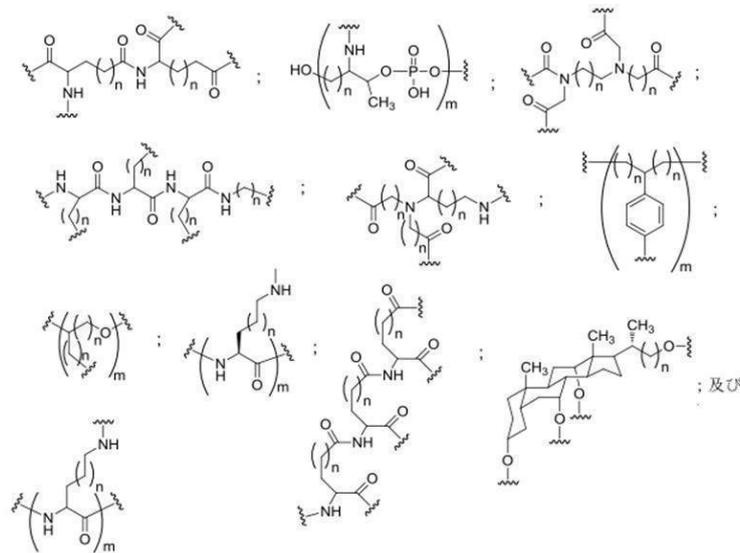
〔項 107〕

前記分岐基がエーテルを含む、請求項 1 ~ 100 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 108〕

前記分岐基が以下の構造を有する、請求項 1 ~ 100 のいずれか一項に記載の化合物：

【化 10038】



20

30

〔各 n は、独立して、1 ~ 20 であり、かつ m は 2 ~ 6 である〕。

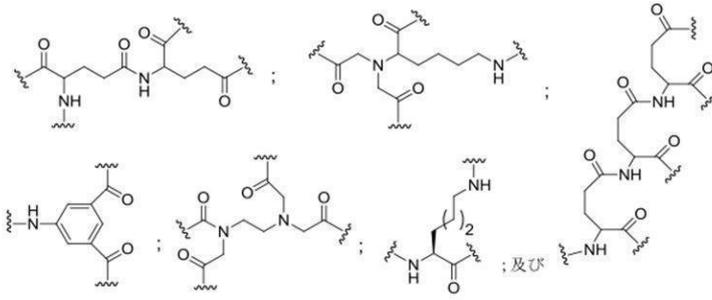
〔項 109〕

前記分岐基が以下の構造を有する、請求項 1 ~ 100 のいずれか一項に記載の化合物：

40

50

【化10039】

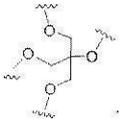


10

○
〔項110〕

前記分岐基が以下の構造を有する、請求項1～100のいずれか一項に記載の化合物：

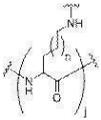
【化10040】



○
〔項111〕

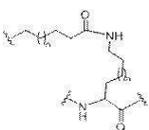
前記分岐基が

【化10041】



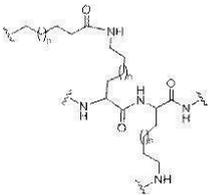
20

、
【化10042】



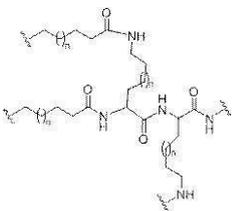
30

、
【化10043】



40

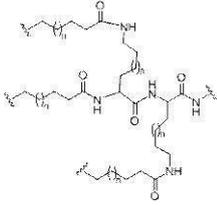
、
【化10044】



、または

50

【化10045】



[式中、

各 j は 1 ~ 3 の整数であり、かつ

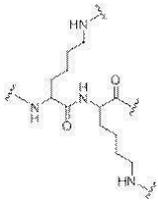
各 n は 1 ~ 20 の整数である]

を含む、請求項 1 ~ 100 のいずれか一項に記載の化合物。

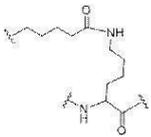
[項 112]

前記分岐基が

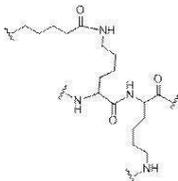
【化10046】



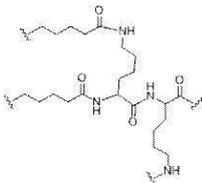
【化10047】



【化10048】



【化10049】



、または

10

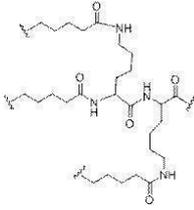
20

30

40

50

【化 1 0 0 5 0】

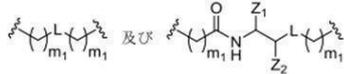


を含む、請求項 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 1 1 3〕

各テザーが

【化 1 0 0 5 1】



[式中、

L は、リン連結基及び中性連結基から選択され、

Z₁ は、C(=O)O-R₂ であり、

Z₂ は、H、C₁-C₆ アルキルまたは置換 C₁-C₆ アルキルであり、

R₂ は、H、C₁-C₆ アルキルまたは置換 C₁-C₆ アルキルであり、かつ

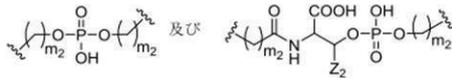
各 m₁ は、独立して、0 ~ 20 であって、各テザーにつき少なくとも 1 つの m₁ は 0 より大きい]

のなかから選択される、請求項 1 ~ 1 1 2 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 1 1 4〕

各テザーが

【化 1 0 0 5 2】



[式中、

Z₂ は、H または C H₃ であり、

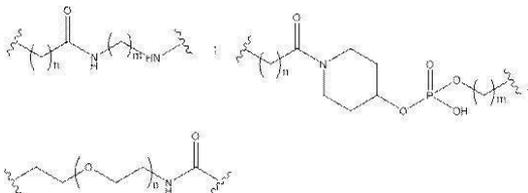
各 m₂ は、独立して、0 ~ 20 であって、各テザーにつき少なくとも 1 つの m₂ は 0 より大きい]

のなかから選択される、請求項 1 ~ 1 1 2 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 1 1 5〕

各テザーが

【化 1 0 0 5 3】



[式中、

n は 1 ~ 12 であり、かつ

m は 1 ~ 12 である]

のなかから選択される、請求項 1 ~ 1 1 2 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 1 1 6〕

少なくとも 1 つのテザーがエチレングリコールを含む、請求項 1 ~ 1 1 2 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 1 1 7〕

