

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6082809号
(P6082809)

(45) 発行日 平成29年2月15日 (2017. 2. 15)

(24) 登録日 平成29年1月27日 (2017. 1. 27)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010. 01)
A 6 1 K 31/7125 (2006. 01)
A 6 1 K 31/712 (2006. 01)
A 6 1 K 31/7115 (2006. 01)
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A G
 A 6 1 K 31/7125
 A 6 1 K 31/712
 A 6 1 K 31/7115
 A 6 1 K 48/00

請求項の数 15 (全 105 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-514209 (P2015-514209)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月23日 (2013. 5. 23)
 (65) 公表番号 特表2015-522255 (P2015-522255A)
 (43) 公表日 平成27年8月6日 (2015. 8. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/042532
 (87) 国際公開番号 W02013/177468
 (87) 国際公開日 平成25年11月28日 (2013. 11. 28)
 審査請求日 平成27年5月1日 (2015. 5. 1)
 (31) 優先権主張番号 61/651, 539
 (32) 優先日 平成24年5月24日 (2012. 5. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 595104323
 アイオーニス ファーマシューティカルズ
 , インコーポレーテッド
 I o n i s P h a r m a c e u t i c a
 l s , I n c .
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9201
 0, カールズバッド, ガゼル コート 2
 855
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポリポタンパク質 (a) 発現を調節するための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドは20～30個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号58または配列番号57の配列を含む核酸塩基配列を含み、そして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1に少なくとも95%相補性である、前記化合物。

【請求項 2】

前記修飾オリゴヌクレオチドが、20～24個、20～22個、20～25個、または20個の結合されたヌクレオシドからなる、請求項1に記載の化合物。

【請求項 3】

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100%相補性である、請求項1または2に記載の化合物。

【請求項 4】

前記核酸塩基配列が、配列番号58の配列を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 5】

前記修飾オリゴヌクレオチドが20～24個の結合されたヌクレオチドからなり、前記核酸塩基配列が配列番号58の配列を有する、請求項1～4のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項 6】

10

20

(i) 前記修飾オリゴヌクレオチドが、単鎖であり、及び／又は
 (ii) 少なくとも1つのヌクレオシド間結合が、修飾ヌクレオシド間結合であり、及び／又は、
 (iii) 前記修飾オリゴヌクレオチドが、少なくとも1つの修飾糖を含み、及び／又は、
 (iv) 少なくとも1つのヌクレオシドが修飾核酸塩基を有する、
 請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

【請求項7】

(i) 少なくとも1つのヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合であり、及び／又は、
 (ii) (a) 少なくとも1つの修飾糖が二環式糖であり、又は(b) 少なくとも1つの修飾糖が、2'-O-メトキシエチル、拘束エチル (constrained ethyl)、3'-フルオロ-HNA、または4'-(CH₂)_n-O-2' 架橋を含み、式中、nが1または2であり、及び／又は、
 (iii) 前記修飾核酸塩基が5-メチルシトシンである、
 請求項6に記載の化合物。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか1項に記載の化合物であって、
 前記修飾オリゴヌクレオチドが、
 結合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と、
 結合されたヌクレオシドからなる5'ウィングセグメントと、
 結合されたヌクレオシドからなる3'ウィングセグメントと、を含み、
 前記ギャップセグメントが、前記5'ウィングセグメントと前記3'ウィングセグメントとの間に位置付けられ、各ウィ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。

【請求項9】

請求項8に記載の化合物であって、
 前記修飾オリゴヌクレオチドが、20個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ
 10個の結合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と、
 5個の結合されたヌクレオシドからなる5'ウィングセグメントと、
 5個の結合されたヌクレオシドからなる3'ウィングセグメントと、を含み、
 前記ギャップセグメントが、前記5'ウィングセグメントと前記3'ウィングセグメントとの間に位置付けられ、各ウィングセグメントの各ヌクレオシドが、2'-O-メトキシエチル糖を含み、各ヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基が、5-メチルシトシンである、前記化合物。

【請求項10】

前記修飾オリゴヌクレオチドが、20個の結合されたヌクレオシドからなる、請求項8に記載の化合物。

【請求項11】

修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、前記修飾オリゴヌクレオチドは20個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号58の核酸塩基配列を有し、そして前記修飾オリゴヌクレオチドが、

10個の結合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個の結合されたヌクレオシドからなる5'ウィングセグメント

5個の結合されたヌクレオシドからなる3'ウィングセグメント

前記ギャップセグメントが、前記5'ウィングセグメントと前記3'ウィングセグメントとの間に位置付けられ、各ウィングセグメントの各ヌクレオシドが、2'-O-メトキシエチル糖を含み、各ヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基が、5-メチルシトシンである、前記化合物。

【請求項12】

10

20

30

40

50

請求項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載の化合物またはその塩と、薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む、組成物。

【請求項 1 3】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の化合物又は組成物を含有する、医薬組成物。

【請求項 1 4】

上昇したアポ (a) および／または上昇した Lp (a) に関連する疾患の治療、予防、またはその進行を緩慢にさせるための、請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

前記疾患が、炎症性、心血管、または代謝疾患、障害、または状態である、請求項 1 4 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

配列表

本出願は、電子形式の配列表と共に出願されている。配列表は、2013年5月22日に作成され、396KbのサイズであるB I O L 0 1 7 7 W O S E Q . t x t と表題を付けられたファイルとして提供される。配列表の電子形式での情報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【技術分野】

【0002】

本明細書に記載される実施形態は、動物におけるアポリポタンパク質 (a) m R N A およびタンパク質の発現を低下させるための方法、化合物、および組成物を提供する。そのような方法、化合物、および組成物は、心血管および／または代謝疾患、障害、または状態を治療する、予防する、または寛解させるのに有用である。

【背景技術】

【0003】

リポタンパク質は、タンパク質、リン脂質、およびコレステロールの両親媒性被膜によって包囲されるアシルグリセロールおよびコレステリルエステルの非極性コアからなる球状のミセル様粒子である。リポタンパク質は、それらの機能的および物理的特性に基づき5つの広範なカテゴリーに分類されている：カイロミクロン、超低密度リポタンパク質 (V L D L)、中間密度リポタンパク質 (I D L)、低密度リポタンパク質 (L D L)、および高密度リポタンパク質 (H D L)。カイロミクロンは、腸から組織に食物性脂質を輸送する。V L D L、I D L、およびL D Lは全て、肝臓から組織にトリアシルグリセロールおよびコレステロールを輸送する。H D Lは、組織から肝臓に内因性コレステロールを輸送する。

【0004】

リポタンパク質粒子は、連続代謝処理を受け、可変の特性および組成を有する。リポタンパク質密度は、それらの外側被膜の密度が内側コアの密度より低いため粒径を増加させることなく増加する。リポタンパク質のタンパク質構成要素は、アポリポタンパク質として知られる。様々なヒトリポタンパク質の中でも、少なくとも9つのアポリポタンパク質

【0005】

リポタンパク質 (a) [Lp (a)] 粒子は、50年近く前に特定され、1つのアポリポタンパク質B (アポB) タンパク質がジスルフィド結合を介して単一のアポリポタンパク質 (a) [アポ (a)] タンパク質に結合される、高度に独特なL D L粒子から構成される。アポ (a) タンパク質は、特にクリングル I V 2 型反復ドメイン内のプラスミノゲンと高度の相同性を共有する。循環Lp (a) のレベルは、分子中に存在するクリングル I V 2 型可変反復の数に逆比例し、両方の対立遺伝子が個体において同時発現されるとき、ヘテロ接合性血漿イソ型プロファイルを示すことができる (K r a f t e t a l . , E u r J H u m G e n e t , 1 9 9 6 ; 4 (2) : 7 4 - 8 7) 。アポ (

10

20

30

40

50

a)におけるこのクリングル反復ドメインは、その血栓形成促進性および抗線維素溶解性特性に関与し得、アテローム性動脈硬化の進行を強化する可能性があると考えられる。

【0006】

アポ(a)は、IL-6により転写的に調節され、IL-6阻害剤(トシリズマブ)で治療されたリウマチ性関節炎の患者における研究では、血漿レベルが3ヶ月の治療後に30%低下した(Schultz et al., PLoS One 2010; 5:e14328)。

【0007】

アポ(a)は、酸化リン脂質に優先的に結合し、血管炎症を増強することが示されてきた(Bergmark et al., J Lipid Res 2008; 49:2230-2239、Tsimikas et al., Circulation. 2009; 119(13):1711-1719)。

【0008】

さらに、研究は、Lp(a)粒子が内皮透過性を刺激し、プラスミノゲン活性化因子阻害剤1型発現を誘導し、マクロファージインターロイキン8の分泌を活性化し得ることも示唆する(Koschinsky and Marcovina, Curr Opin Lipidol 2004; 15:167-174)。重要なことに、最近の遺伝子関連研究は、Lp(a)が心筋梗塞、脳卒中、末梢血管疾患、および腹部大動脈瘤の独立した危険因子であることを明らかにした(Rifai et al., Clin Chem 2004; 50:1364-71、Erqou et al., JAMA 2009; 302:412-23、Kamstrup et al., Circulation 2008; 117:176-84)。さらに、最近の早発性冠動脈疾患(PROCARDIS)研究では、Clarkeら(Clarke et al., NEJM (2009) 361:2518-2528)は、冠動脈心疾患と血漿Lp(a)濃度との間の強く独立した関係を説明した。加えて、Solfrizziらは、血清Lp(a)の増加がアルツハイマー病(AD)の危険性の増加と関連付けられ得ることを示唆した(Solfrizzi et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry 2002, 72:732-736。現在、診療所という環境において、心血管疾患を治療するための間接的なアポ(a)阻害剤の例としては、それぞれ、血漿Lp(a)レベルを18%、39%、32%、36%、43%、および17%低下させるアスピリン、ナイアスパン、ミボメルセン、アナセトラピブ、エプロチローム(Epirotirome)、およびロミタピドが挙げられる。加えて、Lp(a)アフエレシスは、診療所において、Lp(a)粒子を含有するアポ(a)を低下させるために使用されている。

【0009】

今まで、アポ(a)レベルを直接標的指向することにより心血管疾患を治療するための治療戦略は、限られてきた。リボザイムオリゴヌクレオチド(米国特許第5,877,022号)およびアンチセンスオリゴヌクレオチド(国際公開第2005/000201号、同第2003/014397号、米国特許第8,138,328号、Merki et al., J Am Coll Cardiol 2011; 57:1611-1621)が開発されてきたが、アポ(a)を直接標的指向する化合物のいずれも診療所において現在使用されていない。

【0010】

よって、慢性的な血漿Lp(a)レベルの上昇による心血管事象の高い危険性がある患者において、アポ(a)レベルを強力かつ選択的に低下させることができる新規薬剤の未対処の医学的必要性が明確に存在する。

【発明の概要】

【0011】

アポ(a)mRNAおよびタンパク質の発現を調節するための組成物および方法が、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、アポ(a)特異的阻害剤は、アポ(a)mRNAおよびタンパク質の発現を減少させる。

10

20

30

40

50

【0012】

ある特定の実施形態では、組成物は、アポ（a）特異的阻害剤である。ある特定の実施形態では、アポ（a）特異的阻害剤は、核酸、タンパク質、または小分子である。ある特定の実施形態では、アポ（a）特異的阻害剤は、アポ（a）を標的指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、アポ（a）特異的阻害剤は、12～30個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号1の核酸塩基3901～3920の等長部分に相補的である少なくとも8個の連続する核酸塩基の一部を含む核酸塩基配列を含む、修飾オリゴヌクレオチドであり、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号1に少なくとも80%相補性である。ある特定の実施形態では、アポ（a）特異的阻害剤は、12～30個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号1～130、133、134の核酸塩基配列の少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、または20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、アポ（a）特異的阻害剤は、20個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号58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修飾オリゴヌクレオチドであり、修飾オリゴヌクレオチドは、（a）10個の結合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）5個の結合されたヌクレオシドからなる5'ウィングセグメント、（c）5個の結合されたヌクレオシドからなる3'ウィングセグメントを含み、ギャップセグメントは、5'ウィングセグメントと3'ウィングセグメントとの間に位置付けられ、各ウィ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、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。

10

20

【0013】

ある特定の実施形態は、本明細書に記載される化合物、またはその塩、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む組成物を提供する。

【0014】

ある特定の実施形態では、アポ（a）発現の調節は、細胞または組織で生じる。ある特定の実施形態では、調節は、動物の細胞または組織において生じる。ある特定の実施形態では、動物はヒトである。ある特定の実施形態では、調節は、アポ（a）mRNAレベルの低下である。ある特定の実施形態では、調節は、アポ（a）タンパク質レベルの低下である。ある特定の実施形態では、アポ（a）mRNAおよびタンパク質レベルの両方が低下する。そのような低下は、時間依存または用量依存様式で生じ得る。

30

【0015】

ある特定の実施形態は、療法で使用するための組成物および方法を提供する。ある特定の実施形態は、アポ（a）関連疾患、障害、および状態を予防する、治療する、遅延させる、その進行を緩慢にさせる、および／または寛解させるための組成物および方法を提供する。ある特定の実施形態は、Lp（a）関連疾患、障害、および状態を予防する、治療する、遅延させる、その進行を緩慢にさせる、および／または寛解させるための組成物および方法を提供する。ある特定の実施形態では、そのような疾患、障害、および状態は、炎症性、心血管、および／または代謝疾患、障害、および状態である。ある特定の実施形態では、療法のための組成物および方法は、アポ（a）特異的阻害剤を、それを必要とする個体に投与することを含む。ある特定の実施形態では、アポ（a）特異的阻害剤は、核酸である。ある特定の実施形態では、核酸は、アンチセンス化合物である。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物は、修飾オリゴヌクレオチドである。

40

【発明を実施するための形態】

【0016】

前述の一般的な説明および以下の詳細な説明の両方は、例示的および説明的なものでなく、特許請求される本発明を限定するものではないことを理解されたい。本明細書で使用されるとき、単数形の使用は、別段の指示がない限り、複数を含む。本明細書で使用

50

されるとき、「または」は、別段の指示がない限り、「および／または」を意味する。加えて、本明細書で使用されるとき、別段の指示がない限り、「および」は、「および／または」を意味する。さらに、用語「含む (including)」ならびに「含む (includes)」および「含まれる」等の他の形態の使用も限定的なものではない。また、「要素」または「構成要素」等の用語は、別段の指示がない限り、1つのユニットを含む、要素および構成要素と、2つ以上のサブユニットを含む、要素および構成要素の両方を包含する。

【0017】

本明細書で使用される項目見出しは、構成的な目的のためでしかなく、説明される主題を限定すると解釈すべきではない。特許、特許出願、公開特許出願、論文、本、専門書、ならびに国立生物工学情報センター (NCBI) 等のデータベースを通して得ることができる GENBANK 受託番号および関連する配列情報ならびに本開示全体を通して参照される他のデータを含むがこれらに限定されない、本開示に引用される全ての文献または文献の一部は、本明細書において、本明細書に記載される文献の一部の参照により、ならびにその全体が明確に組み込まれる。

【0018】

定義

特定の定義がなされない限り、本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、医学および薬化学と関連して利用される命名法、ならびにそれらの手順および技法は、当技術分野において公知であって、一般的に使用されるものである。標準的技法が、化学合成および化学分析のために使用されてもよい。

【0019】

別段の指示がない限り、次の用語は、次の意味を有する。

【0020】

「2'-O-メトキシエチル」(同様に 2'-MOE、MOE、2'-O(CH₂)₂-OCH₃ および 2'-O-(2-メトキシエチル)) は、フラノシル環の 2' 位の O-メトキシエチル修飾を指す。2'-O-メトキシエチル修飾糖は、修飾糖である。

【0021】

「2'-デオキシリボヌクレオシド」は、天然に生じるデオキシリボヌクレオシド (DNA) に見出される、2'-Hフラノシル糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

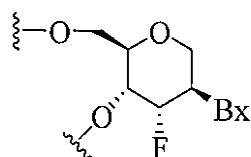
【0022】

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

【0023】

「3'-フルオロ-HNA」(同様に「F-HNA」または「3'-F-HNA」) は、次の構造:

【化1】



を有するヌクレオシドの糖部分を意味し、式中、Bx は、核酸塩基である。

【0024】

「3' 標的部位」は、特定の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である標的核酸のヌクレオチドを指す。

【0025】

「5' 標的部位」は、特定の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である標的核酸のヌクレオチドを指す。

【0026】

「5-メチルシトシン」は、メチル基が 5' 位に付着して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。

【0027】

「約」は、値の±10%内を意味する。例えば、「マーカーは約50%増加し得る」と記載される場合、マーカーが45%～55%増加し得ることを意味する。

【0028】

「活性医薬品」は、個体に投与されると、治療利益を提供する、医薬組成物中の物質または複数の物質を意味する。例えば、ある特定の実施形態では、アポ(a)に対して標的指向されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、活性医薬品である。

10

【0029】

「活性標的領域」または「標的領域」は、1つ以上の活性アンチセンス化合物が標的指向される領域を意味する。「活性アンチセンス化合物」は、標的核酸レベルまたはタンパク質レベルを低下させるアンチセンス化合物を意味する。

【0030】

「同時に投与される」は、両剤の薬理効果が患者において同時に顕在化される、任意の様式における、2つの薬剤の同時投与を指す。同時投与は、両剤が単一の医薬組成物において、同一剤形において、または同一投与経路によって投与されることを要求しない。両剤の効果は、同時に顕現される必要はない。その効果は、ある時間期間の間だけ重複し、共存する必要はない。

20

【0031】

「投与する」または「投与」は、個体に医薬品を提供することを意味し、医療専門家および自己投与による投与を含むが、これらに限定されない。医薬品の個体への投与は、連続、長期、短期、または断続的であり得る。投与は、非経口または経口であり得る。

【0032】

「薬剤」は、動物に投与されると、治療利益を提供することができる活性物質を意味する。「第1の薬剤」は、本発明の治療化合物を意味する。例えば、第1の薬剤は、アポ(a)を標的指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。「第2の薬剤」は、本発明の第2治療化合物（例えばアポ(a)を標的指向する第2のアンチセンスオリゴヌクレオチド）、および／または非アポ(a)治療化合物を意味する。

30

【0033】

「寛解」または「寛解させる(ameliorate)」または「寛解させる(ameliorating)」は、関連する疾患、障害、または状態のうちの少なくとも1つの指標、兆候、または症状の低下を指す。指標の重症度は、当業者に公知である主観的または客観的手段により決定され得る。

【0034】

「動物」は、ヒトまたは限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、および限定されないがサルおよびチンパンジーを含む非ヒト霊長動物、を含む、非ヒト動物を指す。

40

【0035】

「抗体」は、抗原と特異的に何らかの反応をすることを特徴とする、分子を指し、抗体および抗原は各々、反対の観点から定義される。抗体は、重鎖、軽鎖、Fab領域、およびFc領域等、完全抗体分子あるいはその任意の断片またはその領域を指し得る。

【0036】

「アンチセンス活性」は、アンチセンス化合物のその標的核酸へのハイブリダイゼーションに起因する、任意の検出可能または測定可能活性を意味する。ある特定の実施形態では、アンチセンス活性は、標的核酸またはかかる標的核酸によってコードされるタンパク質の量あるいは発現における減少である。

50

【0037】

「アンチセンス化合物」は、水素結合を介して標的核酸にハイブリダーゼーションすることが可能な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は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A、s h R N A、s n o R N A、m i R N A、およびサテライト反復等の1本鎖および2本鎖化合物が挙げられる。本明細書で使用される、用語「アンチセンス化合物」は、本明細書に記載される化合物の薬学的に許容される誘導体を包含する。

【0038】

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

10

【0039】

「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、標的核酸の対応する領域またはセグメントへのハイブリダイゼーションを許容する核酸塩基配列を有する、1本鎖オリゴヌクレオチドを意味する。本明細書で使用される、用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、本明細書に記載される化合物の薬学的に許容される誘導体を包含する。

【0040】

「アポ(a)」は、アポ(a)をコードする任意の核酸またはタンパク質配列を意味する。例えば、ある特定の実施形態では、アポ(a)は、アポ(a)をコードするDNA配列、アポ(a)をコードするDNAから転写されるRNA配列（イントロンおよびエクソンを含む、ゲノムDNAを含む）、アポ(a)をコードするmRNA配列、またはアポ(a)をコードするペプチド配列を含む。

20

【0041】

「アポ(a)核酸」は、アポ(a)をコードする任意の核酸を意味する。例えば、ある特定の実施形態では、アポ(a)核酸はアポ(a)をコードするDNA配列、アポ(a)をコードするDNAから転写されるRNA配列（イントロンおよびエクソンを含む、ゲノムDNAを含む）、およびアポ(a)をコードするmRNA配列を含む。

【0042】

「アポ(a)mRNA」は、アポ(a)タンパク質をコードするmRNAを意味する。

【0043】

「アポ(a)タンパク質」は、アポ(a)をコードする任意のタンパク質配列を意味する。

30

【0044】

「アポ(a)特異的阻害剤」は、アポ(a)核酸および／またはアポ(a)タンパク質の発現を特異的に阻害することが可能である任意の薬剤を指す。例えば、アポ(a)特異的阻害剤は、アポ(a)核酸および／またはアポ(a)タンパク質の発現を阻害することが可能である、核酸（アンチセンス化合物を含む）、ペプチド、抗体、小分子、および他の薬剤を含む。ある特定の実施形態では、アポ(a)核酸発現および／またはアポ(a)タンパク質発現を特異的に調節することによって、アポ(a)特異的阻害剤は、下流構成要素を含む脂質輸送系の他の構成要素に影響を及ぼすことができる。同様に、ある特定の実施形態では、アポ(a)特異的阻害剤は、動物における他の分子過程に影響を及ぼすことができる。

40

【0045】

「粥状動脈硬化」は、大および中動脈に影響を及ぼす動脈の硬化を意味し、脂肪の蓄積の存在を特徴とする。脂肪の蓄積は、「アテローマ」または「プラーク」と呼ばれ、これは、主に、コレステロール、および他の脂肪、カルシウム、ならびに斑痕組織からなり、動脈の内膜を損傷する。

【0046】

「二環式糖」は、2つの原子の架橋によって修飾されるフラノシル環を意味する。二環式糖は、修飾糖である。

50

【0047】

「二環式ヌクレオシド」（同様にBNA）は、糖環の2つの炭素原子を接続する架橋を含む糖部分を有し、それによって、二環式環系を形成する、ヌクレオシドを意味する。ある特定の実施形態では、架橋は、糖環の4'炭素および2'炭素を接続する。

【0048】

「キャップ構造」または「末端キャップ部分」は、アンチセンス化合物のいずれの末端でも取り込まれた化学修飾を意味する。

【0049】

「心血管疾患」または「心血管障害」は、心臓、血管、または循環に関連する一群の状態を指す。心血管疾患の例としては、動脈瘤、狭心症、不整脈、粥状動脈硬化、脳血管疾患（脳卒中）、冠動脈心疾患、高血圧、脂質異常症、高脂血症、高トリグリセリド血症、および高コレステロール血症が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0050】

「化学的に異なる領域」は、いくつかの点において、同一アンチセンス化合物の別の領域と化学的に異なる、アンチセンス化合物の領域を指す。例えば、2'-O-メトキシエチルヌクレオチドを有する領域は、2'-O-メトキシエチル修飾を伴わないヌクレオチドを有する領域と化学的に異なる。

【0051】

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

20

【0052】

「コレステロール」は、全ての動物組織の細胞膜に見出されるステロール分子である。コレステロールは、動物の血漿において、超低密度リポタンパク質（VLDL）、中間密度リポタンパク質（IDL）、低密度リポタンパク質（LDL）、および高密度リポタンパク質（HDL）を含むリポタンパク質によって、輸送されなければならない。「血漿コレステロール」は、血漿または血清に存在する全てのリポタンパク質（VLDL、IDL、LDL、HDL）エステル化および／または非エステル化されるコレステロールの合計を指す。

【0053】

「コレステロール吸収阻害剤」は、食事から得られる外因性コレステロールの吸収を阻害する薬剤を意味する。

30

【0054】

「同時投与」は、2つ以上の薬剤の個体への投与を意味する。2つ以上の薬剤は、単一医薬組成物中であってもよく、または別個の医薬組成物中であってもよい。2つ以上の薬剤は各々、同一または異なる投与経路を通して投与されてもよい。同時投与は、並行または連続投与を包含する。

【0055】

「相補性」は、第1の核酸および第2の核酸の核酸塩基間で対合する能力を意味する。ある特定の実施形態では、第1と第2の核酸間の相補性は、2つのDNA鎖間、2つのRNA鎖間、またはDNAとRNA鎖間であり得る。ある特定の実施形態では、1本の鎖上の核酸塩基のいくつかは、他の鎖上の相補的水素結合塩基と一致する。ある特定の実施形態では、1本の鎖上の核酸塩基の全てが、他の鎖上の相補的水素結合塩基と一致する。ある特定の実施形態では、第1の核酸はアンチセンス化合物であり、第2の核酸は標的核酸である。ある特定のそのような実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは第1の核酸であり、標的核酸は第2の核酸である。

40

【0056】

「拘束エチル（Constrained ethyl）」または「cEt」は、4'と2'炭素原子との間のメチル（メチレンオキシ）（4'-CH(CH₃)-O-2'）架橋を含むフラノシル糖を有する二環式ヌクレオシドを指す。

【0057】

50

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

【0058】

「連続する核酸塩基」は、相互に直接隣接する核酸塩基を意味する。

【0059】

「交差反応性」は、1つの核酸配列を標的指向するオリゴマー化合物が異なる核酸配列とハイブリダイズすることができることを意味する。例えば、いくつかの場合では、ヒトアポ(a)を標的指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、別の種からのアポ(a)と交差反応することができる。オリゴマー化合物がその指定された標的以外の核酸配列と交差反応するか否かは、化合物が有する非標的核酸配列との相補性の程度に依存する。オリゴマー化合物と非標的核酸との間の相補性が高ければ高いほど、オリゴマー化合物が核酸と交差反応する可能性が高くなる。

10

【0060】

「治癒」は、健康を回復する方法または病気の規定の治療を意味する。

【0061】

「冠動脈心疾患(CHD)」は、多くの場合、粥状動脈硬化の結果である、血液および酸素を心臓に供給する小血管の狭窄を意味する。

【0062】

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

20

【0063】

「真性糖尿病」または「糖尿病」は、不十分なインスリンレベルまたはインスリン感受性の低下に起因する代謝障害および異常な高血糖(高血糖症)を特徴とする症候群である。特徴的な症状は、高血糖値による過度の尿生成(多尿症)、排尿の増加の相殺を試みる過度の口渴および水分摂取の増加(多飲症)、眼の視覚に対する高血糖作用による霧視、不明な体重損失、および嗜眠である。

【0064】

「糖尿病性脂質異常症」または「脂質異常症を伴う2型糖尿病」は、2型糖尿病、HDL-Cの低下、トリグリセリド(TG)の上昇、および小型高密度LDL粒子の上昇を特徴とする状態を意味する。

30

【0065】

「希釈剤」は、薬理活性を欠くが、薬学的に必要または望ましい組成物中の成分を意味する。例えば、注射用組成物中の希釈剤は、液剤、例えば、生理食塩水溶液であり得る。

【0066】

「脂質異常症」は、脂質および/またはリポタンパク質の過剰産生もしくは欠乏を含む、脂質および/またはリポタンパク質代謝の障害を指す。脂質異常症は、カイロミクロン、コレステロール、およびトリグリセリド等の脂質、ならびに低密度リポタンパク質(LDL)コレステロール等のリポタンパク質の上昇により顕在化され得る。

40

【0067】

「単位剤形」は、医薬品が提供される形態、例えばピル、錠剤、または当該技術分野に公知の他の単位剤形を意味する。ある特定の実施形態では、単位剤形は、凍結乾燥されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有するバイアルである。ある特定の実施形態では、単位剤形は、再構築されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有するバイアルである。

【0068】

「用量」は、単回投与または規定された時間期間において提供される、医薬品の規定された量を意味する。ある特定の実施形態では、用量は、1つ、2つ、またはそれ以上のボーラス、錠剤、または注射剤において投与されてもよい。例えば、皮下投与が所望される、ある特定の実施形態では、所望の用量は、単回注射によって容易に対応されない容量を

50

要求し、したがって、2回以上の注射を使用して、所望の用量を達成してもよい。ある特定の実施形態では、医薬品は、延長された時間期間にわたって、または連続的に、注入によって投与される。用量は、1時間、1日、1週間、または1ヶ月あたりの医薬品の量として述べられ得る。用量は、mg/kgまたはg/kgでも述べられ得る。

【0069】

「有効量」または「治療有効量」は、薬剤を必要とする個体において所望の生理学的転帰を実現するのに十分な活性医薬品の量を意味する。有効量は、治療される個体の健康および身体状態、治療される個体の分類学的な群、組成物の製剤、個体の病状の査定、および他の関連要因に応じて、個体間で変動し得る。

【0070】

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

【0071】

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

【0072】

「ギャップマー」は、RNase H切断を支援する複数のヌクレオシドを有する内部領域が、1個以上のヌクレオシドを有する外部領域間に位置付けられる、キメラアンチセンス化合物を意味し、内部領域を含むヌクレオシドは、外部領域を含むヌクレオシドまたは複数のヌクレオシドと化学的に異なる。内部領域は、「ギャップ」と称され得、外部領域は、「ウィング」と称され得る。

【0073】

「ギャップ拡張」は、1～6個のヌクレオシドを有する5'および3'ウィングセグメント間およびそれに直接隣接して位置付けられる、12個以上の連続する2'-デオキシリボヌクレオシドのギャップセグメントを有する、キメラアンチセンス化合物を意味する。

【0074】

「グルコース」は、エネルギー源および炎症性中間体として細胞によって使用される単糖である。「血漿グルコース」は、血漿に存在するグルコースを指す。

【0075】

「高密度リポタンパク質C」または「HDL-C」は、高密度リポタンパク質粒子に関係するコレステロールを意味する。血清（または血漿）中のHDL-Cの濃度は、典型的には、mg/dLまたはnmol/Lで定量化される。「血清HDL-C」および「血漿HDL-C」は、それぞれ、血清および血漿中のHDL-Cを意味する。

【0076】

「HMG-CoA還元酵素阻害剤」は、アトルバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、およびシンバスタチン等の酵素HMG-CoA還元酵素の阻害を通して作用する薬剤を意味する。

【0077】

「ハイブリダイゼーション」は、相補的核酸分子のアニールリングを意味する。ある特定の実施形態では、相補的核酸分子は、アンチセンス化合物および標的核酸を含む。

【0078】

「高コレステロール血症」は、成人における高コレステロールの検出、治療の評価の全国コレステロール教育プログラム(NCEP)の専門家パネル報告のガイドラインによる、コレステロールまたは循環(血漿)コレステロール、LDLコレステロール、およびVLDLコレステロールの上昇を特徴とする状態を意味する(Arch. Int. Med. (1988) 148, 36-39を参照)。

【0079】

10

20

30

40

50

「高脂血症」または「高脂質血症」は、血清脂質または循環（血漿）脂質の上昇を特徴とする状態である。この状態は、異常な高濃度の脂肪を顕在化する。循環血液中の脂質画分は、コレステロール、低密度リポタンパク質、超低密度リポタンパク質、カイロミクロン、およびトリグリセリドである。高脂血症のFredrickson分類は、電気泳動または超遠心分離により測定される、TGおよびコレステロール豊富リポタンパク質粒子のパターンに基づき、高トリグリセリド血症等の高脂血症の主な原因を特徴付けするために一般的に使用される（Fredrickson and Lee, Circulation, 1965, 31: 321-327、Fredrickson et al., New Eng J Med, 1967, 276 (1): 34-42）。