10

20

30

40

50

少なくとも1つのテザーがアミドを含む、請求項1～116のいずれか一項に記載の化合物。

〔項118〕

少なくとも1つのテザーがポリアミドを含む、請求項1～117のいずれか一項に記載の化合物。

〔項119〕

少なくとも1つのテザーがアミンを含む、請求項1～118のいずれか一項に記載の化合物。

〔項120〕

少なくとも2つのテザーが互いに異なる、請求項1～119のいずれか一項に記載の化合物。

10

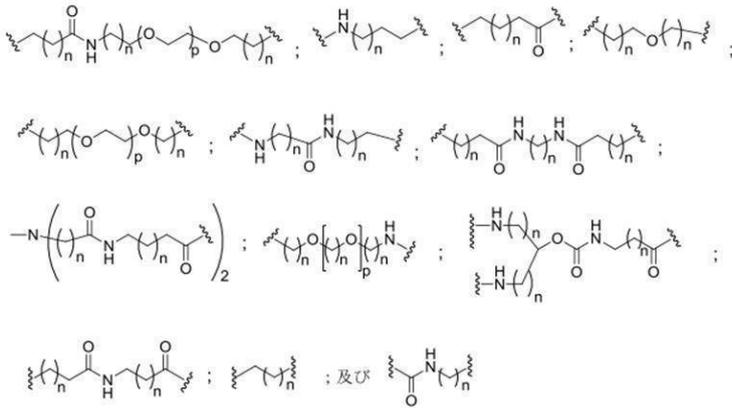
〔項121〕

すべてのテザーが互いに同じである、請求項1～120のいずれか一項に記載の化合物。

〔項122〕

各テザーが

【化10054】



20

〔式中、

各nは、独立して、1～20であり、かつ

30

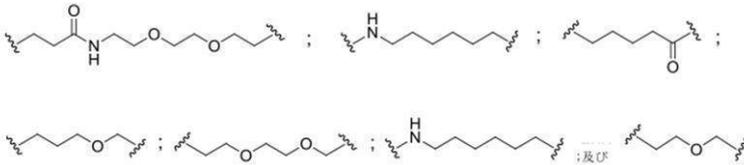
各pは1～約6である〕

のなかから選択される、請求項1～121のいずれか一項に記載の化合物。

〔項123〕

各テザーが

【化10055】



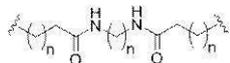
40

のなかから選択される、請求項1～122のいずれか一項に記載の化合物。

〔項124〕

各テザーが以下の構造を有する、請求項1～123のいずれか一項に記載の化合物：

【化10056】



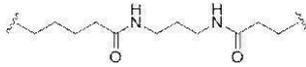
〔式中、各nは、独立して、1～20である〕。

〔項125〕

50

各テザーが以下の構造を有する、請求項 1 ~ 1 2 4 のいずれか一項に記載の化合物：

【化 1 0 0 5 7】

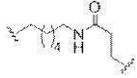


。

〔項 1 2 6〕

前記テザーが、

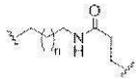
【化 1 0 0 5 8】



10

、または

【化 1 0 0 5 9】



〔式中、各 n は、独立して、0、1、2、3、4、5、6、または 7 である〕

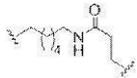
のなかから選択される構造を有する、請求項 1 ~ 1 2 5 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 1 2 7〕

20

前記テザーが構造：

【化 1 0 0 6 0】



を有する、請求項 1 2 6 に記載の化合物。

〔項 1 2 8〕

n が 3 である、請求項 1 2 6 に記載の化合物。

〔項 1 2 9〕

前記リガンドがガラクトースである、請求項 1 ~ 1 2 8 のいずれか一項に記載の化合物。

30

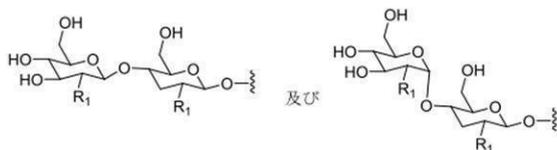
〔項 1 3 0〕

前記リガンドがマンノース - 6 - ホスフェートである、請求項 1 ~ 1 2 8 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 1 3 1〕

各リガンドが、

【化 1 0 0 6 1】



40

〔式中、各 R₁ は OH 及び NHCOOH から選択される〕

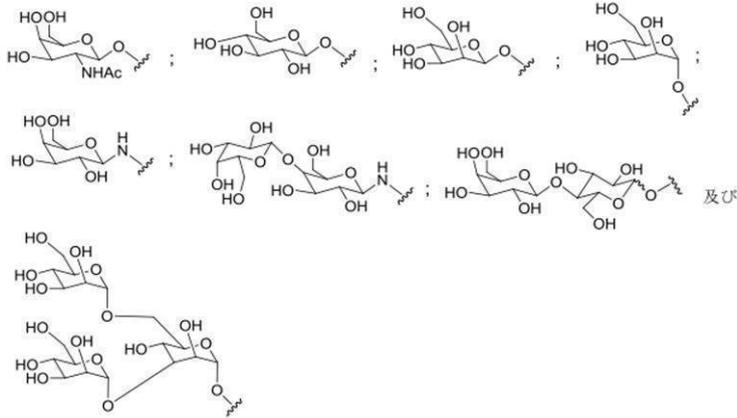
のなかから選択される、請求項 1 ~ 1 2 8 のいずれか一項に記載の化合物。

〔項 1 3 2〕

各リガンドが、

50

【化10062】



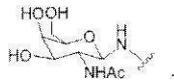
10

のなかから選択される、請求項1～128のいずれか一項に記載の化合物。

〔項133〕

各リガンドが以下の構造を有する、請求項1～128のいずれか一項に記載の化合物：

【化10063】



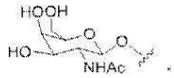
20

。

〔項134〕

各リガンドが以下の構造を有する、請求項124～127のいずれか一項に記載の共役アンチセンス化合物：

【化10064】



30

。

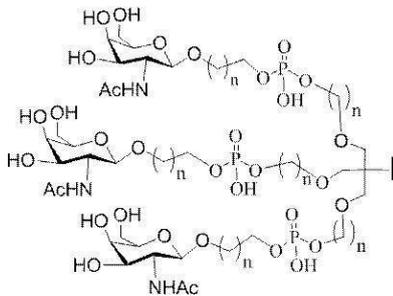
〔項135〕

前記共役基が細胞ターゲティング部分を含む、請求項1～134のいずれか一項に記載の化合物。

〔項136〕

前記共役基が以下の構造を有する細胞ターゲティング部分を含む、請求項135に記載の化合物：

【化10065】



40

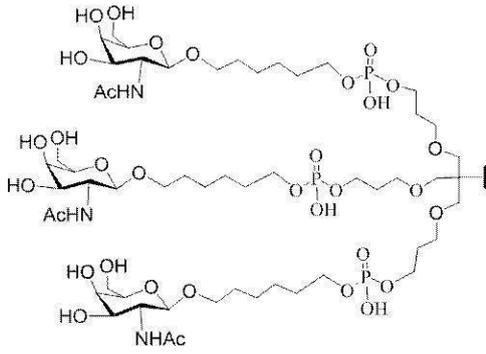
[式中、各nは、独立して、1～20である]。

〔項137〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項135に記載の化合物：

50

【化 1 0 0 6 6】

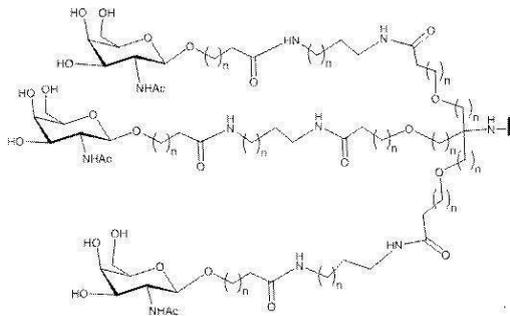


10

〔 項 1 3 8 〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項 1 3 5 に記載の化合物：

【化 1 0 0 6 7】



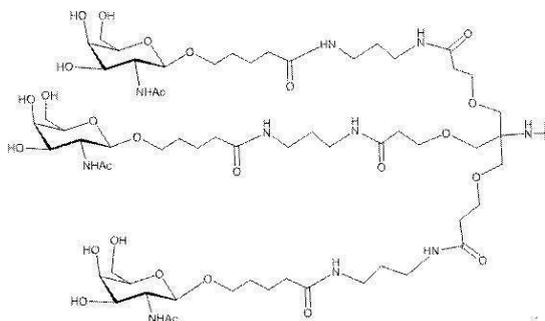
20

[式中、各 n は、独立して、1 ~ 2 0 である]。

〔 項 1 3 9 〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項 1 3 5 に記載の化合物：

【化 1 0 0 6 8】



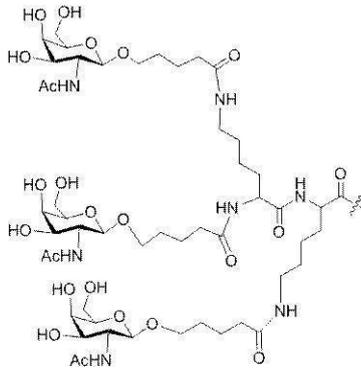
30

〔 項 1 4 0 〕

前記細胞ターゲティング部分が、

40

【化 1 0 0 6 9】



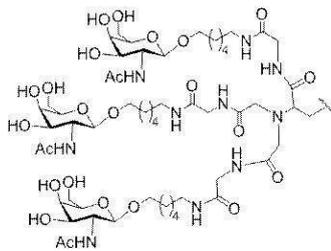
10

を含む、請求項 1 3 5 に記載の化合物。

〔 項 1 4 1 〕

前記細胞ターゲティング部分が

【化 1 0 0 7 0】



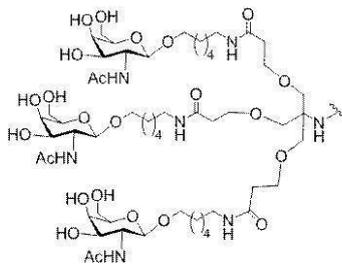
20

を含む、請求項 1 3 5 に記載の化合物。

〔 項 1 4 2 〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項 1 3 5 に記載の化合物：

【化 1 0 0 7 1】

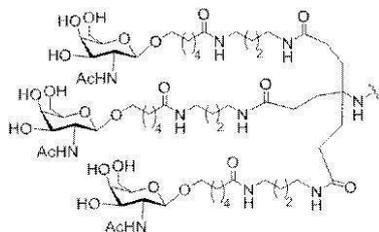


30

。〔 項 1 4 3 〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項 1 3 5 に記載の化合物：

【化 1 0 0 7 2】



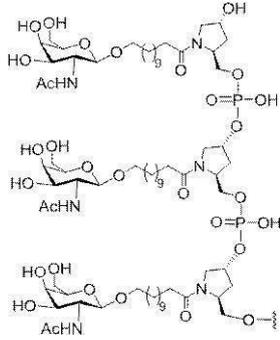
40

。〔 項 1 4 4 〕

前記細胞ターゲティング部分が

50

【化10073】



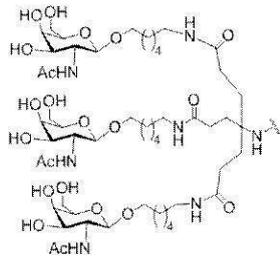
10

を含む、請求項135に記載の化合物。

〔項145〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項135に記載の化合物：

【化10074】

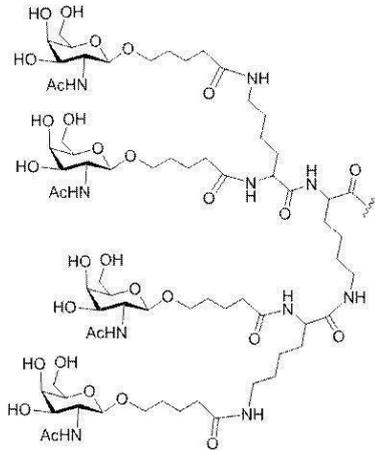


20

〔項146〕

前記細胞ターゲティング部分が

【化10075】



30

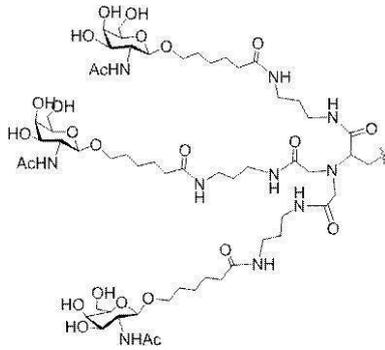
を含む、請求項135に記載の化合物。

〔項147〕

前記細胞ターゲティング部分が

40

【化 1 0 0 7 6】



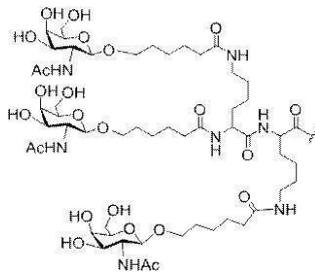
10

を含む、請求項 1 3 5 に記載の化合物。

〔 項 1 4 8 〕

前記細胞ターゲティング部分が

【化 1 0 0 7 7】



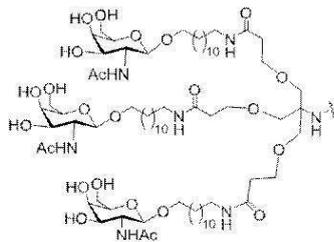
20

を含む、請求項 1 3 5 に記載の化合物。

〔 項 1 4 9 〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項 1 3 5 に記載の化合物：

【化 1 0 0 7 8】

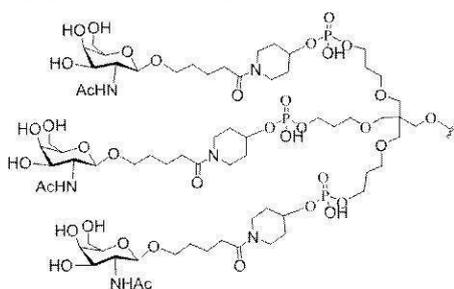


30

。〔 項 1 5 0 〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項 1 3 5 に記載の化合物：

【化 1 0 0 7 9】



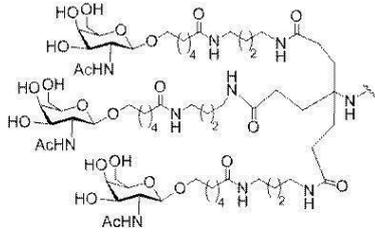
40

。〔 項 1 5 1 〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項 1 3 5 に記載の化合物：