【0080】

10

「高トリグリセリド血症」は、トリグリセリドレベルの上昇を特徴とする状態を意味する。その病因は、第1（すなわち遺伝的原因）および第2（糖尿病、代謝症候群／インスリン耐性、肥満、運動不足、喫煙、過度のアルコールおよび炭水化物が非常に高い食事等の他の基礎原因）要因を含むか、またはほとんどの場合、その両方の組み合わせである（Yuan et al. CMAJ, 2007, 176: 1113-1120）。

【0081】

「特定する」または「代謝または心血管疾患を伴う動物の選択」は、高コレステロール血症、高血糖症、高脂血症、高トリグリセリド血症、高血圧、インスリン耐性の増加、インスリン感受性の減少、正常体重超、および／もしくは正常体脂肪含量超、またはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない、代謝疾患、心血管疾患、もしくは代謝症候群になりやすい、またはそれと診断された対象を特定する、もしくは選択すること、あるいは代謝疾患、心血管疾患、もしくは代謝症候群のいずれかの症状を有する対象を特定する、または選択することを意味する。そのような特定は、血清もしくは循環（血漿）コレステロールの測定、血清もしくは循環（血漿）血糖の測定、血清もしくは循環（血漿）トリグリセリドの測定、血圧の測定、体脂肪含有量の測定、体重の測定等の標準的な臨床試験または評価を含むが、これらに限定されないあらゆる方法によって達成され得る。

20

【0082】

「心血管転帰の改善」は、有害な心血管事象の発生、またはその危険性の低下を意味する。有害な心血管事象の例としては、死、再梗塞、脳卒中、心原性ショック、肺水腫、心停止、および心房リズム障害を含むが、これらに限定されない。

30

【0083】

「直接隣接する」は、直接隣接する要素間、例えば領域、セグメント、ヌクレオチド、および／またはヌクレオシド間に介在要素が存在しないことを意味する。

【0084】

「HDLの増加」または「HDLの上昇」は、いずれの化合物も投与されない動物におけるHDLレベルと比較して、本発明の少なくとも1つの化合物の投与後の動物におけるHDLのレベルの増加を意味する。

【0085】

「個体」または「対象」または「動物」は、治療または療法のために選択されるヒトまたはヒト以外の動物を意味する。

40

【0086】

「それを必要とする個体」は、治療または療法のために選択されるヒトまたはヒト以外の動物であって、そのような治療または療法を必要とする、ヒトまたはヒト以外の動物を指す。

【0087】

「誘導する」、「阻害する」、「増強する」、「上昇する」、「増加する」、「減少する」、「低下する」等は、2つの状態間の定量的差を表す。例えば、「アポ（a）の活性または発現を阻害するのに十分な量」は、治療されるサンプルにおけるアポ（a）の活性または発現のレベルが、未治療のサンプルにおけるアポ（a）活性または発現のレベルと異なることを意味する。そのような用語は、例えば発現のレベルおよび活性のレベルに適

50

用される。

【0088】

「炎症状態」は、疾患、疾患状態、症候群、または炎症をもたらす他の状態を指す。例えば、リウマチ性関節炎および肝線維症は炎症状態である。炎症状態の他の例としては、敗血症、心筋虚血／再灌流障害、成人呼吸促迫症候群、腎炎、移植片拒絶、炎症性腸疾患、多発性硬化症、動脈硬化症、粥状動脈硬化、および血管炎が挙げられる。

【0089】

「発現または活性の阻害」は、RNAまたはタンパク質の発現もしくは活性の低下または遮断を指し、発現または活性の完全な排除を必ずしも示さない。

【0090】

「インスリン耐性」は、正常なインスリン量が脂肪、筋肉、および肝細胞から正常なインスリン応答を生成するのに不適切である状態と定義される。脂肪細胞におけるインスリン耐性は、血漿中の遊離脂肪酸を上昇させる、貯蔵されたトリグリセリドの加水分解をもたらす。筋肉におけるインスリン耐性はグルコース取り込みを減少させ、一方、肝臓におけるインスリン耐性は、グルコース貯蔵を低下させ、両作用とも血中グルコースを上昇させる働きをする。インスリン耐性によるインスリンおよびグルコースの高血漿レベルは、多くの場合、代謝症候群および2型糖尿病につながる。

【0091】

「インスリン感受性」は、個体がどのくらい効率的にグルコースを処理するかで度である。高インスリン感受性の個体はグルコースを効率的に処理し、一方、低インスリン感受性の個体はグルコースを効率的に処理しない。

【0092】

「ヌクレオシド間結合」は、ヌクレオシド間の化学結合を指す。

【0093】

「静脈内投与」は、血管内への投与を意味する。

【0094】

「結合されたヌクレオシド」は、共に結合される隣接するヌクレオシドを意味する。

【0095】

「脂質降下」は、対象における1つ以上の脂質（例えばLDL、VLDL）の低下を意味する。「脂質上昇」は、対象における脂質（例えばHDL）の増加を意味する。脂質降下または脂質上昇は、経時的に1つ以上の用量で生じ得る。

【0096】

「脂質降下療法」または「脂質降下剤」は、対象において1つ以上の脂質を低下させるために対象に提供される治療レジメンを意味する。ある特定の実施形態では、脂質降下療法は、対象においてアポ(a)、CETP、アポB、総コレステロール、LDL-C、VLDL-C、IDL-C、非HDL-C、トリグリセリド、小型高密度LDL粒子、およびLp(a)のうちの1つ以上を低下させるために提供される。脂質降下療法の例としては、アポB阻害剤、スタチン、フィブラート、およびMTP阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0097】

VLDL、LDL、およびHDL等の「リポタンパク質」は、血清、血漿、およびリンパに見出される一群のタンパク質を指し、脂質輸送に重要である。各リポタンパク質の化学組成物は、例えば、HDLが脂質に対して高い割合のタンパク質を有し、一方、VLDLが脂質に対して低い割合のタンパク質を有するという点で異なる。

【0098】

「Lp(a)」は、アポ(a)およびアポBを含有するLDL様粒子を含む。アポ(a)は、ジスルフィド結合によってアポBに結合される。

【0099】

「低密度リポタンパク質コレステロール(LDL-C)」は、低密度リポタンパク質粒子に保有されるコレステロールを意味する。血清（または血漿）中のLDL-Cの濃度は

10

20

30

40

50

、典型的には、 mg/dL または nmol/L で定量化される。「血清LDL-C」および「血漿LDL-C」は、それぞれ、血清および血漿中のLDL-Cを意味する。

【0100】

「主要危険因子」は、特定の疾患または状態に関して高い危険性の一因となる因子を指す。ある特定の実施形態では、冠動脈心疾患の主要リスク因子は、喫煙、高血圧、高LDL、低HDL-C、冠動脈心疾患の家族歴、年齢、および本明細書に開示される他の因子を含むが、これらに限定されない。

【0101】

「代謝障害」または「代謝疾患」は、代謝機能における変化または障害を特徴とする状態を指す。「代謝性」および「代謝」は、当技術分野において周知である用語であり、一般的に、生存生物内に生じる生化学過程の全範囲を含む。代謝障害は、高血糖症、前糖尿病、糖尿病（1型および2型）、肥満、インスリン耐性、代謝症候群、および2型糖尿病による脂質異常症を含むが、これらに限定されない。

10

【0102】

「代謝症候群」は代謝由来の脂質および非脂質心血管危険因子のクラスター化を特徴とする状態を意味する。ある特定の実施形態では、代謝症候群は、次の因子のうちの任意の3つの存在により特定される：男性においては 102 cm より大きい、または女性においては 88 cm より大きい胴囲、少なくとも 150 mg/dL の血清トリグリセリド、男性においては 40 mg/dL 未満、または女性においては 50 mg/dL 未満のHDL-C、少なくとも $130/85\text{ mmHg}$ の血圧、および少なくとも 110 mg/dL の空腹時グルコース。これらの決定因子は、臨床現場において容易に測定することができる（JAMA, 2001, 285:2486-2497）。

20

【0103】

「ミスマッチ」または「非相補的核酸塩基」は、第1の核酸の核酸塩基が、第2のまたは標的核酸の対応する核酸塩基と対合することが不可能である場合を指す。

【0104】

「混合型脂質異常症」は、コレステロールの上昇およびトリグリセリドの上昇を特徴とする状態を意味する。

【0105】

「修飾ヌクレオシド間結合」は、天然に存在するヌクレオシド間結合（すなわち、ホスホジエステルヌクレオシド間結合）からの置換または任意の変化を指す。例えば、ホスホロチオエート結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。

30

【0106】

「修飾核酸塩基」は、アデニン、シトシン、グアニン、チミジン、またはウラシル以外の任意の核酸塩基を指す。例えば、5-メチルシトシンは、修飾核酸塩基である。「非修飾核酸塩基」は、プリン塩基アデニン（A）およびグアニン（G）、およびピリミジン塩基チミン（T）、シトシン（C）、およびウラシル（U）を意味する。

【0107】

「修飾ヌクレオシド」は、少なくとも1つの修飾糖部分および／または修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。

40

【0108】

「修飾ヌクレオチド」は、少なくとも1つの修飾糖部分、修飾ヌクレオシド間結合、および／または修飾核酸塩基を有するヌクレオチドを意味する。

【0109】

「修飾オリゴヌクレオチド」は、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを意味する。

【0110】

「修飾糖」は、天然糖からの置換または変化を指す。例えば、2'-O-メトキシエチル修飾糖は修飾糖である。

【0111】

50

「MOEヌクレオシド」は、2'位にMOEを含む2'置換された糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

【0112】

「モチーフ」は、アンチセンス化合物中の化学的に異なる領域のパターンを意味する。

【0113】

「天然に存在するヌクレオシド間結合」は、3'からの5'ホスホジエステル結合を意味する。

【0114】

「天然糖部分」は、DNA(2'-H)またはRNA(2'-OH)に見出される糖を意味する。

【0115】

「核酸」は、モノマーヌクレオチドから構成される分子を指す。核酸は、リボ核酸(RNA)、デオキシリボ核酸(DNA)、1本鎖核酸(ssDNA)、2本鎖核酸(dsDNA)、低分子干渉リボ核酸(siRNA)、およびマイクロRNA(miRNA)を含む。核酸は、単一分子中のこれらの要素の任意の組み合わせも含み得る。

【0116】

「核酸塩基」は、別の核酸の塩基と対合することが可能な複素環式部分を意味する。

【0117】

「核酸塩基相補性」は、別の核酸塩基との塩基対合することが可能である核酸塩基を指す。例えば、DNAにおいて、アデニン(A)は、チミン(T)に相補的である。例えば、RNAにおいて、アデニン(A)は、ウラシル(U)に相補的である。ある特定の形態では、相補的核酸塩基は、その標的核酸の核酸塩基と塩基対合することが可能であるアンチセンス化合物の核酸塩基を指す。例えば、アンチセンス化合物のある位置の核酸塩基が標的核酸のある位置の核酸塩基と水素結合することが可能である場合、オリゴヌクレオチドおよび標的核酸は、その核酸塩基対で相補的であると考えられる。

【0118】

「核酸塩基配列」は、任意の糖、結合、または核酸塩基修飾とも無関係な連続する核酸塩基の順序を意味する。

【0119】

「ヌクレオシド」は、糖に結合された核酸塩基を意味する。

【0120】

「ヌクレオシド模倣体」は、オリゴマー化合物の1つ以上の位置において、糖または糖および塩基を置換するために使用され、必ずしも結合ではない構造を含み、例えば、非フラノース糖単位等のモルホリノ、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、二環または三環糖模倣体を有するヌクレオシド模倣体である。

【0121】

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

【0122】

「ヌクレオチド模倣体」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結合によって結合されるモルホリノ)等のオリゴマー化合物の1つ以上の位置において、ヌクレオシドおよび結合を置換するために使用される構造を含む。

【0123】

「オリゴマー化合物」または「オリゴマー」は、核酸分子の領域とハイブリダイズすることが可能である、結合されたモノマーサブユニットのポリマーを意味する。ある特定の形態では、オリゴマー化合物は、オリゴヌクレオシドである。ある特定の形態では、オリゴマー化合物は、オリゴヌクレオチドである。ある特定の形態では、オリゴマー化合物は、アンチセンス化合物である。ある特定の形態では、オリゴマー化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。ある特定の形態では、オリゴマー化合

10

20

30

40

50

物は、キメラオリゴヌクレオチドである。

【0124】

「オリゴヌクレオチド」は、結合されたヌクレオシドのポリマーであって、その各々が、互いに独立して、修飾または非修飾であり得る、結合されたヌクレオシドのポリマーを意味する。

【0125】

「非経口投与」は、注射または注入を通しての投与を意味する。非経口投与は、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、髄腔内または脳室内投与を含む。投与は、連続、長期、短期、または断続的であり得る。

【0126】

「ペプチド」は、アミド結合によって、少なくとも2個のアミノ酸を結合することによって形成される分子を意味する。ペプチドは、ポリペプチドおよびタンパク質を指す。

【0127】

「医薬品」は、個体に投与されると、治療利益を提供する物質を意味する。例えば、ある特定の実施形態では、アポ(a)に対して標的指向されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、医薬品である。

【0128】

「医薬組成物」または「組成物」は、個体に投与するの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つ以上の活性剤および薬学的担体、例えば滅菌水溶液を含み得る。

【0129】

「薬学的に許容される担体」は、化合物の構造に干渉しない媒体または希釈剤を意味する。そのような担体のいくつかは、医薬組成物を、例えば、対象による経口消化用の錠剤、ピル、糖衣剤、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液、およびロゼンジ剤として製剤化することができる。そのような担体のいくつかは、医薬組成物を注射、注入、または局所投与用に製剤化することができる。例えば、薬学的に許容される担体は、滅菌水溶液であり得る。

【0130】

「薬学的に許容される誘導体」は、溶媒和、水和物、エステル、プロドラッグ、多形、異性体、同位体的に標識された変異体、薬学的に許容される塩、および当該技術分野に公知の他の誘導体等の、本明細書に記載される化合物の誘導体を包含する。

【0131】

「薬学的に許容される塩」は、アンチセンス化合物の生理学的および薬学的に許容される塩、すなわち、親化合物の所望の生物学的活性を維持し、その望ましくない毒性作用を付与しない塩を意味する。用語「薬学的に許容される塩」または「塩」は、無機もしくは有機酸および塩基を含む、薬学的に許容される非毒性の酸または塩基から調製された塩を含む。本明細書に記載される「薬学的に許容される塩」は、当該技術分野に周知の方法により調製され得る。薬学的に許容される塩の概説に関しては、Stahl and Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)を参照。アンチセンスオリゴヌクレオチドのナトリウム塩は、有用であり、ヒトへの治療投与に良好に認容される。したがって、一実施形態では、本明細書に記載される化合物は、ナトリウム塩の形態である。

【0132】

「ホスホロチオエート結合」は、ヌクレオシド間の結合を意味し、ホスホジエステル結合は、非架橋酸素原子の1個を硫黄原子と置換することによって修飾される。ホスホロチオエート結合(P=S)は、修飾ヌクレオシド間結合である。

【0133】

「部分」は、一定数の核酸の連続する(すなわち、結合された)核酸塩基を意味する。ある特定の実施形態では、部分は、標的核酸の一定数の連続する核酸塩基である。ある特

10

20

30

40

50

定の実施形態では、部分は、アンチセンス化合物の一定数の連続する核酸塩基である。

【0134】

「予防する (Prevent)」または「予防する (preventing)」は、数分から不確定の時間期間の間、疾患、障害、もしくは状態の開始または発達を遅延するもしくは未然に防ぐことを指す。予防するはまた、疾患、障害、または状態を発症する危険を低下させることを意味する。

【0135】

「プロドラッグ」は、不活性形態に調製され、内因性の酵素もしくは他の化学物質または条件の作用によって、身体またはその細胞内において、活性形態（すなわち薬物）に変換される、治療薬剤を意味する。

10

【0136】

「上昇させる」は、量を増加することを意味する。例えば、血漿HDLレベルを上昇させることは、血漿中のHDLの量を増加させることを意味する。

【0137】

「低下させる」は、より小さい程度、大きさ、量、または数に下げることの意味する。例えば、血漿トリグリセリドレベルを低下させることは、血漿中のトリグリセリドの量を下げることの意味する。

【0138】

「領域」または「標的領域」は、少なくとも1つの識別可能な構造、機能、または特徴を有する標的核酸の一部と定義される。例えば、標的領域は、3' UTR、5' UTR、エクソン、イントロン、エクソン/イントロン接続部分、コード領域、翻訳開始領域、翻訳終結領域、または他の規定核酸領域を包含し得る。アポ(a)の構造的に定義された領域は、NCBI等の配列データベースからの受託番号により得ることができ、そのような情報は、参照により本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態では、標的領域は、標的領域内の1つの標的セグメントの5' 標的部位から標的領域内の別の標的セグメントの3' 標的部位までの配列を包含し得る。

20

【0139】

「リボヌクレオチド」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、様々な置換基のいずれかで修飾され得る。

【0140】

「第2の薬剤」または「第2の治療剤」は、「第1の薬剤」と組み合わせて使用することができる薬剤を意味する。第2の治療剤は、アポ(a)またはアポBを標的指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み得るが、これに限定されない。第2の薬剤は、抗アポ(a)抗体、アポ(a)ペプチド阻害剤、コレステロール降下剤、脂質降下剤、グルコース降下剤、および抗炎症剤も含み得る。

30

【0141】

「セグメント」は、核酸内の領域のより小さいサブ部分と定義される。例えば、「標的セグメント」は、1つ以上のアンチセンス化合物が標的指向される、標的核酸のヌクレオチドの配列を意味する。「5' 標的部位」は、標的セグメントの最も5' 側のヌクレオチドを指す。「3' 標的部位」は、標的セグメントの最も3' 側のヌクレオチドを指す。代替として、「開始部位」は、標的セグメントの最も5' 側のヌクレオチドを指し、「終止部位」は、標的セグメントの最も3' 側のヌクレオチドを指す。標的セグメントは、1つの配列の「開始部位」で始まり、別の配列の「終止部位」で終わることもできる。

40

【0142】

本明細書に教示されるアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは標的核酸の「短縮」または「先端切断」型は、1つ、2つまたはそれ以上のヌクレオチドが欠失している。

【0143】

「副作用」は、所望の効果以外の治療に起因する生理学的応答を意味する。ある特定の実施形態では、副作用は、注射部位反応、肝機能検査異常、腎機能異常、肝毒性、腎毒性、中枢神経系の異常、ミオパシー、および倦怠感を含む。例えば、血清アミノトランスフ

50

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得る。例えば、ビリルビンの増加は、肝毒性または肝機能異常を示し得る。

【0144】

「1本鎖オリゴヌクレオチド」は、相補鎖へハイブリダイズしないオリゴヌクレオチドを意味する。

【0145】

「特異的にハイブリダイズし得る」は、所望の効果を誘導するのに標的核酸に十分な程度の相補性を有する一方、特異的結合が、所望される条件下、すなわち、体内アッセイおよび療法的治療の場合における生理学的条件下において、非標的核酸に最小限または全く効果を示さない、アンチセンス化合物を指す。

10

【0146】

「スタチン」は、HMG-C o A還元酵素の活性を阻害する薬剤を意味する。

【0147】

「皮下投与」は、皮膚のちょうど下への投与を意味する。

【0148】

「対象」は、治療または療法のために選択されるヒトまたはヒト以外の動物を意味する。

【0149】

「糖部分」は、ヌクレオシドの天然に生じる糖部分または修飾糖部分を意味する。

【0150】

20

「心血管疾患または障害の症状」は、心血管疾患または障害から生じ、それに付随する事象を意味し、その兆候としての役割を果たす。例えば、狭心症、胸痛、息切れ、動悸、脱力感、めまい、悪心、発汗、頻拍、徐脈、不整脈、心房細動、下肢の腫れ、チアノーゼ、疲労、失神、顔面のしびれ、四肢のしびれ、跛行もしくは筋肉の痙攣、腹部の膨満、または発熱は、心血管疾患または障害の症状である。

【0151】

「標的指向する」または「標的指向される」は、標的核酸へ特異的にハイブリダイズして、所望の効果を引き起こすアンチセンス化合物の設計および選択の過程を意味する。

【0152】

「標的核酸」、「標的RNA」、および「標的RNA転写物」はすべて、アンチセンス化合物によって標的指向されることが可能な核酸を指す。

30

【0153】

「治療的有效量」は、個体へ治療利益をもたらす医薬品の量を意味する。

【0154】

「治療的生活様式の変更」は、脂肪／脂肪組織量および／またはコレステロールを降下させることを目的とする食事および生活様式の変更を意味する。そのような変更は、心疾患の発達の危険性を低下させることができ、1日の総カロリー、総脂肪、飽和脂肪、多価不飽和脂肪、一不飽和脂肪、炭水化物、タンパク質、コレステロール、不溶性繊維の食事摂取の推奨、ならびに身体活動の推奨を含み得る。

【0155】

40

「治療する (Treat)」または「治療する (treating)」は、疾患、障害、もしくは状態の変化または改善をもたらすために、本明細書に記載される化合物を投与することを指す。

【0156】

「トリグリセリド」または「TG」は、3つの脂肪酸分子と組み合わされたグリセロールからなる脂質または中性脂肪を意味する。

【0157】

「2型糖尿病」(「2型真性糖尿病」、「真性糖尿病2型」、「非インスリン依存糖尿病」、「NIDDM」、「肥満関連糖尿病」、または「成人発症型糖尿病」としても知られる)は、インスリン耐性、相対的インスリン欠乏、および高血糖症を主に特徴とする代

50

謝障害である。

【0158】

「非修飾ヌクレオチド」は、天然に存在する核酸塩基、糖部分、およびヌクレオシド間結合から構成される、ヌクレオチドを意味する。ある特定の実施形態では、非修飾ヌクレオチドは、RNAヌクレオチド（すなわち、 β -D-リボヌクレオシド）またはDNAヌクレオチド（すなわち、 β -D-デオキシリボヌクレオシド）である。

【0159】

「ウィングセグメント」は、阻害活性の増強、標的核酸への結合親和性の増加、または体内ヌクレアーゼによる分解に対する耐性等の特性をオリゴヌクレオチドに付与するように修飾される1つまたは複数のヌクレオシドを意味する。

10

【0160】

ある特定の実施形態

ある特定の実施形態は、アポ(a) mRNAおよびタンパク質発現を減少させるための化合物および方法を提供する。ある特定の実施形態では、化合物は、アポ(a)関連疾患を治療する、予防する、または寛解させるためのアポ(a)特異的阻害剤である。ある特定の実施形態では、化合物は、アポ(a)を標的指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0161】

ある特定の実施形態は、Lp(a)レベルを減少させるための化合物および方法を提供する。ある特定の実施形態では、化合物は、Lp(a)関連疾患を治療する、予防する、または寛解させるためのアポ(a)特異的阻害剤である。ある特定の実施形態では、化合物は、アポ(a)を標的指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

20

【0162】

ある特定の実施形態は、12~30個の結合されたヌクレオシドからなるアポ(a)を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。ある特定の実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、15~30個、18~24個、19~22個、13~25個、14~25個、15~25個の結合されたヌクレオシドからなる。ある特定の実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、少なくとも20個、少なくとも21個、少なくとも22個、少なくとも23個、少なくとも24個、少なくとも25個、少なくとも26個、少なくとも27個、少なくとも28個、少なくとも29個、または30個の結合されたヌクレオシドを含む。ある特定の実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、20個の結合されたヌクレオシドからなる。

30

【0163】

ある特定の実施形態は、配列番号1~4のいずれかの等長部分に相補的な少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または20個の連続する核酸塩基を含むアポ(a)を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。ある特定の実施形態は、表3~13および28~30に示される標的セグメントのいずれかの等長部分に相補的な少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または20個の連続する核酸塩基を含むアポ(a)セグメントを標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。表において、「開始部位」は、標的セグメントの最も5'側のヌクレオチドを指し、「停止部位」は、標的セグメントの最も3'側のヌクレオチドを指す。標的セグメントは、表に列挙される各配列の開始部位から停止部位の範囲であり得る。代替として、標的セグメントは、1つの配列の開始部位からの範囲であり得、別の配列の停止部位で停止し得る。例えば、表5に示されるように、標的セグメントは、配列番号58の開

40

50

始部位から停止部位の 3901～3920 の範囲であり得る。別の例では、表 5 に示されるように、標的セグメントは、配列番号 57 の開始部位から配列番号 61 の停止部位の 3900～3923 の範囲であり得る。

【0164】

ある特定の実施形態は、アポ (a) を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号 1～4 のいずれかに少なくとも 80 %、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。ある特定の実施形態は、アポ (a) を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、表 3～13 および 28～30 に示される標的セグメントのいずれかに少なくとも 80 %、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。

10

【0165】

ある特定の実施形態は、12～30 個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号 1 の核酸塩基 3901～3920 の等長部分に相補的である少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または 20 個の連続する核酸塩基の一部分を含む核酸塩基配列を含むアポ (a) を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号 1 に少なくとも 80 % 相補的である。

【0166】

20

ある特定の実施形態は、12～30 個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号 1 の核酸塩基 3900～3923 の等長部分に相補的である少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、少なくとも 24 個、少なくとも 25 個、少なくとも 26 個、少なくとも 27 個、少なくとも 28 個、少なくとも 29 個、または 30 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を含むアポ (a) を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、配列番号 1 に少なくとも 80 % 相補的である。

30

【0167】

ある特定の実施形態は、12～30 個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号 12～130、133、134 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または 20 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するアポ (a) を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。ある特定の実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号 12～130、133、134 の核酸塩基配列のうちのいずれか 1 つの少なくとも 8 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

40

【0168】

ある特定の実施形態は、12～30 個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号 12～20、22～33、35～44、47～50、51、53、57～62、65～66、68、70～79、81、85～86、89～90、92～94、97、105～110、103～104、133～134 の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、少なくとも 12 個、少なくとも 13 個、少なくとも 14 個、少なくとも 15 個、少なくとも 16 個、少なくとも 17 個、少なくとも 18 個、少なくとも 19 個、または 20 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するアポ (a) を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

50

【0169】

ある特定の実施形態は、12～30個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号12～19、26～30、32、35、38～44、46～47、50、57～58、61、64～66、68、72～74、76～77、92～94、103～110の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するアポ（a）を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0170】

ある特定の実施形態は、12～30個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号111、114～121、123～129の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するアポ（a）を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0171】

ある特定の実施形態は、12～30個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号14、17、18、26～28、39、71、106～107の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するアポ（a）を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0172】

ある特定の実施形態は、12～30個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号14、26～29、39～40、82の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するアポ（a）を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0173】

ある特定の実施形態は、12～30個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号14、16～18の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するアポ（a）を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0174】

ある特定の実施形態は、12～30個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号26～27、107の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するアポ（a）を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0175】

ある特定の実施形態は、12～30個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号28～29、39～40、47の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、

10

20

30

40

50

少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するアポ(a)を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0176】

ある特定の実施形態は、12~30個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号28、93、104、134の核酸塩基配列のいずれかの少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するアポ(a)を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

10

【0177】

ある特定の実施形態は、12~30個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号58の核酸塩基配列の少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個、少なくとも19個、または20個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有するアポ(a)を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0178】

ある特定の実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号58の核酸塩基配列の少なくとも8個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する。

20

【0179】

ある特定の実施形態は、アポ(a)を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドは、1本鎖である。

【0180】

ある特定の実施形態は、アポ(a)を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、少なくとも1つのヌクレオシド間結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。ある特定の実施形態では、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

【0181】

ある特定の実施形態は、アポ(a)を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、少なくとも1つのヌクレオシドは、修飾核酸塩基を含む。ある特定の実施形態では、修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンである。

30

【0182】

ある特定の実施形態は、アポ(a)を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾糖を含む。ある特定の実施形態では、修飾糖は、二環式糖である。ある特定の実施形態では、修飾糖は、2'-O-メトキシエチル、拘束エチル、3'-フルオロ-HNA、または4'-(CH₂)_n-O-2'架橋を含み、nは、1または2である。

【0183】

ある特定の実施形態は、アポ(a)を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドは、12~30個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ(a)結合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)結合されたヌクレオシドからなる5'ウィングセグメント、(c)結合されたヌクレオシドからなる3'ウィングセグメントを含み、ギャップセグメントは、5'ウィングセグメントと3'ウィングセグメントとの間に位置付けられ、かつ各ウィングセグメントの各ヌクレオシドは、修飾糖を含む。

40

【0184】

ある特定の実施形態は、アポ(a)を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドは、20個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ(a)10個の結合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)

50

5 個の結合されたヌクレオシドからなる 5' ウィングセグメント、(c) 5 個の結合されたヌクレオシドからなる 3' ウィングセグメントを含み、ギャップセグメントは、5' ウィングセグメントと 3' ウィングセグメントとの間に位置付けられ、各ウィ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、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、かつ各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。

【0185】

ある特定の実施形態は、アポ (a) を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドは、20 個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号 12~130、133、134 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し、修飾オリゴヌクレオチドは、(a) 10 個の結合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) 5 個の結合されたヌクレオシドからなる 5' ウィングセグメント、(c) 5 個の結合されたヌクレオシドからなる 3' ウィングセグメントを含み、ギャップセグメントは、5' ウィングセグメントと 3' ウィングセグメントとの間に位置付けられ、各ウィ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、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、かつ各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。

10

【0186】

ある特定の実施形態は、アポ (a) を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供し、修飾オリゴヌクレオチドは、20 個の結合されたヌクレオシドからなり、かつ配列番号 58 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し、修飾オリゴヌクレオチドは、(a) 10 個の結合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) 5 個の結合されたヌクレオシドからなる 5' ウィングセグメント、(c) 5 個の結合されたヌクレオシドからなる 3' ウィングセグメントを含み、ギャップセグメントは、5' ウィングセグメントと 3' ウィングセグメントとの間に位置付けられ、各ウィ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、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、かつ各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。

20

【0187】

ある特定の実施形態は、アポ (a) を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドを提供し、修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号 58 の核酸塩基配列を有する 20 個の結合されたヌクレオシドからなり、修飾オリゴヌクレオチドは、(a) 10 個の結合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) 5 個の結合されたヌクレオシドからなる 5' ウィングセグメント、(c) 5 個の結合されたヌクレオシドからなる 3' ウィングセグメントを含み、ギャップセグメントは、5' ウィングセグメントと 3' ウィングセグメントとの間に位置付けられ、各ウィ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、各ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合であり、かつ各シトシン残基は、5-メチルシトシンである。

30

【0188】

ある特定の実施形態では、化合物は塩形態である。さらなる実施形態では、化合物は、薬学的に許容される担体または希釈剤をさらに含む。ある特定の実施形態では、化合物は、アポ (a) を標的指向する修飾オリゴヌクレオチド、またはその塩、および薬学的に許容される担体もしくは希釈剤を含む。

40

【0189】

ある特定の実施形態は、本明細書に記載される化合物を含む組成物を提供し、化合物の粘度レベルは、40 センチポアズ (cP) 未満である。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるアンチセンス化合物は、実施例 13 に記載されるパラメータによって測定されるとき、40 cP 未満、35 cP 未満、30 cP 未満、25 cP 未満、20 cP 未満、または 15 cP 未満の粘度を有することによって有効である。

【0190】

ある特定の実施形態は、アポ (a) 関連疾患、障害、または状態を治療するための療法

50

に使用するための組成物および方法を提供する。ある特定の実施形態は、Lp(a) 関連疾患、障害、または状態を治療するための療法に使用するための組成物および方法を提供する。ある特定の実施形態では、組成物は、アポ(a) 特異的阻害剤を含む化合物である。ある特定の実施形態では、アポ(a) 特異的阻害剤は、核酸である。ある特定の実施形態では、核酸は、アンチセンス化合物である。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物は、アポ(a) を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドである。ある特定の実施形態では、アポ(a) を標的指向する修飾オリゴヌクレオチドは、心血管および／または代謝疾患、障害、または状態を治療する、予防する、その進行を緩慢にさせる、または寛解させるのに使用される。ある特定の実施形態では、療法のための組成物および方法は、アポ(a) 特異的阻害剤を、それを必要とする個体に投与することを含む。