50

【化10080】

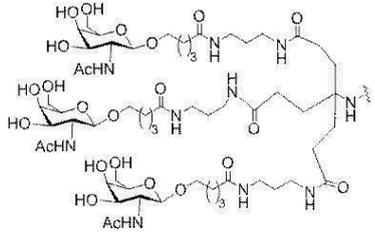


。

〔項152〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項135に記載の化合物：

【化10081】

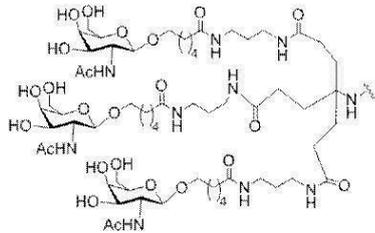


。

〔項153〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項135に記載の化合物：

【化10082】

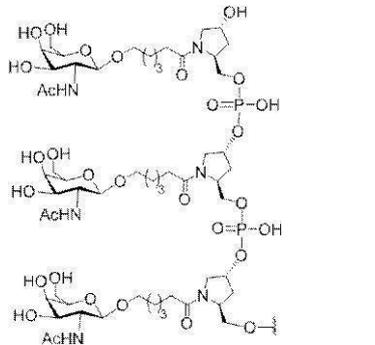


。

〔項154〕

前記細胞ターゲティング部分が

【化10083】



を含む、請求項135に記載の化合物。

〔項155〕

前記細胞ターゲティング部分が

10

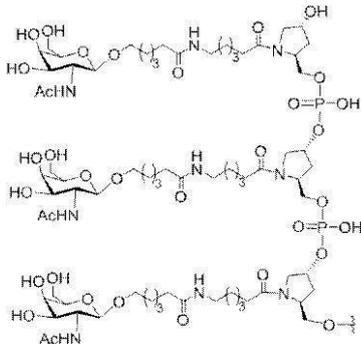
20

30

40

50

【化 1 0 0 8 4】



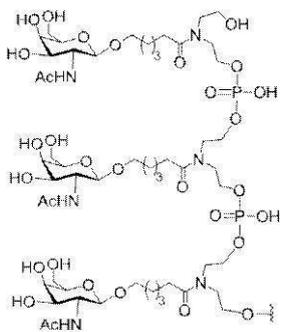
10

を含む、請求項 1 3 5 に記載の化合物。

〔 項 1 5 6 〕

前記細胞ターゲティング部分が

【化 1 0 0 8 5】



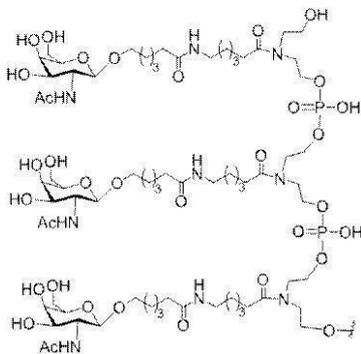
20

を含む、請求項 1 3 5 に記載の化合物。

〔 項 1 5 7 〕

前記細胞ターゲティング部分が

【化 1 0 0 8 6】



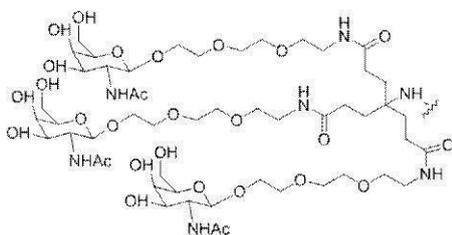
30

を含む、請求項 1 3 5 に記載の化合物。

〔 項 1 5 8 〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項 1 3 5 に記載の化合物：

【化 1 0 0 8 7】



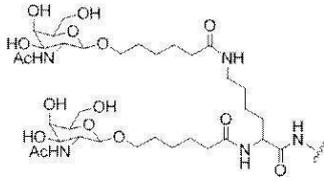
50

。

〔項 1 5 9〕

前記細胞ターゲティング部分が

【化 1 0 0 8 8】



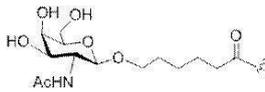
10

を含む、請求項 1 3 5 に記載の化合物。

〔項 1 6 0〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項 1 3 5 に記載の化合物：

【化 1 0 0 8 9】

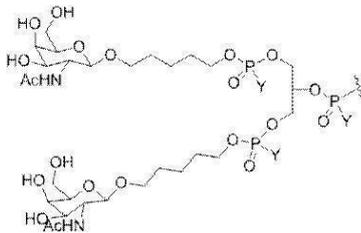


。

〔項 1 6 1〕

前記細胞ターゲティング部分が

【化 1 0 0 9 0】



20

[式中、各 Y は、O、S、置換または無置換 C₁ - C₁₀ アルキル、アミノ、置換アミノ、アジド、アルケニルまたはアルキニルから選択される]

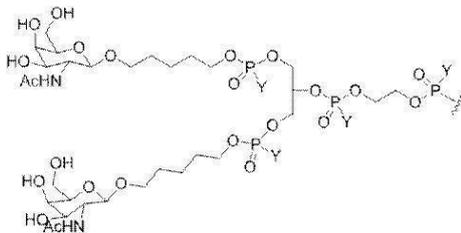
30

を含む、請求項 1 3 5 に記載の化合物。

〔項 1 6 2〕

前記共役基が

【化 1 0 0 9 1】



40

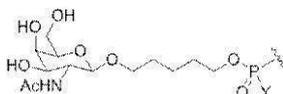
[式中、各 Y は、O、S、置換または無置換 C₁ - C₁₀ アルキル、アミノ、置換アミノ、アジド、アルケニルまたはアルキニルから選択される]

を含む、請求項 1 3 5 に記載の化合物。

〔項 1 6 3〕

前記細胞ターゲティング部分が以下の構造を有する、請求項 1 3 5 に記載の化合物：

【化 1 0 0 9 2】



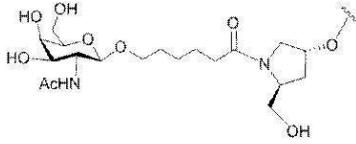
50

[式中、各 Y は、O、S、置換または無置換 C₁ - C₁₀ アルキル、アミノ、置換アミノ、アジド、アルケニルまたはアルキニルから選択される]。

[項 1 6 4]

前記共役基が

【化 1 0 0 9 3】



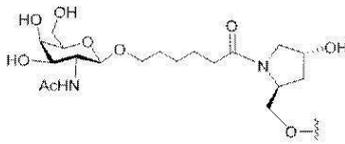
10

を含む、請求項 1 ~ 1 6 3 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 1 6 5]

前記共役基が

【化 1 0 0 9 4】



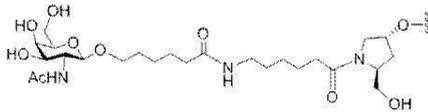
を含む、請求項 1 ~ 1 6 4 のいずれか一項に記載の化合物。

20

[項 1 6 6]

前記共役基が

【化 1 0 0 9 5】

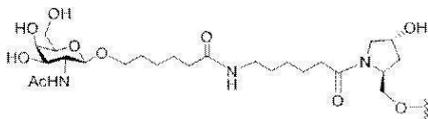


を含む、請求項 1 ~ 1 6 4 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 1 6 7]

前記共役基が

【化 1 0 0 9 6】



30

を含む、請求項 1 6 6 に記載の化合物。

[項 1 6 8]

前記共役基が、ホスホジエステル、アミド、またはエステルから選択される切断可能部分を含む、請求項 1 ~ 1 6 7 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 1 6 9]

前記共役基がホスホジエステル切断可能部分を含む、請求項 1 ~ 1 6 8 のいずれか一項に記載の化合物。

40

[項 1 7 0]

前記共役基が切断可能部分を含まず、かつ前記共役基が前記共役基と前記オリゴヌクレオチドとの間にホスホロチオエート連結部を含む、請求項 1 ~ 1 6 9 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 1 7 1]