10

【0191】

ある特定の実施形態は、アポ(a) レベルを低下させるための組成物および方法を提供する。ある特定の実施形態は、Lp(a) レベルを低下させるための組成物および方法を提供する。ある特定の実施形態では、組織、臓器、または対象におけるアポ(a) レベルを低下させることにより、LDLのHDLに対する比率、またはTGのHDLに対する比率を改善する。

【0192】

ある特定の実施形態は、アポ(a) 関連疾患、障害、および状態を予防する、治療する、遅延させる、その進行を緩慢にさせる、および／または寛解させるための組成物および方法を、それを必要とする対象に提供する。ある特定の実施形態は、Lp(a) 関連疾患、障害、および状態を予防する、治療する、遅延させる、その進行を緩慢にさせる、および／または寛解させるための組成物および方法を、それを必要とする対象に提供する。ある特定の実施形態では、そのような疾患、障害、および状態は、心血管、および／または代謝疾患、障害、および状態を含む。ある特定のそのような心血管疾患、障害、または状態は、動脈瘤（例えば腹部大動脈瘤）、狭心症、不整脈、粥状動脈硬化、脳血管疾患、冠動脈疾患、冠動脈心疾患、脂質異常症、高コレステロール血症、高脂血症、高血圧、高トリグリセリド血症、心筋梗塞、末梢血管疾患（例えば末梢動脈疾患、末梢動脈閉塞性疾患）網膜血管閉塞、または脳卒中を含むが、これらに限定されない。ある特定のそのような代謝疾患、障害、または状態は、高血糖症、前糖尿病、糖尿病（1型および2型）、肥満、インスリン耐性、代謝症候群、および糖尿病性脂質異常症を含むが、これらに限定されない。ある特定のそのような炎症性疾患、障害、または状態は、冠動脈疾患（coronary artery disease）（CAD）、アルツハイマー病、および血栓塞栓疾患、障害、または状態を含むが、これらに限定されない。ある特定の血栓塞栓疾患、障害、または状態は、脳卒中、血栓症（例えば静脈血栓塞栓症）、心筋梗塞、および末梢血管疾患を含むが、これらに限定されない。

20

30

【0193】

ある特定の実施形態は、心血管疾患、障害、または状態の少なくとも1つの症状を低下させる方法を提供する。ある特定の実施形態では、症状は、狭心症、胸痛、息切れ、動悸、脱力感、めまい、悪心、発汗、頻拍、徐脈、不整脈、心房細動、下肢の腫れ、チアノーゼ、疲労、失神、顔面のしびれ、四肢のしびれ、跛行もしくは筋肉の痙攣、腹部の膨満、および発熱を含むが、これらに限定されない。

40

【0194】

ある特定の実施形態では、アポ(a) またはLp(a) 発現の調節は、細胞、組織、または臓器で生じる。ある特定の実施形態では、調節は、動物の細胞、組織、または臓器で生じる。ある特定の実施形態では、調節は、アポ(a) mRNAレベルの低下である。ある特定の実施形態では、調節は、アポ(a) タンパク質レベルの低下である。ある特定の実施形態では、アポ(a) mRNAおよびタンパク質レベルの両方が低下する。ある特定の実施形態では、調節は、Lp(a) レベルの低下である。そのような低下は、時間依存または用量依存様式で生じ得る。

【0195】

50

ある特定の実施形態では、対象または動物は、ヒトである。

【0196】

ある特定の実施形態では、化合物は、非経口的に投与される。さらなる実施形態では、非経口投与は、皮下である。

【0197】

ある特定の実施形態では、化合物は、第2の薬剤または療法と同時投与される。ある特定の実施形態では、第2の薬剤は、グルコース降下剤である。ある特定の実施形態では、第2の薬剤は、LDL、TG、またはコレステロール降下剤である。ある特定の実施形態では、第2の薬剤は、抗炎症剤である。ある特定の実施形態では、第2の薬剤は、アルツハイマー病治療薬である。ある特定の実施形態では、第2の薬剤は、非ステロイド性抗炎症性薬物（NSAID、例えばアスピリン）、ナイアシン（例えばNiaspan）、ニコチン酸、アポB阻害剤（ミボメルセン）、CETP阻害剤（例えばAnacetrapib）、アポ（a）阻害剤、甲状腺ホルモン類似体（例えばEprotirome）、HMG-CoA還元酵素阻害剤（例えばスタチン）、フィブラート（例えばGemfibrozil）、およびミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質阻害剤（例えばLomitapide）であり得るが、これらに限定されない。療法は、Lp（a）アフェレシスであり得るが、これに限定されない。薬剤または療法は、同時投与されるか、または併用して投与され得る。薬剤または療法は、経時的に、または引き続き投与され得る。

10

【0198】

ある特定の実施形態は、動物におけるアポ（a）レベルを減少させるために、アポ（a）に対して標的指向される化合物の使用を提供する。ある特定の実施形態は、動物におけるLp（a）レベルを減少させるために、アポ（a）に対して標的指向される化合物の使用を提供する。ある特定の実施形態は、アポ（a）に関連する疾患、障害、または状態を治療する、予防する、または寛解させるために、アポ（a）に対して標的指向される化合物の使用を提供する。ある特定の実施形態は、Lp（a）に関連する疾患、障害、または状態を治療する、予防する、または寛解させるために、アポ（a）に対して標的指向される化合物の使用を提供する。

20

【0199】

ある特定の実施形態は、動物におけるアポ（a）レベルを減少させるための薬剤の調製において、アポ（a）に対して標的指向される化合物の使用を提供する。ある特定の実施形態は、動物におけるLp（a）レベルを減少させるための薬剤の調製において、アポ（a）に対して標的指向される化合物の使用を提供する。ある特定の実施形態は、アポ（a）に関連する疾患、障害、または状態を治療する、予防する、または寛解させるために、薬剤の調製のための化合物の使用を提供する。ある特定の実施形態は、Lp（a）に関連する疾患、障害、または状態を治療する、予防する、または寛解させるために、薬剤の調製のための化合物の使用を提供する。

30

【0200】

ある特定の実施形態は、本明細書に記載される疾患、障害、または状態を治療する、予防するまたは寛解させるためのキットを提供し、キットは、（i）本明細書に記載されるアポ（a）特異的阻害剤、および任意に（ii）本明細書に記載される第2の薬剤または療法を含む。

40

【0201】

本発明のキットは、本明細書に記載される併用療法により、本明細書に記載される疾患、障害、または状態を治療する、予防する、または寛解させるためのキットを使用するための説明書をさらに含み得る。

【0202】

アンチセンス化合物

オリゴマー化合物は、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体、アンチセンス化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、マイクロRNA、およびsiRNAを含むが、これらに限定されない。

50

オリゴマー化合物は、標的核酸に「アンチセンス」であってよく、水素結合を介して標的核酸とハイブリダーゼーションを起こすことが可能であることを意味する。

【0203】

ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物は、5'から3'方向に書かれる時、標的指向される、標的核酸の標的セグメントの逆補体を含む、核酸塩基配列を有する。ある特定のかかる実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'から3'方向に書かれる時、標的指向される、標的核酸の標的セグメントの逆補体を含む、核酸塩基配列を有する。

【0204】

ある特定の実施形態では、アポ (a) 核酸に対して標的指向されるアンチセンス化合物は、長さが12～30個のサブユニットである。言い換えると、そのようなアンチセンス化合物は、12～30個の結合されたサブユニットである。他の実施形態では、アンチセンス化合物は、8～80個、10～80個、12～50個、15～30個、18～24個、19～22個、13～25個、14～25個、または15～25個の結合されたサブユニットである。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は、長さが8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個、50個、51個、52個、53個、54個、55個、56個、57個、58個、59個、60個、61個、62個、63個、64個、65個、66個、67個、68個、69個、70個、71個、72個、73個、74個、75個、76個、77個、78個、79個、または80個の結合されたサブユニットであるか、または上記の値のうちの任意の2つによって画定される範囲である。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は、長さが8個の結合されたサブユニットである。いくつかの実施形態では、アンチセンス化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、結合されるサブユニットは、ヌクレオシドである。

【0205】

ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物は、短縮または先端切断された修飾オリゴヌクレオチドを含む。短縮または先端切断された修飾オリゴヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオシドが5'端(5'先端切断)から欠失されているか、1つ以上のヌクレオシドが3'端(3'先端切断)から欠失されているか、または1つ以上のヌクレオシドが中央部から欠失されていてよい。代替として、欠失されたヌクレオシドは、修飾オリゴヌクレオチド全体に分散してもよく、例えば、あるアンチセンス化合物では、1個のヌクレオシドが、5'端から欠失され、1個のヌクレオシドが、3'端から欠失されている。

【0206】

延長されたオリゴヌクレオチド中に単一の付加ヌクレオシドが存在するとき、付加ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドの中央部、5'、または3'端に位置してよい。2つ以上の付加ヌクレオシドが存在するとき、付加されたヌクレオシドは、互いに隣接してよく、例えば、あるオリゴヌクレオチドでは、2つのヌクレオシドがオリゴヌクレオチドの中央部、5'端へ付加(5'付加)されるか、または代替として、3'端へ付加(3'付加)される。代替として、付加されたヌクレオシドは、アンチセンス化合物全体に分散してよく、例えば、あるオリゴヌクレオチドでは、1つのヌクレオシドが5'端へ付加され、1つのサブユニットが3'端へ付加される。

【0207】

活性を消失させることなく、アンチセンスオリゴヌクレオチドのようなアンチセンス化合物の長さを増加あるいは減少させること、および／またはミスマッチ塩基を導入することが可能である。例えば、Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992)では、長さが13～25核酸塩基の一連のアンチセンスオリゴヌクレオチドについて、卵母細胞注入モデルにおいて標的

R N Aの切断を誘導するその能力が試験された。アンチセンスオリゴヌクレオチドの末端付近に8または11のミスマッチ塩基がある、長さが25核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ミスマッチを含有しないアンチセンスオリゴヌクレオチドより低い程度であったが、標的m R N Aの特異的な切断を指令することができた。同様に、1または3つのミスマッチがあるものが含まれる、13核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して、標的の特異的な切断が達成された。

【0208】

G a u t s c h i e t a l (J. Nat l. Cancer Inst. 93:463-471, March 2001)は、b c l-2 m R N Aへの100%相補性を有して、b c l-x L m R N A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 10
さらに、このオリゴヌクレオチドは、強力な抗腫瘍活性を体内で明示した。

【0209】

M a h e r a n d D o l n i c k (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988)は、一連のタンデム14核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドと、このタンデムアンチセンスオリゴヌクレオチドの2または3の配列より構成される、各々28および42の核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドについて、ウサギ網 20
状赤血球アッセイにおいてヒトD H F Rの翻訳を阻止するその能力を試験した。3つの14核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドの各々は、28または42の核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドより控え目なレベルであるものの、単独で翻訳を阻害することができた。

【0210】

アンチセンス化合物モチーフ

ある特定の実施形態では、アポ(a)核酸に対して標的指向されるアンチセンス化合物は、阻害活性の増強、標的核酸への結合親和性の増加、または体内ヌクレアーゼによる分解への耐性等の特性をアンチセンス化合物へ付与する、パターン配置された化学修飾サブ 30
ユニットまたはモチーフを有する。

【0211】

キメラアンチセンス化合物は、典型的には、ヌクレアーゼ分解への抵抗性増加、細胞取り込み増加、標的核酸への結合親和性の増加、および／または抑制活性の増加を付与する 30
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、任意に、R N A : D N A二重鎖のR N A鎖を切断する、細胞性エンドヌクレアーゼR N a s e Hの基質としての役割を果たしてもよい。

【0212】

ギャップマーモチーフを有する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、R N a s e H切断を支援する複数のヌクレオチドを有する内部領域が、内部領域のヌクレオシドとは化学的に異なる複数のヌクレオチドを有する外部領域間に位置する。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、ウィングセグメントが修飾ヌクレオシドを含むのに対し、ギャップセグメントは、概して、エンドヌクレアーゼ切断の基質としての役割を果たす。ある特定の実施形態では、ギャップマーの領域は、各々異なる領域を含む糖部分の種類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種類として、いくつかの実施形態では、β-D-リボヌクレオシド、β-D-デオキシリボヌクレオシド、2'修飾ヌクレオシド(かかる2'修飾ヌクレオシドは、とりわけ、2'-M O E、および2'-O-C H₃を含んでもよい)、および二環式糖修飾ヌクレオシド(かかる二環式糖修飾ヌクレオシドは、4'-(C H₂)_n-O-2'架橋を有するものを含んでもよく、ここでは、n=1またはn=2である)が挙げられ得る。好ましくは、各異なる領域は、均一の糖部分を含む。ウィング-ギャップ-ウィングモチーフは、多くの場合、「X-Y-Z」と記載され、ここでは、「X」は、5'ウィング領域の長さを表し、「Y」は、ギャップ領域の長さを表し、「Z」は、3'ウィング領域の長さを表す。本明細書で使用されるとき、「 40 50

X-Y-Z」として記載されるギャップマーは、ギャップセグメントが、5'ウィングセグメントおよび3'ウィングセグメントの各々に直接隣接して位置付けられるような構成を有する。したがって、5'ウィングセグメントとギャップセグメントとの間、またはギャップセグメントと3'ウィングセグメントとの間に介在ヌクレオチドは存在しない。本明細書で説明されるアンチセンス化合物のいずれも、ギャップマーモチーフを有する可能性がある。いくつかの実施形態では、XおよびZは、同一であって、他の実施形態では、異なる。好ましい実施形態では、Yは、8から15のヌクレオチドである。X、Y、またはZは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個以上のヌクレオチドのいずれかであり得る。したがって、ギャップマーは、例えば、5-10-5、4-8-4、4-12-3、4-12-4、3-14-3、2-13-5、2-12-2、2-16-2、1-18-1、3-10-3、2-10-2、1-10-1、2-8-2、6-8-6、5-8-5、1-8-1、2-6-2、2-13-2、1-8-2、2-8-3、3-10-2、1-18-2、または2-18-2を含むが、それらに限定されない。

10

【0213】

ある特定の実施形態では、「ウィングマー」モチーフとしてのアンチセンス化合物は、ウィングーギャップまたはギャップーウィング構成、すなわち、ギャップマー構成について上記に説明されるようなX-YまたはY-Z構成を有する。したがって、ウィングマー構成は、例えば、5-10、8-4、4-12、12-4、3-14、16-2、18-1、10-3、2-10、1-10、8-2、2-13、または5-13を含むが、これらに限定されない。

20

【0214】

ある特定の実施形態では、アポ(a)核酸に対して標的指向されるアンチセンス化合物は、5-10-5ギャップマーモチーフを保有する。

【0215】

ある特定の実施形態では、アポ(a)核酸に対して標的指向されるアンチセンス化合物は、ギャップ拡張モチーフを有する。

【0216】

標的核酸、標的領域、およびヌクレオチド配列

30

アポ(a)標的配列をコードするヌクレオチド配列は、次の：配列番号1として本明細書に組み込まれるGENBANK受託番号NM_005577.2、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3230000~3380000が先端切断されたGENBANK受託番号NT_007422.12、配列番号3として本明細書に示されるヌクレオチド65120000~65258000が先端切断されたGENBANK受託番号NT_025741.15、および配列番号4として本明細書に組み込まれるGENBANK受託番号NM_005577.1を含むが、これらに限定されない。

【0217】

本明細書に含有される実施例において、各配列番号に記載される配列は、糖部分、ヌクレオシド間結合、または核酸塩基に対するどの修飾とも無関係であると理解されたい。したがって、配列番号によって定義されるアンチセンス化合物は、糖部分、ヌクレオシド間結合、または核酸塩基に対する1つ以上の修飾を独立的に含んでよい。Issis番号(Issis No.)によって記載されるアンチセンス化合物は、核酸塩基配列およびモチーフの組み合わせを示す。

40

【0218】

ある特定の実施形態では、「標的領域」は、標的核酸の構造的に規定される領域である。例えば、標的領域は、3'UTR、5'UTR、エクソン、イントロン、エクソン/イントロン接続部分、コーディング領域、翻訳開始領域、翻訳終結領域、または他の規定核酸領域を包含し得る。アポ(a)の構造的に定義された領域は、NCBI等の配列データ

50

ベースからの受託番号により得ることができ、そのような情報は、参照により本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態では、標的領域は、標的領域内の1つの標的セグメントの5'標的部位から同一標的領域内の別の標的セグメントの3'標的部位までの配列を包含し得る。

【0219】

ある特定の実施形態では、「標的セグメント」は、核酸内の標的領域のより小さいサブ部分である。例えば、標的セグメントは、1つ以上のアンチセンス化合物が標的指向される標的核酸のヌクレオチドの配列であってよい。「5'標的部位」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」は、標的セグメントの最も3'側のヌクレオチドを指す。

10

【0220】

標的領域は、1つ以上の標的セグメントを含有し得る。標的領域内の複数の標的セグメントは重複することができる。代替として、それらは重複しなくてよい。ある特定の実施形態では、標的領域内の標的セグメントは、約300個以下のヌクレオチドによって分離される。ある特定の実施形態では、標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上のいくつかの、すなわち、約250個、200個、150個、100個、90個、80個、70個、60個、50個、40個、30個、20個、または10個のヌクレオチドである、それ以下である、約それ以下である、または先行値の任意の2つによって規定される範囲であるヌクレオチドによって分離される。ある特定の実施形態では、標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上の5以下、または約5以下のヌクレオチドによって分離される。ある特定の実施形態では、標的セグメントは連続的である。本明細書に列挙される5'標的部位または3'標的部位のいずれかである、開始核酸を有する範囲によって規定される標的領域が企図される。

20

【0221】

標的指向することには、所望の効果が生じるようにアンチセンス化合物がハイブリダイズする、少なくとも1つの標的セグメントの決定が含まれる。ある特定の実施形態では、所望の効果は、mRNA標的核酸レベルの低下である。ある特定の実施形態では、所望の効果は、標的核酸によってコードされるタンパク質のレベルの低下、または標的核酸に関連した表現型の変化である。

【0222】

好適な標的セグメントは、5'UTR、コーディング領域、3'UTR、イントロン、エクソン、またはエクソン/イントロン接続部分内に見出され得る。開始コドンまたは終止コドンを含む標的セグメントも、好適な標的セグメントである。好適な標的セグメントには、開始コドンまたは終止コドンのような、ある構造的に規定される領域が特異的に排除されてよい。

30

【0223】

好適な標的セグメントの決定は、標的核酸の配列を他の配列とゲノム全体で比較することを含めてもよい。例えば、BLASTアルゴリズムを使用して、異なる核酸の間で類似した領域を同定することができる。この比較により、選択される標的核酸以外の配列（すなわち、非標的または標的外配列）に非特異的な様式でハイブリダイズし得るアンチセンス化合物配列の選択を防止することができる。

40

【0224】

アンチセンス化合物の活性（例えば、標的核酸レベルの低下パーセントによって定義されるような）には、活性標的領域内で変動があり得る。ある特定の実施形態では、アポ（a）mRNAレベルの低下は、アポ（a）発現の障害を示す。アポ（a）タンパク質レベルの低下は、標的mRNA発現の障害を示す。さらに、表現型の変化が、アポ（a）発現の障害を示す。例えばHDLレベルにおける増加、LDLレベルにおける減少、コレステロールレベルにおける減少、またはトリグリセリドレベルにおける減少は、とりわけアポ（a）発現の障害のために評価され得る表現型の変化である。他の表現型の兆候、例えば心血管疾患に関連する症状、例えば、狭心症、胸痛、息切れ、動悸、脱力感、めまい、悪

50

心、発汗、頻拍、徐脈、不整脈、心房細動、下肢の腫れ、チアノーゼ、疲労、失神、顔面のしびれ、四肢のしびれ、跛行もしくは筋肉の痙攣、腹部の膨満、および発熱も評価され得る。

【0225】

ハイブリダイゼーション

いくつかの実施形態では、ハイブリダイゼーションは、本明細書に開示されるアンチセンス化合物とアポ（a）核酸との間で生じる。ハイブリダイゼーションの最も一般的な機序は、核酸分子の相補的な核酸塩基間での水素結合（例、ワトソン・クリック、フーグスティーン、または逆フーグスティーン水素結合）を伴う。

【0226】

ハイブリダイゼーションは、多様な条件の下で起こり得る。ストリンジェント条件は、配列依存的であり、ハイブリダイズされる核酸分子の性質および組成によって決定される。

【0227】

配列が標的核酸と特異的にハイブリダイズ可能であるかどうかを決定する方法は、当技術分野において公知である（Sambrooke and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., 2001）。ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるアンチセンス化合物は、アポ（a）核酸と特異的にハイブリダイズ可能である。

【0228】

相補性

アンチセンス化合物と標的核酸は、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、アポ（a）核酸等の標的核酸のアンチセンス阻害）が生じるように、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とき、互いに相補的である。

【0229】

アンチセンス化合物とアポ（a）核酸との間の非相補的な核酸塩基は、アンチセンス化合物が標的核酸と特異的にハイブリダイズすることが可能なままであれば、忍容される場合がある。さらに、アンチセンス化合物は、介在または隣接セグメント（例えば、ループ構造、ミスマッチ、またはヘアピン構造）がハイブリダイゼーション事象に関与しないように、アポ（a）核酸の1つ以上のセグメントにわたってハイブリダイズすることができる。

【0230】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるアンチセンス化合物、またはその特定部分は、アポ（a）核酸、標的領域、標的セグメント、またはその特定部分に、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%、または少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%相補的である。アンチセンス化合物の標的核酸との相補性パーセントは、常法を使用して定量化することができる。

【0231】

例えば、アンチセンス化合物の20核酸塩基のうち18が標的領域に相補的であり、したがって、特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物は、90パーセントの相補性を表すだろう。本例では、残る非相補的な核酸塩基は、密集していても、相補的な核酸塩基とともに分散されてもよく、互いに、または相補的な核酸塩基に連続している必要はない。したがって、長さが18個の核酸塩基であり、標的核酸との完全な相補性の2つの領域によって隣接されている4つの非相補的な核酸塩基を有するアンチセンス化合物は、標的核酸と77.8%の全体相補性を有するので、本発明の範囲に入るだろう。標的核酸の領域と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公知のBLASTプログラム（基本ローカルアライメント検索ツール）およびPowerBLASTプログ

10

20

30

40

50

ラム (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656) を使用して、常法により定量化することができる。相同性パーセント、配列同一性、または相補性は、例えば、Smith および Waterman のアルゴリズム (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489) を用いたデフォルト設定を使用するギャッププログラム (ウィスコンシン配列解析パッケージ、バージョン 8、Unix 用、Genetics Computer Group、University Research Park、ウィスコンシン州マディソン) によって定量化することができる。

【0232】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるアンチセンス化合物またはその特定部分は、標的核酸またはその特定部分に完全に相補的（すなわち、100%相補的）である。例えば、アンチセンス化合物は、アポ（a）核酸、または標的領域、または標的セグメント、またはその標的配列に完全に相補的であり得る。本明細書で使用されるとき、「完全に相補的」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ことが可能であることを意味する。例えば、20 核酸塩基アンチセンス化合物は、アンチセンス化合物に完全に相補的である標的核酸の対応する 20 核酸塩基部分が存在する限り、400 核酸塩基長である標的配列に完全に相補的である。完全に相補的はまた、第 1 のおよび／または第 2 の核酸の特定部分を参照して使用することができる。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 核酸塩基長である標的配列に「完全に相補的」であり得る。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 核酸塩基部分を有する場合、標的配列に完全に相補的であって、各核酸塩基は、アンチセンス化合物の 20 核酸塩基部分に相補的である。同時に、30 核酸塩基アンチセンス化合物全体は、そのアンチセンス化合物の残る 10 核酸塩基も標的配列に相補的であるかどうか依存して、標的配列に完全に相補的であり得るか、またはあり得ない。

【0233】

非相補的核酸塩基（複数可）の場所は、アンチセンス化合物の 5' 端または 3' 端であり得る。代替として、非相補的核酸塩基（複数可）は、アンチセンス化合物の内部位置にあってよい。2 つ以上の非相補的核酸塩基が存在するとき、それらは、連続的（すなわち、結合される）または非連続的であってもよい。一実施形態では、非相補的核酸塩基は、ギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドのウィングセグメント内に位置する。

【0234】

ある特定の実施形態では、長さが 12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、または 20 個の核酸塩基であるか、またはそれ以下であるアンチセンス化合物は、アポ（a）核酸等の標的核酸またはその特定部分に対して、4 個以下、3 個以下、2 個以下、または 1 個以下の非相補的な核酸塩基（複数可）を含む。

【0235】

ある特定の実施形態では、長さが 12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、26 個、27 個、28 個、29 個、または 30 個の核酸塩基であるか、またはそれ以下であるアンチセンス化合物は、アポ（a）核酸等の標的核酸またはその特定部分に対して、6 個以下、5 個以下、4 個以下、3 個以下、2 個以下、または 1 個以下の非相補的な核酸塩基（複数可）を含む。

【0236】

本明細書に提供されるアンチセンス化合物には、標的核酸の一部に相補的であるものも含まれる。本明細書で使用されるとき、「部分」は、標的核酸の領域またはセグメント内にある一定数の連続する（すなわち、結合された）核酸塩基を指す。「部分」はまた、アンチセンス化合物の一定数の連続する核酸塩基を指し得る。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも 8 つの核酸塩基部分に相補的である

。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも12の核酸塩基部分に相補的である。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも15の核酸塩基部分に相補的である。また、企図されるのは、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、またはそれ以上、あるいはこれらの値の任意の2つによって画定される範囲の核酸塩基部分に相補的であるアンチセンス化合物である。

【0237】

同一性

本明細書に提供されるアンチセンス化合物はまた、特別なヌクレオチド配列、配列番号、または特定のI s i s番号によって表される化合物、あるいはその部分に対して一定の同一性パーセントを有し得る。本明細書で使用されるとき、アンチセンス化合物は、同一核酸塩基対合能力を有する場合、本明細書に開示される配列と同一である。例えば、開示されるDNA配列においてチミジンの代わりにウラシルを含有するRNAは、ウラシルとチミジンが共にアデニンと対合するので、そのDNA配列と同一であるとみなされよう。本明細書で説明されるアンチセンス化合物の短縮または延長バージョン、ならびに本明細書に提供されるアンチセンス化合物に対して非同一の塩基を有する化合物も企図される。この非同一の塩基は、互いに隣接していても、またはアンチセンス化合物全体に分散していてもよい。アンチセンス化合物の同一性パーセントは、比較される配列に対する、同一の塩基対合を有する塩基の数に従って計算される。

【0238】

ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物またはその部分は、本明細書に開示されるアンチセンス化合物または配列番号またはその部分のうちの1つ以上に対して、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である。

【0239】

ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物の一部は、標的核酸の等長部分と比較される。あ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、24、25、26、27、28、29、または30核酸塩基部分は、標的核酸の等長部分と比較される。

【0240】

ある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は、標的核酸の等長部分と比較される。あ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、25、26、27、28、29、または30核酸塩基部分は、標的核酸の等長部分と比較される。

【0241】

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（塩基としても知られる）部分は、通常、ヘテロ環塩基部分である。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では、リン酸基は、糖の2'、3'または5'ヒドロキシル部分に結合することができる。オリゴヌクレオチドは、相互に隣接するヌクレオシドの共有結合を通して形成され、線状のポリマーオリゴヌクレオチドを形成する。オリゴヌクレオチド構造の内部で、リン酸基は、一般に、オリゴヌクレオチドのヌクレオシド間連結を形成すると称される。

【0242】

アンチセンス化合物への修飾には、ヌクレオシド間連結、糖部分、または核酸塩基への置換あるいは変化を包含する。修飾アンチセンス化合物は、多くの場合、例えば、細胞取り込みの増強、核酸標的への親和性の増強、ヌクレアーゼの存在下での安定性の増加、または抑制活性の増加のような望ましい特性のために、天然型に優って好ましい。

【0243】

化学修飾ヌクレオシドはまた、短縮または先端切断アンチセンスオリゴヌクレオチドのその標的核酸への結合親和性を増加させるために利用し得る。結果として、かかる化学修飾ヌクレオシドを有する、より短いアンチセンス化合物では、多くの場合、同等の結果を得ることができる。

【0244】

修飾ヌクレオシド間結合

RNAおよびDNAの天然に存在するヌクレオシド間結合は、3'から5'のホスホジエステル結合である。1つ以上の修飾、すなわち、非天然に存在する、ヌクレオシド間結合を有するアンチセンス化合物は、多くの場合、例えば、細胞取り込みの増強、核酸標的への親和性の増強、およびヌクレアーゼの存在下での安定性の増加のような望ましい特性のために、天然に存在するヌクレオシド間連結を有するアンチセンス化合物に優って選択される。

10

【0245】

修飾ヌクレオシド間連結を有するオリゴヌクレオチドには、リン原子を保持するヌクレオシド間連結、ならびにリン原子を有さないヌクレオシド間連結を含む。代表的なリン含有ヌクレオシド間連結として、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、ホスホロアミデート、およびホスホロチオエートが挙げられるが、それらに限定されない。リン含有および非リン含有の結合の製造の方法は、公知である。

【0246】

ある特定の実施形態では、アポ(a)核酸に対して標的指向されるアンチセンス化合物は、1つ以上の修飾ヌクレオシド間結合を含む。ある特定の実施形態では、修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である。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結合は、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

20

【0247】

修飾糖部分

本発明のアンチセンス化合物は、任意に、糖基が修飾された1つ以上のヌクレオシドを含有することができる。かかる糖修飾ヌクレオシドは、ヌクレアーゼ安定性の増強、結合親和性の増加、または他の何らかの有益な生物学的特性をアンチセンス化合物へ付与し得る。ある特定の実施形態では、ヌクレオシドは、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としては、置換基(5'および2'置換基を含む)の付加、二環式核酸(BNA)を形成するためのノンジェミナル環原子の架橋、リボシル環酸素原子のS、N(R)、またはC(R₁)(R₂)(R, R₁および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)での置き換え、およびそれらの組み合わせが挙げられるが、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(他の開示された5', 2'-ビス置換ヌクレオシドについての2008年8月21日公開のPCT国際出願国際公開第2008/101157号を参照)、またはリボシル環酸素原子のSでの置き換えと2'位でのさらなる置換(2005年6月16日公開の公開米国特許出願第2005-0130923号を参照)、または代替として、BNAの5'置換(2007年11月22日公開のPCT国際出願国際公開第2007/134181号を参照。ここでLNAは、例えば5'-メチルまたは5'-ビニル基で置換される)が挙げられる。

30

【0248】

修飾糖部分を有するヌクレオシドの例としては、5'-ビニル、5'-メチル(RまたはS)、4'-S、2'-F、2'-OCH₃、2'-OCH₂CH₃、2'-OCH₂CH₂F、および2'-O(CH₂)₂OCH₃置換基を含むヌクレオシドが挙げられるが、これらに限定されない。2'位での置換基はまた、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)、およびO-CH₂-C(=O)-N(R₁)-(CH₂)₂-N(R_m)(R_n)から選択され得、各R₁、R_m、およびR_nは、独立して、Hであるか、または置換も