前記共役基がアミド切断可能部分を含む、請求項 1 ~ 1 7 0 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 1 7 2]

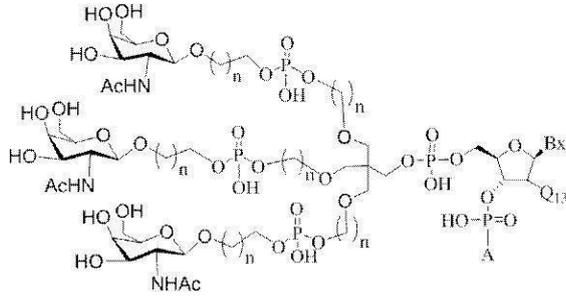
50

前記共役基がエステル切断可能部分を含む、請求項 1 ~ 171 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 173]

以下の構造を有する、請求項 1 ~ 172 のいずれか一項に記載の化合物：

【化 10097】



10

[式中、

各 n は、独立して、1 ~ 20 であり、

Q_{13} は、H または $O(CH_2)_2 - OCH_3$ であり、

A は、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ

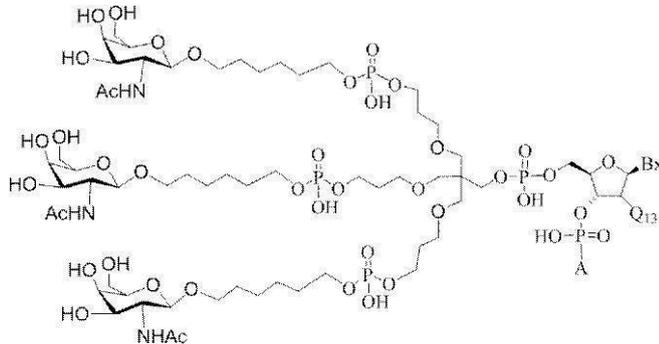
Bx は、複素環式塩基部分である]。

[項 174]

20

以下の構造を有する、請求項 1 ~ 172 のいずれか一項に記載の化合物：

【化 10098】



30

[式中、

各 n は、独立して、1 ~ 20 であり、

Q_{13} は、H または $O(CH_2)_2 - OCH_3$ であり、

A は、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ

Bx は、複素環式塩基部分である]。

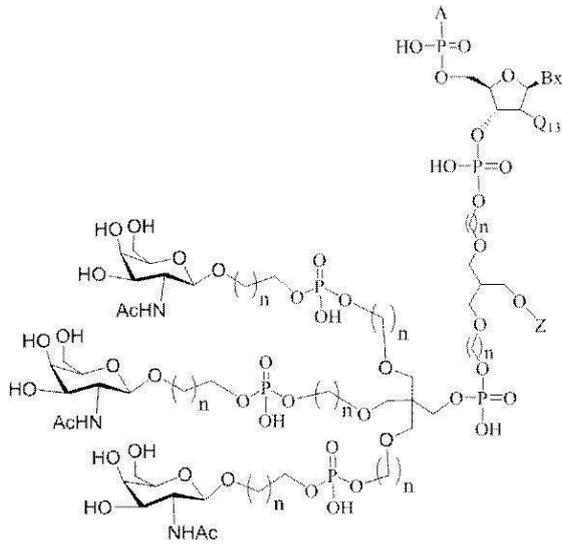
[項 175]

以下の構造を有する、請求項 1 ~ 172 のいずれか一項に記載の化合物：

40

50

【化 1 0 0 9 9】



10

[式中、

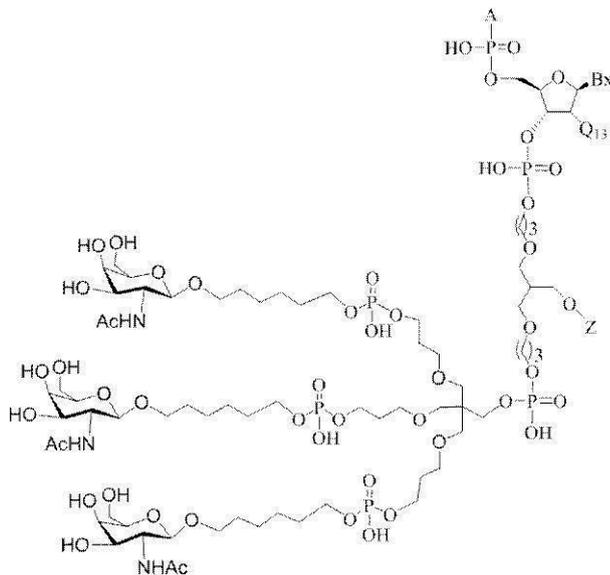
各 n は、独立して、1 ~ 20 であり、 Q_{13} は、H または $O(CH_2)_2 - OCH_3$ であり、 A は、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、 Z は、H または連結された固体支持体であり、かつ Bx は、複素環式塩基部分である]。

20

[項 1 7 6]

以下の構造を有する、請求項 1 ~ 172 のいずれか一項に記載の化合物：

【化 1 0 0 1 0 0】



30

[式中、

各 n は、独立して、1 ~ 20 であり、 Q_{13} は、H または $O(CH_2)_2 - OCH_3$; A は、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、 Z は、H または連結された固体支持体であり、かつ Bx は、複素環式塩基部分である]。

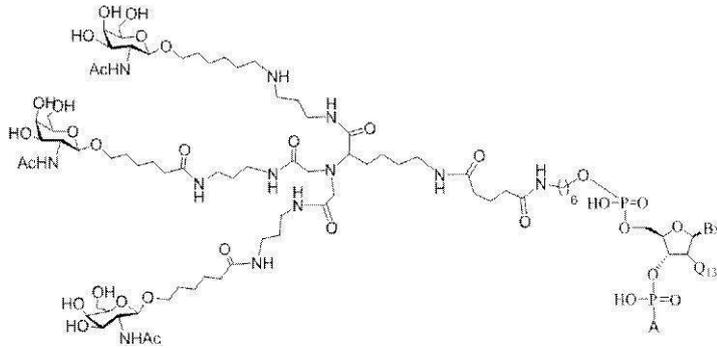
40

[項 1 7 7]

以下の構造を有する、請求項 1 ~ 172 のいずれか一項に記載の化合物：

50

【化100101】



10

[式中、

Q₁₃は、HまたはO(CH₂)₂-OCH₃であり、

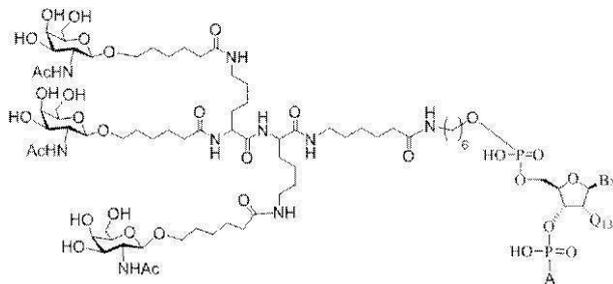
Aは、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ

B×は、複素環式塩基部分である]。

[項178]