40

50

しくは非置換 C_1-C_{10} アルキルである。

【0249】

本明細書で使用されるとき、「二環式ヌクレオシド」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としては、4' リボシル環原子と2' リボシル環原子との間の架橋を含むヌクレオシドが挙げられるが、これに限定されない。ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるアンチセンス化合物は、4' ~ 2' 架橋を含む1つ以上の二環式ヌクレオシドを含む。そのような4' ~ 2' 二環式ヌクレオシドの例としては、次の式のうちの1つが挙げられるが、これらに限定されない： $4'-(CH_2)-O-2'-(LNA)$ 、 $4'-(CH_2)-S-2'$ 、 $4'-(CH_2)_2-O-2'-(ENA)$ 、 $4'-CH(CH_3)-O-2'$ 、および $4'-CH(CH_2OCH_3)-O-2'$ （およびそれらの類似体、2008年7月15日に発行された米国特許第7,399,845号を参照）、 $4'-C(CH_3)(CH_3)-O-2'$ （およびその類似体、2009年1月8日に公開された公開国際出願国際公開第2009/006478号を参照）、 $4'-CH_2-N(OCH_3)-2'$ （およびその類似体、2008年12月11日に公開された公開国際出願国際公開第2008/150729号を参照）、 $4'-CH_2-O-N(CH_3)-2'$ （2004年9月2日に公開された公開米国特許出願第2004-0171570号を参照）、 $4'-CH_2-N(R)-O-2'$ （式中、Rは、H、 C_1-C_{12} アルキル、または保護基である）（2008年9月23日に発行された米国特許第7,427,672号を参照）、 $4'-CH_2-C(H)(CH_3)-2'$ （Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134）、および $4'-CH_2-C(=CH_2)-2'$ （およびその類似体、2008年12月8日に公開された公開国際出願国際公開第2008/154401号を参照）。

【0250】

二環式ヌクレオシドに関連するさらなる報告は、公開文献にも見出すことができる（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、および 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、および同第7,696,345号、米国特許公開第2008-0039618号、同第2009-0012281号、米国特許出願第60/989,574号、同第61/026,995号、同第61/026,998号、同第61/056,564号、同第61/086,231号、同第61/097,787号、および同第61/099,844号、公開PCT国際出願国際公開第1994/014226号、同第2004/106356号、同第2005/021570号、同第2007/134181号、同第2008/150729号、同第2008/154401号、および同第2009/006478号を参照）。前述の二環式ヌクレオシドは各々、例えば、 α -L-リボフラノースおよび β -D-リボフラノースを含む、1つ以上の立体化学糖構成を有するように調製することができる（国際公開第99/14226号として、1999年3月25日公開のPCT国際出願第PCT/DK98/00393号を参照されたい）。

【0251】

ある特定の実施形態では、BNAヌクレオシドの二環式糖部分は、ペントフラノシル糖部分の4'位と2'位との間に少なくとも1つの架橋を有する化合物を含むが、これらに限定されず、ここでそのような架橋は独立して、 $-\text{[C(R}_a\text{)(R}_b\text{)]}_n-$ 、 $-\text{C(R}_a\text{)=C(R}_b\text{)-}$ 、 $-\text{C(R}_a\text{)=N-}$ 、 $-\text{C(=O)-}$ 、 $-\text{C(=NR}_a\text{)-}$ 、 $-\text{C(=S)-}$ 、 $-\text{O-}$ 、 $-\text{Si(R}_a\text{)}_2-$ 、 $-\text{S(=O)}_x-$ 、および $-\text{N(R}_a\text{)-}$ から独立して選択される1個または2～4個の結合基を含み、

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およびR_bは、独立して、H、保護基、ヒドロキシル、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、C₅-C₂₀アリール、置換C₅-C₂₀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、C₅-C₇脂環式ラジカル、置換C₅-C₇脂環式ラジカル、ハロゲン、OJ₁、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、COOJ₁、アシル(C(=O)-H)、置換アシル、CN、スルホニル(S(=O)₂-J₁)、またはスルホキシル(S(=O)-J₁)であり、

各J₁およびJ₂は、独立して、H、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、C₅-C₂₀アリール、置換C₅-C₂₀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、C₁-C₁₂アミノアルキル、置換C₁-C₁₂アミノアルキル、または保護基である。

【0252】

ある特定の実施形態では、二環式糖部分の架橋は、 $-\text{[C(R}_a\text{)(R}_b\text{)]}_n-$ 、 $-\text{[C(R}_a\text{)(R}_b\text{)]}_n-\text{O-}$ 、 $-\text{C(R}_a\text{R}_b\text{)-N(R)-O-}$ 、または $-\text{C(R}_a\text{R}_b\text{)-O-N(R)-}$ である。ある特定の実施形態では、架橋は、4'-CH₂-2'、4'-(CH₂)₂-2'、4'-(CH₂)₃-2'、4'-CH₂-O-2'、4'-(CH₂)₂-O-2'、4'-CH₂-O-N(R)-2'、および4'-CH₂-N(R)-O-2'であり、式中、各Rは、独立して、H、保護基、またはC₁-C₁₂アルキルである。

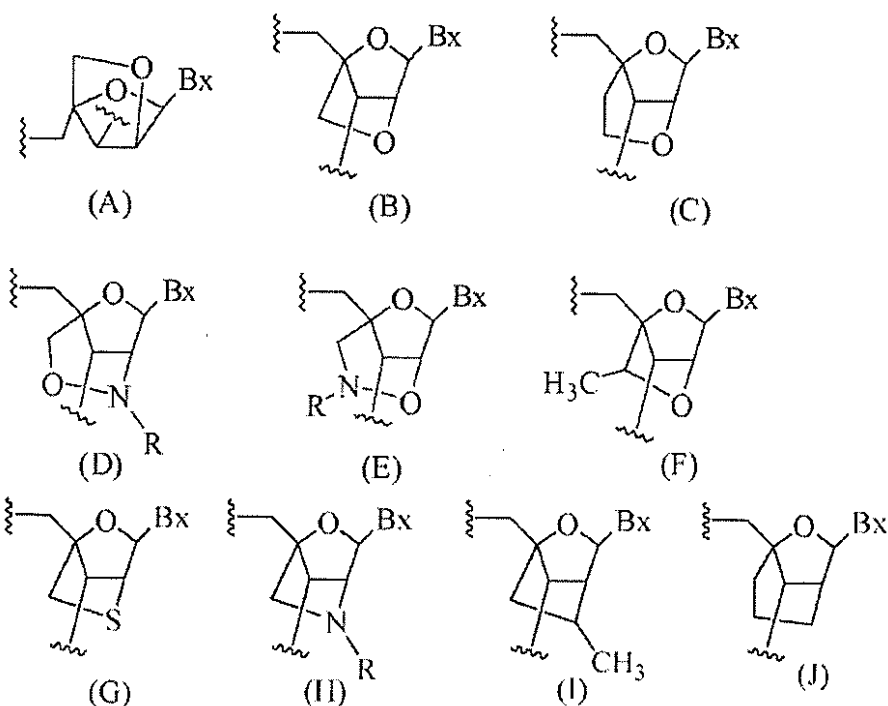
【0253】

ある特定の実施形態では、二環式ヌクレオシドはさらに、異性体構成によって定義される。例えば、4'-2'メチレン-オキシ架橋を含むヌクレオシドは、α-L構成中またはβ-D構成中にあってもよい。以前は、α-L-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNAは、アンチセンス活性を示すアンチセンスオリゴヌクレオチド中に組み込まれていた(Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372)。

【0254】

ある特定の実施形態では、二環式ヌクレオシドには、下に示されるような、(A) α-L-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA、(B) β-D-メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2')BNA、(C) エチレンオキシ(4'-(CH₂)₂-O-2')BNA、(D) アミノオキシ(4'-CH₂-O-N(R)-2')BNA、(E) オキシアミノ(4'-CH₂-N(R)-O-2')BNA、および(F) メチル(メチレンオキシ)(4'-CH(CH₃)-O-2')BNA、(G) メチレン-チオ(4'-CH₂-S-2')BNA、(H) メチレン-アミノ(4'-CH₂-N(R)-2')BNA、(I) メチル炭素環式(4'-CH₂-CH(CH₃)-2')BNA、および(J) プロピレン炭素環式(4'-(CH₂)₃-2')BNAが含まれるが、これらに限定されない。

【化 2】



10

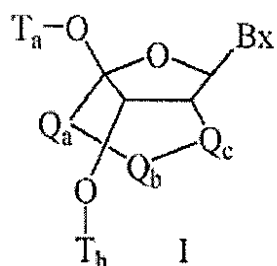
20

式中、Bxは、塩基部分であり、Rは、独立して、H、保護基、またはC₁－C₁₂アルキルである。

【0255】

ある特定の実施形態では、式 I

【化 3】



30

を有する二環式ヌクレオシドが提供され、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、

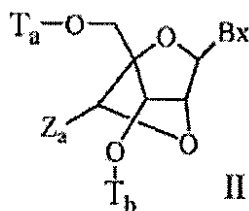
T_aおよびT_bはそれぞれ、独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応リン基、リン部分、または支持媒体への共有結合である。

40

【0256】

ある特定の実施形態では、式 I I

【化 4】



を有する二環式ヌクレオシドが提供され、式中、

Bx は、複素環式塩基部分であり、

10

Ta および Tb はそれぞれ、独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応リン基、リン部分、または支持媒体への共有結合であり、

Za 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。

【0257】

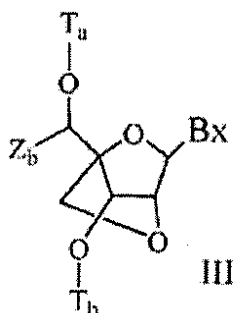
一実施形態では、置換された基の各々は、独立して、ハロゲン、オキソ、ヒドロキシル、OJ_c、NJ_cJ_d、SJ_c、N₃、OC(=X)J_c、および NJ_eC(=X)NJ_cJ_d から独立して選択される置換基群で一置換または多置換され、式中、各 J_c、J_d および J_e は、独立して、H、C₁ - C₆ アルキル、または置換 C₁ - C₆ アルキルであり、X は、O または NJ_c である。

20

【0258】

ある特定の実施形態では、式 III

【化 5】



30

を有する二環式ヌクレオシドが提供され、式中、

Bx は、複素環式塩基部分であり、

Ta および Tb はそれぞれ、独立して、H、ヒドロキシル保護基、共役基、反応リン基、リン部分、または支持媒体への共有結合であり、

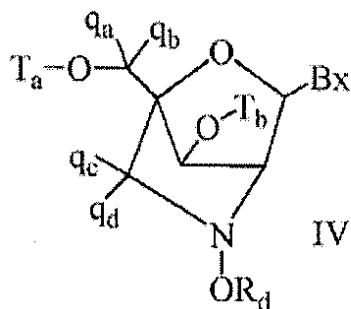
Zb は、C₁ - C₆ アルキル、C₂ - C₆ アルケニル、C₂ - C₆ アルキニル、置換 C₁ - C₆ アルキル、置換 C₂ - C₆ アルケニル、置換 C₂ - C₆ アルキニル、または置換アシル (C(=O)-) である。

40

【0259】

ある特定の実施形態では、式 IV

【化 6】



10

を有する二環式ヌクレオシドが提供され、式中、

Bxは、複素環式塩基部分であり、

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

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

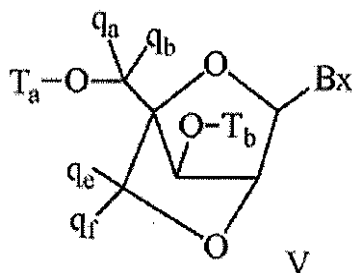
各q_a、q_b、q_c、およびq_dは、独立して、H、ハロゲン、C₁－C₆アルキル、置換C₁－C₆アルキル、C₂－C₆アルケニル、置換C₂－C₆アルケニル、C₂－C₆アルキニル、もしくは置換C₂－C₆アルキニル、C₁－C₆アルコキシル、置換C₁－C₆アルコキシル、アシル、置換アシル、C₁－C₆アミノアルキル、または置換C₁－C₆アミノアルキルである。

20

【0260】

ある特定の実施形態では、式V

【化 7】



30

を有する二環式ヌクレオシドが提供され、式中、

Bxは、複素環式塩基部分であり、

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

q_a、q_b、q_c、およびq_d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、

40

あるいはq_eおよびq_fは一緒に、=C(q_g)(q_h)であり、

q_gおよびq_h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。

【0261】

50

メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2') BNA単量体アデニン、シトシン、グアニン、5-メチルシトシン、チミン、およびウラシルの合成および調製が、それらのオリゴマー化、および核酸認識特性と共に記載されている(例えば、Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630を参照されたい)。BNAおよびそれらの調製もまた、国際公開第98/39352号および同第99/14226号に記載される。

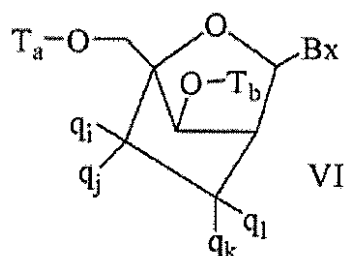
【0262】

メチレンオキシ(4'-CH₂-O-2') BNAおよび2'-チオ-BNAの類似体もまた、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ための基質としてオリゴデオキシリボヌクレオチド二重鎖を含む、固定されたヌクレオシド類似体の調製もまた、記載されている(Wengel et al., 国際公開第99/14226号)。さらに、新規の立体配座的に制限された高親和性オリゴヌクレオチド類似体である2'-アミノ-BNAの合成が、当該技術分野において記載されている(Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039)。加えて、2'-アミノおよび2'-メチルアミノ-BNAが調製されており、相補的RNAおよびDNA鎖によるそれらの二重鎖の熱安定性が以前に報告されている。

【0263】

ある特定の実施形態では、式VI

【化8】



を有する二環式ヌクレオシドが提供され、式中、

Bxは、複素環式塩基部分であり、

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

各q_i、q_j、q_k、およびq_lは、独立して、H、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アルコキシル、置換C₁-C₁₂アルコキシル、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であり、

q_iおよびq_jまたはq_lおよびq_kは一緒に、=C(q_g)(q_h)であり、式中、q_gおよびq_h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。

【0264】

4'-(CH₂)₃-2'架橋およびアルケニル類似体架橋4'-CH=CH-CH₂-2'を有する1つの炭素環式二環式ヌクレオシドが記載されている(Frier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443およびAlbaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740)。また、炭素環式二環式ヌクレオシドの合成および調製が、それらのオリゴマー化ならびに生化学的研究と共に、記載されている(Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26)

， 8 3 6 2－8 3 7 9）。

【0265】

本明細書で使用されるとき、「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」は、糖環の2'炭素原子および4'炭素原子を接続するフラノース環の2個の炭素原子を接続する架橋を含むフラノース環を含む二環式ヌクレオシドを指す。

【0266】

明細書で使用されるとき、「単環式ヌクレオシド」は、二環式糖部分でない修飾された糖部分を含むヌクレオシドを指す。本明細書で使用されるとき、ヌクレオシドの糖部分または糖部分類似体は、任意の位置において修飾されるか、または置換され得る。

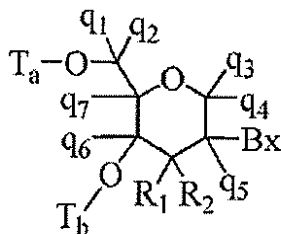
【0267】

本明細書で使用されるとき、「2'修飾糖」は、2'位において修飾されたフラノシル糖を意味する。ある特定の実施形態では、かかる修飾は、置換および非置換アルコキシ、置換および非置換チオアルキル、置換および非置換アミノアルキル、置換および非置換アルキル、置換および非置換アリル、ならびに置換および非置換アルキニルを含むが、これらに限定されないハロゲン化物から選択される置換基を含む。ある特定の実施形態では、2'修飾は、 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nF$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、 $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ 、および $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ を含むが、これらに限定されない置換基から選択され、式中、nおよびmは、1～約10である。他の2'置換基群もまた、 $C_{1-C_{12}}$ アルキル、置換アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラキル、 O -アルカリル、もしくは O -アラキル、 SH 、 SCH_3 、 OCN 、 Cl 、 Br 、 CN 、 F 、 CF_3 、 OCF_3 、 $SOCH_3$ 、 SO_2CH_3 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、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開裂基、レポーター基、インターカレーター、薬物動態特性を改善するための基、またはアンチセンス化合物の薬力学的特性を改善するための基、および類似した特性を有する他の置換基から選択することができる。ある特定の実施形態では、修飾ヌクレオシドは、2'-MOE側鎖を含む(Baker et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000)。そのような2'-MOE置換は、非修飾ヌクレオシド、ならびに2'-O-メチル、O-プロピル、およびO-アミノプロピル等の他の修飾ヌクレオシドと比較して改善された結合親和性を有することが記載されている。2'-MOE置換基を有するオリゴヌクレオチドもまた、体内での使用に有望な特徴を有する、遺伝子発現のアンチセンス阻害物質であることが示されている(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; および Altmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926)。