以下の構造を有する、請求項1～172のいずれか一項に記載の化合物：

【化100102】



20

[式中、

Q₁₃は、HまたはO(CH₂)₂-OCH₃であり、

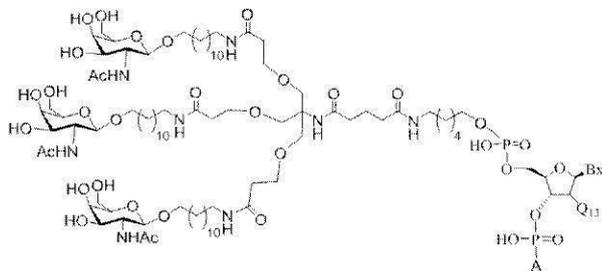
Aは、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ

B×は、複素環式塩基部分である]。

[項179]

以下の構造を有する、請求項1～172のいずれか一項に記載の化合物：

【化100103】



40

[式中、

Q₁₃は、HまたはO(CH₂)₂-OCH₃であり、

Aは、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ

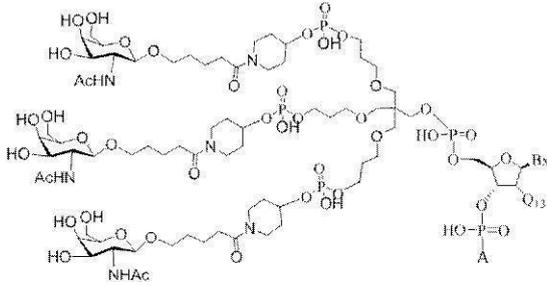
B×は、複素環式塩基部分である]。

[項180]

以下の構造を有する、請求項1～172のいずれか一項に記載の化合物：

50

【化100104】



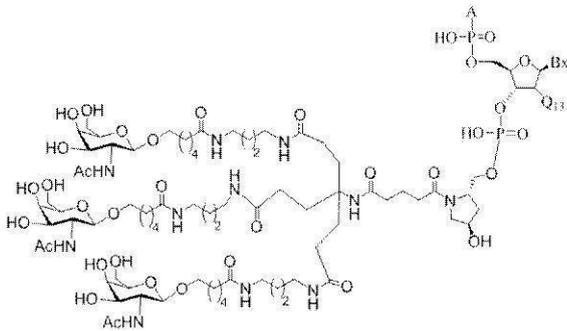
[式中、

Q₁₃は、HまたはO(CH₂)₂-OCH₃であり、
Aは、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ
B_xは、複素環式塩基部分である]。

[項181]

以下の構造を有する、請求項1～172のいずれか一項に記載の化合物：

【化100105】



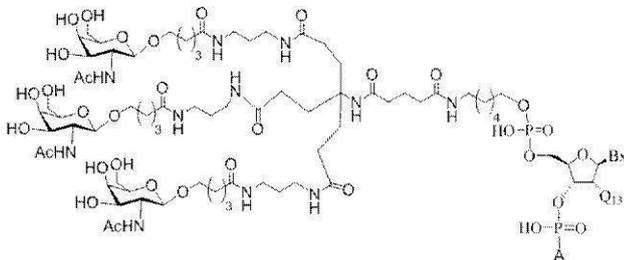
[式中、

Q₁₃は、HまたはO(CH₂)₂-OCH₃であり、
Aは、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ
B_xは、複素環式塩基部分である]。

[項182]

以下の構造を有する、請求項1～172のいずれか一項に記載の化合物：

【化100106】



[式中、

Q₁₃は、HまたはO(CH₂)₂-OCH₃であり、
Aは、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ
B_xは、複素環式塩基部分である]。

[項183]

以下の構造を有する、請求項1～172のいずれか一項に記載の化合物：

10

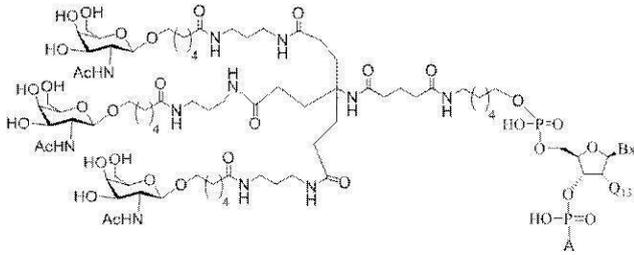
20

30

40

50

【化100107】



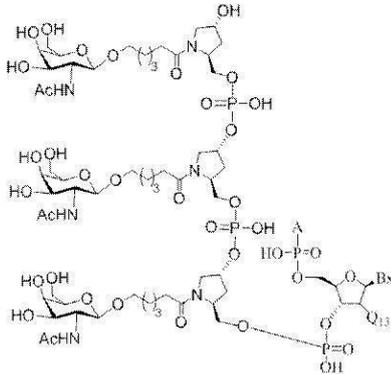
[式中、

Q₁₃は、HまたはO(CH₂)₂-OCH₃であり、
Aは、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ
B_xは、複素環式塩基部分である]。

[項184]

以下の構造を有する、請求項1～172のいずれか一項に記載の化合物：

【化100108】



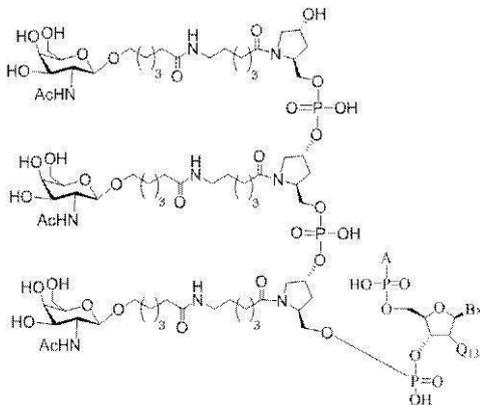
[式中、

Q₁₃は、HまたはO(CH₂)₂-OCH₃であり、
Aは、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ
B_xは、複素環式塩基部分である]。

[項185]

以下の構造を有する、請求項1～172のいずれか一項に記載の化合物：

【化100109】



[式中、

Q₁₃は、HまたはO(CH₂)₂-OCH₃であり、
Aは、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ
B_xは、複素環式塩基部分である]。

[項186]

10

20

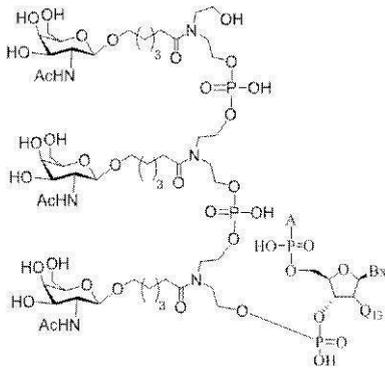
30

40

50

以下の構造を有する、請求項 1 ~ 172 のいずれか一項に記載の化合物：

【化 100110】



10

[式中、

Q13 は、H または $O(CH_2)_2-OCH_3$ であり、

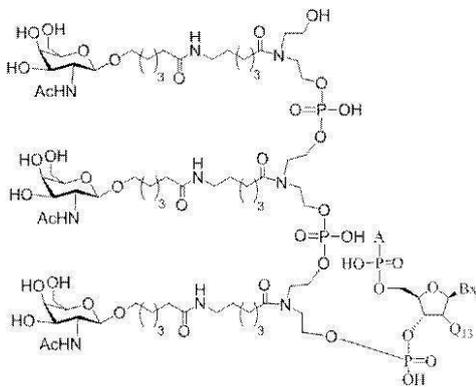
A は、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ

Bx は、複素環式塩基部分である]。

[項 187]

以下の構造を有する、請求項 1 ~ 172 のいずれか一項に記載の化合物：

【化 100111】



20

[式中、

Q13 は、H または $O(CH_2)_2-OCH_3$ であり、

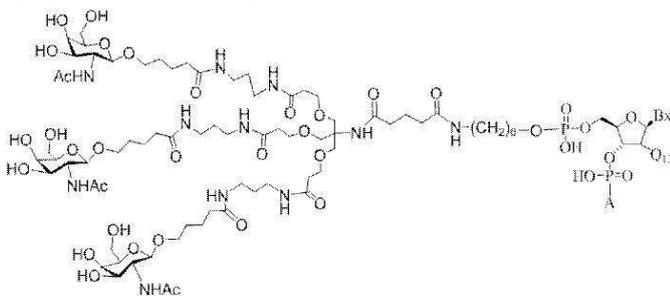
A は、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ

Bx は、複素環式塩基部分である]。

[項 188]

前記共役基が

【化 100112】



40

[式中、

Q13 は、H または $O(CH_2)_2-OCH_3$ であり、

A は、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ

Bx は、複素環式塩基部分である]

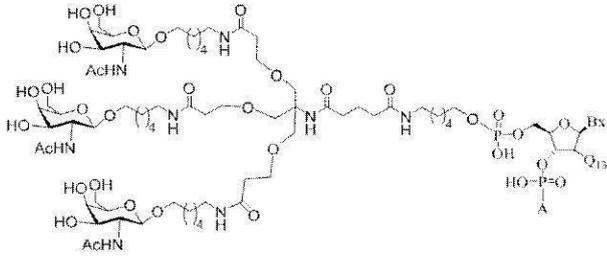
50

を含む、請求項 1 ~ 172 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 189]

前記共役基が

【化 100113】



10

[式中、

Q13は、HまたはO(CH2)2-OCH3であり、

Aは、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ

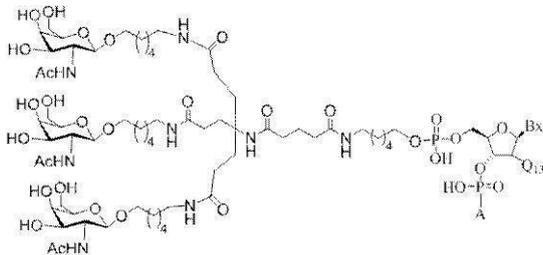
Bxは、複素環式塩基部分である]

を含む、請求項 1 ~ 172 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 200]

前記共役基が

【化 100114】



20

[式中、Q13は、HまたはO(CH2)2-OCH3であり、

Aは、前記修飾オリゴヌクレオチドであり、かつ

Bxは、複素環式塩基部分である]

を含む、請求項 1 ~ 172 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 201]

Bxが、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、またはシトシンもしくは5-メチルシトシンのなかから選択される、請求項 173 ~ 200 のいずれか一項に記載の化合物。[

項 202]

Bxがアデニンである、請求項 173 ~ 200 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 203]

Bxがチミンである、請求項 173 ~ 200 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 204]

Q13がO(CH2)2-OCH3である、請求項 173 ~ 200 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 205]

Q13がHである、請求項 173 ~ 200 のいずれか一項に記載の化合物。

[項 206]

ISIS696844、ISIS696845、ISIS698969、またはISIS698970を含む化合物。

[項 207]

ISIS696844、ISIS696845、ISIS698969、またはISIS698970からなる化合物。

40

50

〔項 2 0 8 〕

請求項 1 ~ 2 0 7 のいずれか一項に記載の化合物またはその塩と、医薬上許容される担体または希釈剤の少なくとも 1 つとを含む組成物。

〔項 2 0 9 〕

請求項 1 ~ 2 0 8 のいずれか一項に記載の化合物を含むプロドラッグ。

〔項 2 1 0 〕

対象における補体代替経路の調節異常に関連する疾患を処置し、防止し、または改善する方法であって、前記対象に、請求項 1 ~ 2 0 7 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 2 0 8 に記載の組成物、または請求項 2 0 9 に記載のプロドラッグを投与し、それによって前記疾患を処置し、防止し、または改善することを含む、前記方法。

10

〔項 2 1 1 〕

前記補体代替経路が正常より強く活性化されている、請求項 2 1 0 に記載の方法。

〔項 2 1 2 〕

前記疾患が黄斑変性である、請求項 2 1 0 または 2 1 1 に記載の方法。

〔項 2 1 3 〕

前記黄斑変性が加齢黄斑変性 (A M D) である、請求項 2 1 2 に記載の方法。

〔項 2 1 4 〕

前記 A M D が滲出型 A M D である、請求項 2 1 3 に記載の方法。

〔項 2 1 5 〕

前記 A M D が乾性 A M D である、請求項 2 1 3 に記載の方法。

20

〔項 2 1 6 〕

前記乾性 A M D が地図状萎縮である、請求項 2 1 5 に記載の方法。

〔項 2 1 7 〕

前記疾患が腎臓疾患である、請求項 2 1 0 または 2 1 1 に記載の方法。

〔項 2 1 8 〕

前記腎臓疾患がループス腎炎である、請求項 2 1 7 に記載の方法。

〔項 2 1 9 〕

前記腎臓疾患が全身性エリテマトーデス (S L E) である、請求項 2 1 7 に記載の方法。

〔項 2 2 0 〕

前記腎臓疾患がデンスデポジット病 (D D D) である、請求項 2 1 7 に記載の方法。

30

〔項 2 2 1 〕

前記腎臓疾患が C 3 系球体腎炎 (C 3 G N) である、請求項 2 1 7 に記載の方法。

〔項 2 2 2 〕

前記腎臓疾患が C F H R 5 ネフロパシーである、請求項 2 1 7 に記載の方法。

〔項 2 2 3 〕

前記腎臓疾患が非典型溶血性尿毒症症候群 (a H U S) である、請求項 2 1 7 に記載の方法。

〔項 2 2 4 〕

前記 a H U S が血栓性微小血管症を特徴とする、請求項 2 2 3 に記載の方法。

〔項 2 2 5 〕

前記腎臓疾患が C 3 沈着に関連する、請求項 2 1 7 ~ 2 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

40

〔項 2 2 6 〕

前記腎臓疾患が糸球体における C 3 沈着に関連する、請求項 2 2 5 に記載の方法。

〔項 2 2 7 〕

前記腎臓疾患が正常値未満の循環 C 3 レベルに関連する、請求項 2 1 7 ~ 2 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 2 8 〕

前記循環 C 3 レベルが血清中 C 3 レベルまたは血漿中 C 3 レベルである、請求項 2 2 7 に記載の方法。

〔項 2 2 9 〕

50

前記化合物または組成物を投与することによって、眼 C 3 レベルが低減し、または眼 C 3 レベルの蓄積が阻害される、請求項 2 1 0 ~ 2 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 3 0〕

前記 C 3 レベルが C 3 タンパク質レベルである、請求項 2 2 9 に記載の方法。

〔項 2 3 1〕

前記化合物または組成物を投与することによって、眼 C 3 沈着のレベルが低減するか、眼 C 3 沈着の蓄積が阻害される、請求項 2 1 0 ~ 2 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 3 2〕

前記化合物または組成物が前記対象に非経口投与される、請求項 2 2 9 ~ 2 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 3 3〕

前記化合物または組成物を投与することによって、腎臓における C 3 レベルが低減し、または腎臓における C 3 レベルの蓄積が阻害される、請求項 2 1 7 ~ 2 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 3 4〕

前記 C 3 レベルが C 3 タンパク質レベルである、請求項 2 3 3 に記載の方法。

〔項 2 3 5〕

前記化合物または組成物を投与することによって、腎臓 C 3 沈着のレベルが低減するか、腎臓 C 3 沈着の蓄積が阻害される、請求項 2 3 3 または 2 3 4 に記載の方法。

〔項 2 3 6〕

腎臓における前記 C 3 レベルが糸球体における C 3 レベルである、請求項 2 3 3 ~ 2 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 3 7〕

前記化合物または組成物が前記対象に非経口投与される、請求項 2 3 3 ~ 2 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 3 8〕

前記対象が、補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するか、または前記疾患を有するリスクがあると同定される、請求項 2 1 0 ~ 2 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 3 9〕

前記同定が、前記対象の血清における補体レベルまたは膜侵襲複合体レベルを検出することを含む、請求項 2 3 8 に記載の方法。

〔項 2 4 0〕

前記同定が、前記疾患に関連する補体因子の遺伝子変異に関する遺伝子検査を実行することを含む、請求項 2 3 8 に記載の方法。

〔項 2 4 1〕

補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象における補体 B 因子 (C F B) の発現を阻害する方法であって、請求項 1 ~ 2 0 7 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 2 0 8 に記載の組成物、または請求項 2 0 9 に記載のプロドラッグを前記対象に投与し、それによって前記対象における C F B の発現を阻害することを含む、前記方法。

〔項 2 4 2〕

前記補体代替経路が正常より強く活性化されている、請求項 2 4 1 に記載の方法。

〔項 2 4 3〕

前記化合物または組成物を投与することによって、眼における C F B の発現が阻害される、請求項 2 4 1 または 2 4 2 に記載の方法。

〔項 2 4 4〕

前記対象が加齢黄斑変性 (A M D) を有するか、加齢黄斑変性 (A M D) を有するリスクがある、請求項 2 4 3 に記載の方法。

〔項 2 4 5〕

前記化合物または組成物を投与することによって、腎臓における C F B の発現が阻害され

10

20

30

40

50

る、請求項 2 4 1 または 2 4 2 に記載の方法。

〔項 2 4 6〕

前記化合物または組成物を投与することによって、糸球体における C F B の発現が阻害される、請求項 2 4 5 に記載の方法。

〔項 2 4 7〕

前記対象が、ループ腎炎、デンスデポジット病 (D D D)、C 3 系球体腎炎 (C 3 G N)、C F H R 5 ネフロパシー、もしくは非典型溶血性尿毒症症候群 (a H U S)、またはそれらの任意の組み合わせを有するか、それらを有するリスクがある、請求項 2 4 5 または 2 4 6 に記載の方法。

〔項 2 4 8〕

補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象の眼における C 3 沈着を低減しまたは C 3 沈着の蓄積を阻害する方法であって、請求項 1 ~ 2 0 7 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 2 0 8 に記載の組成物、または請求項 2 0 9 に記載のプロドラッグを前記対象に投与し、それによって前記対象の眼における C 3 沈着を低減しまたは C 3 沈着の蓄積を阻害することを含む、前記方法。

〔項 2 4 9〕

前記補体代替経路が正常より強く活性化されている、請求項 2 4 8 に記載の方法。

〔項 2 5 0〕

前記対象が加齢黄斑変性 (A M D) を有するか、または加齢黄斑変性 (A M D) を有するリスクがある、請求項 2 4 8 または 2 4 9 に記載の方法。

〔項 2 5 1〕

補体代替経路の調節異常に関連する疾患を有するかまたは前記疾患を有するリスクがある対象の腎臓における C 3 沈着を低減しまたは C 3 沈着の蓄積を阻害する方法であって、請求項 1 ~ 2 0 7 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 2 0 8 に記載の組成物、または請求項 2 0 9 に記載のプロドラッグを前記対象に投与し、それによって前記対象の腎臓における C 3 沈着を低減しまたは C 3 沈着の蓄積を阻害することを含む、前記方法。

〔項 2 5 2〕

前記補体代替経路が正常より強く活性化されている、請求項 2 5 1 に記載の方法。

〔項 2 5 3〕

前記対象が、ループ腎炎、デンスデポジット病 (D D D)、C 3 系球体腎炎 (C 3 G N)、C F H R 5 ネフロパシー、もしくは非典型溶血性尿毒症症候群 (a H U S)、またはそれらの任意の組み合わせを有するか、またはそれらを有するリスクがある、請求項 2 5 1 または 2 5 2 に記載の方法。

〔項 2 5 4〕

前記化合物または組成物が前記対象に非経口投与される、請求項 2 4 1 ~ 2 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

〔項 2 5 5〕

補体代替経路の調節異常に関連する疾患を処置し、防止し、または改善するための、請求項 1 ~ 2 0 7 のいずれか一項に記載の化合物、請求項 2 0 8 に記載の組成物、または請求項 2 0 9 に記載のプロドラッグの使用。

〔項 2 5 6〕

前記補体代替経路が正常より強く活性化されている、請求項 2 5 5 に記載の使用。

〔項 2 5 7〕

前記疾患が黄斑変性である、請求項 2 5 5 または 2 5 6 に記載の使用。

〔項 2 5 8〕

前記黄斑変性が加齢黄斑変性 (A M D) である、請求項 2 5 7 に記載の使用。

〔項 2 5 9〕

前記 A M D が滲出型 A M D である、請求項 2 5 8 に記載の使用。

〔項 2 6 0〕

前記 A M D が乾性 A M D である、請求項 2 5 8 に記載の使用。

10

20

30

40

50

〔項 2 6 1〕

前記乾性 A M D が地図状萎縮である、請求項 2 6 0 に記載の使用。

〔項 2 6 2〕

前記疾患が腎臓疾患である、請求項 2 5 5 または 2 5 6 に記載の使用。

〔項 2 6 3〕

前記腎臓疾患が、ループス腎炎、デンスデポジット病 (D D D)、C 3 系球体腎炎 (C 3 G N)、C F H R 5 ネフロパシー、もしくは非典型溶血性尿毒症症候群 (a H U S)、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 2 6 2 に記載の使用。

【配列表】

0007001663000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I		
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47	

米国(US)

中西 基晴

(74)代理人

100135415

弁理士 中濱 明子

(72)発明者

ブラカシュ, タジャ・ピー

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

(72)発明者

セス, プニット・ピー

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

(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

(72)発明者

グロスマン, タマル・アール

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

マッカレブ, マイケル・エル

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

ワット, アンドリュー・ティー

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

(72)発明者

フレアー, スーザン・エム

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

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献

特表 2 0 0 5 - 5 0 4 5 2 2 (J P , A)

特表 2 0 0 6 - 5 0 7 8 4 1 (J P , A)

特表 2 0 0 7 - 5 0 5 6 0 5 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 2 / 1 7 7 9 4 7 (W O , A 2)

国際公開第 2 0 1 3 / 1 6 6 1 2 1 (W O , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)

P u b M e d