【0268】

本明細書で使用されるとき、「修飾されたテトラヒドロピランヌクレオシド」または「修飾されたTHPヌクレオシド」は、正常なヌクレオシドにおけるペントフラノシル残基の代わりに置換された6員テトラヒドロピラン「糖」を有するヌクレオシドを意味する(糖代用物)。修飾されたTHPヌクレオシドは、当該技術分野でヘキシトール核酸(HNA)、アニトール(anitol)核酸(ANA)、マンニトール核酸(MNA)(Lemann, C.J. Bioorg. Med. Chem., 2002, 10: 841-854を参照されたい)、フルオロHNA(F-HNA)と称されるもの、または式VII:

【化 9】



VII

10

を有する化合物が含まれるが、これらに限定されず、式中、式VIIの当該少なくとも1つ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、

T_aおよびT_b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結合するヌクレオシド間結合基であるか、あるいはT_aおよびT_bのうちの1つが、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結合するヌクレオシド間結合基であり、T_aおよびT_bのうちのもう1つが、H、ヒドロキシル保護基、結合共役基、または5'もしくは3'末端基であり、

q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、およびq₇はそれぞれ、独立して、H、C₁—C₆アルキル、置換C₁—C₆アルキル、C₂—C₆アルケニル、置換C₂—C₆アルケニル、C₂—C₆アルキニル、または置換C₂—C₆アルキニルであり、R₁およびR₂のそれぞれは、水素、ヒドロキシル、ハロゲン、置換または非置換アルコキシ、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、OC(=X)J₁、OC(=X)NJ₁J₂、NJ₃C(=X)NJ₁J₂、およびCNから選択され、式中、Xは、O、S、またはNJ₁であり、各J₁、J₂、およびJ₃は、独立して、HまたはC₁—C₆アルキルである。

20

【0269】

ある特定の実施形態では、式VIIの修飾THPヌクレオシドが提供され、式中、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、およびq₇はそれぞれ、Hである。ある特定の実施形態では、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、およびq₇のうちの少なくとも1つは、H以外である。ある特定の実施形態では、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、およびq₇のうちの少なくとも1つは、メチルである。ある特定の実施形態では、式VIIのTHPヌクレオシドが提供され、式中、R₁およびR₂のうちの1つは、フルオロである。ある特定の実施形態では、R₁がフルオロであり、かつR₂がHである、R₁がメトキシであり、かつR₂がHである、またR₁がメトキシエトキシであり、かつR₂がHである。ある特定の実施形態では、R₁がHであり、かつR₂がフルオロである、R₁がHであり、かつR₂がメトキシである、またR₁がHであり、かつR₂がメトキシエトキシである。

30

【0270】

本明細書で使用されるとき、「2'修飾」または「2'置換」は、2'位において、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'修飾ヌクレオシドは、その中で糖環の2個の炭素原子を結合する架橋が2'炭素および糖環の別の炭素を結合する、二環式ヌクレオシド、ならびにアリル、アミノ、アジド、チオ、O—アリル、O—C₁—C₁₀アルキル、—OCF₃、O—(CH₂)₂—O—CH₃、2'—O(CH₂)₂—SCH₃、O—(CH₂)₂—O—N(R_m)(R_n)、またはO—CH₂—C(=O)—N(R_m)(R_n)等の非架橋2'置換基を有するヌクレオシドを含むが、これらに限定されず、式中、各R_mおよびR_nは、独立して、H、または置換もしくは非置換C₁—C₁₀アルキルである。2'修飾ヌクレオシドはさらに、例えば、糖の他の位置におけるおよび／または核酸塩基における、他の修飾を含んでもよい。

40

【0271】

本明細書で使用されるとき、「2'—F」は、2'位においてフルオロ基を含む糖を含

50

むヌクレオシドを指す。

【0272】

本明細書で使用されるとき、「2'-OMe」または「2'-OCH₃」または「2'-O-メチル」は各々、糖環の2'位において-OCH₃基を含む糖を含むヌクレオシドを指す。

【0273】

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

【0274】

本明細書で使用されるとき、「オリゴヌクレオチド」は、複数の結合されたヌクレオシドを含む化合物を指す。ある特定の実施形態では、複数のヌクレオシドのうちの1つ以上が修飾される。ある特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つ以上のリボヌクレオシド(RNA)および／またはデオキシリボヌクレオシド(DNA)を含む。

【0275】

当該技術分野では、アンチセンス化合物への取り込み用にヌクレオシドを修飾するために使用され得る、多くの他の二環および三環糖代用環系も公知である(例えば、総説: Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854を参照)。かかる環系は、活性を高めるために、種々の追加の置換を受けることができる。

【0276】

修飾糖の調製方法は、当業者に公知である。

【0277】

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

【0278】

ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物は、修飾糖部分を有する、1つ以上のヌクレオシドを含む。ある特定の実施形態では、修飾糖部分は、2'-MOEである。ある特定の実施形態では、2'-MOE修飾ヌクレオシドは、ギャップマーモチーフにおいて配列される。ある特定の実施形態では、修飾糖部分は、(4'-CH(CH₃)-O-2')架橋基を有する二環式ヌクレオシドである。ある特定の実施形態では、(4'-CH(CH₃)-O-2')修飾ヌクレオシドは、ギャップマーモチーフのウィング全体に配列される。ある特定の実施形態では、修飾糖部分は、cEtである。ある特定の実施形態では、cEt修飾ヌクレオチドは、ギャップマーモチーフのウィング全体に配列される。

【0279】

修飾核酸塩基

核酸塩基(もしくは塩基)修飾または置換は、機能的に交換可能であるが、天然に生じる、または合成の非修飾核酸塩基と構造的に識別可能である。天然および修飾核酸塩基の両方が、水素結合に関与することができる。そのような核酸塩基修飾は、ヌクレアーゼ安定性、結合親和性、または他の何らかの有益な生物学的特性をアンチセンス化合物に付与することができる。修飾核酸塩基は、例えば5-メチルシトシン(5-me-C)等の合成および天然の核酸塩基を含む。5-メチルシトシン置換を含むある特定の核酸塩基置換は、標的核酸に関してアンチセンス化合物の結合親和性を増加させるために特に有用である。例えば、5-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖の安定性を0.6~1.2°C増加させることを示した(Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)。

【0280】

付加修飾核酸塩基は、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-メチル、ならびにアデニンおよびグアニンの他のアルキル誘導

10

20

30

40

50

体、2-プロピル、ならびにアデニンおよびグアニンの他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニル($-C\equiv C-CH_3$)ウラシルおよびシトシン、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、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(偽ウラシル)、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-置換アデニンおよびグアニン、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-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンを含む。

10

【0281】

複素環式塩基部分はまた、プリンまたはピリミジン塩基が他の複素環で置き換えられるもの、例えば、7-デアザ-アデニン、7-デアザグアニン、2-アミノピリジン、および2-ピリドンを含み得る。アンチセンス化合物の結合親和性を増加するために特に有用である核酸塩基は、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、ならびに2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、および5-プロピニルシトシンを含むN-2、N-6、およびO-6置換プリンを含む。

【0282】

ある特定の実施形態では、アポ(a)核酸に対して標的指向されるアンチセンス化合物は、1つ以上の修飾核酸塩基を含む。ある特定の実施形態では、アポ(a)核酸に対して標的指向されるギャップ拡張アンチセンスオリゴヌクレオチドは、1つ以上の修飾核酸塩基を含む。ある特定の実施形態では、修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンである。ある特定の実施形態では、各シトシンは、5-メチルシトシンである。

20

【0283】

組成物および医薬組成物を製剤化するための方法

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、医薬組成物または製剤の調製のために薬学的に容認可能な活性または不活性物質と混合されてもよい。組成物および医薬組成物の製剤化のための方法は、限定されないが、投与の経路、疾患の程度、投与すべき用量を含む、いくつかの判断基準に依存している。

【0284】

アポ(a)核酸に対して標的指向されるアンチセンス化合物は、アンチセンス化合物を好適な薬学的に許容される希釈剤または担体と組み合わせることによって、医薬組成物において利用することができる。

30

【0285】

ある特定の実施形態では、「薬学的担体」または「賦形剤」は、1つ以上の核酸を動物に送達するための薬学的に許容される溶媒、懸濁剤、または任意の他の薬理学的に不活性なビヒクルである。賦形剤は、液体または固体であってよく、計画された投与様式を考慮して、核酸および所与の医薬組成物の他の構成要素と組み合わせられるときに所望のバルク、稠度等を提供するように選択され得る。典型的な薬学的担体は、結合剤(例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース等)、充填剤(例えば、ラクトースおよび他の糖類、微結晶セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、またはリン酸水素カルシウム等)、潤滑剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸塩、水素化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等)、崩壊剤(例えば、デンプン、グリコール酸ナトリウムデンプン等)、および湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム等)を含むが、これらに限定されない。

40

【0286】

核酸と有害に反応しない、非経口または経口投与に好適な薬学的に許容される有機または無機賦形剤も、本発明の組成物を製剤化するために使用することができる。好適な薬学

50

的に許容される担体は、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等を含むが、これらに限定されない。

【0287】

薬学的に許容される希釈剤は、リン酸緩衝食塩水（PBS）を含む。PBSは、非経口的に送達される組成物の使用に好適な希釈剤である。したがって、一実施形態では、アポ（a）核酸に対して標的指向されるアンチセンス化合物、および薬学的に許容される希釈剤を含む医薬組成物が、本明細書に記載される方法に採用される。ある特定の実施形態では、薬学的に許容される希釈剤は、PBSである。ある特定の実施形態では、アンチセンス化合物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

10

【0288】

アンチセンス化合物を含む医薬組成物は、任意の薬学的に許容される塩、エステル、またはそのようなエステルの塩、またはヒトを含む動物への投与時に、生理活性のある代謝物またはその残基を（直接的および間接的に）提供することが可能なオリゴヌクレオチドが含まれる。したがって、例えば、本開示はまた、アンチセンス化合物の薬学的に許容される塩、プロドラッグ、かかるプロドラッグの薬学的に許容される塩、および他の生物学的同等物に向けられる。好適な薬学的に許容される塩として、ナトリウム塩とカリウム塩が挙げられるが、それらに限定されない。

【0289】

20

プロドラッグには、アンチセンス化合物の一端または両端での追加ヌクレオシドの取り込みを含めることができる。これは、身体内で内因性ヌクレアーゼによって切断されて、活性のあるアンチセンス化合物を生成する。

【0290】

共役したアンチセンス化合物

アンチセンス化合物は、生じるアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取り込みを高める、1つ以上の部分または共役へ共有結合されてもよい。典型的な共役基には、コレステロール部分と脂質部分が含まれる。追加の共役基には、炭水化物、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、および色素が含まれる。

30

【0291】

アンチセンス化合物はまた、例えば、ヌクレアーゼ安定性のような特性を高めるために、一般的にはアンチセンス化合物の一端または両端へ付ける、1つ以上の安定化基を有するように修飾することができる。安定化基に含まれるのは、キャップ構造である。これらの末端修飾は、末端核酸を有するアンチセンス化合物をエクソヌクレアーゼ分解から保護して、細胞内での送達および／または局在化に役立てることができる。キャップは、5'-末端（5'キャップ）、または3'末端（3'キャップ）に存在し得るか、あるいは両方の末端に存在し得る。キャップ構造は、当技術分野において公知であって、例えば、逆位デオキシ脱塩基キャップが含まれる。さらに、ヌクレアーゼ安定性を付与するためにアンチセンス化合物の一端または両端をキャップするのに使用し得るさらなる3'および5'安定化基には、国際公開第03/004602号（2003年1月16日公開）に開示されるものが含まれる。

40

【0292】

細胞培養とアンチセンス化合物処置

アポ（a）核酸のレベル、活性、または発現に対するアンチセンス化合物の効果は、多様な細胞種において体外で試験することができる。そのような分析のために使用される細胞種は、市販の供給業者（例えばAmerican Type Culture Collection, Manassus, VA、Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, NC、Clonetics Corporation, Walkersville, MD）から入手可能であり、供給業者の説明書に従って、

50

市販の試薬（例えばInvitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA）を使用して培養される。例証的細胞種としては、HepG2細胞、Hep3B細胞、Huh7（肝細胞癌）細胞、初代培養肝細胞、A549細胞、GM04281線維芽細胞、およびLLC-MK2細胞が挙げられるが、それらに限定されない。

【0293】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの体外試験

本明細書に説明されるのは、アンチセンスオリゴヌクレオチドでの細胞の処置についての方法であって、これは、他のアンチセンス化合物での処置のために適宜修飾することができる。

【0294】

一般に、細胞が培養中に約60～80%の密集度に達したときに、細胞をアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理する。

【0295】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞の中へ導入するのに通常使用される試薬の1つには、カチオン性脂質トランスフェクション試薬、LIPOFECTIN（登録商標）（Invitrogen, Carlsbad, CA）が含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドをOPTI-MEM（登録商標）1（Invitrogen, Carlsbad, CA）中のLIPOFECTIN（登録商標）と混合して、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の最終濃度と、典型的には100nMアンチセンスオリゴヌクレオチドにつき2～12μg/mLの範囲に及ぶLIPOFECTIN（登録商標）濃度を達成する。

【0296】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞中へ導入するために使用する別の試薬には、LIPOFECTAMINE 2000（登録商標）（Invitrogen, Carlsbad, CA）が含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドをOPTI-MEM（登録商標）1低濃度血清培地（Invitrogen, Carlsbad, CA）中のLIPOFECTAMINE 2000（登録商標）と混合して、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の濃度と、典型的には100nMアンチセンスオリゴヌクレオチドにつき2～12μg/mLの範囲に及ぶLIPOFECTAMINE（登録商標）濃度を達成する。

【0297】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞中へ導入するために使用する別の試薬には、Cytfectin（登録商標）（Invitrogen, Carlsbad, CA）が含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドをOPTI-MEM（登録商標）1低濃度血清培地（Invitrogen, Carlsbad, CA）中のCytfectin（登録商標）と混合して、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の濃度と、典型的には100nMアンチセンスオリゴヌクレオチドにつき2～12μg/mLの範囲に及ぶCytfectin（登録商標）濃度を達成する。

【0298】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞中へ導入するために使用する別の試薬には、Oligofectamine（商標）（Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA）が含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドをOpti-MEM（商標）-1低濃度血清培地（Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA）中のOligofectamine（商標）と混合して、Oligofectamine（商標）のオリゴヌクレオチドに対する割合が100nMにつき約0.2：0.8μLでオリゴヌクレオチドの所望の濃度を達成する。

【0299】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞中へ導入するために使用する別の試薬には、FuGENE6（Roche Diagnostics Corp., Indiana

10

20

30

40

50

pol is, IN) が含まれる。アンチセンスオリゴマー化合物を 1 mL の無血清 RPM I 中の FuGENE 6 と混合して、FuGENE 6 のオリゴマー化合物に対する割合が 100 nM につき FuGENE 6 の 1 : 4 μ L でオリゴヌクレオチドの所望の濃度を達成する。

【0300】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞中へ導入するために使用する別の技術には、エレクトロポレーションが含まれる (Sambrooke and Russell in Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。

10

【0301】

常法によって、細胞をアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置する。典型的には、アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後 16 ~ 24 時間で細胞を採取し、この時点で、当技術分野において公知のおよび本明細書に説明される方法によって、標的核酸の RNA またはタンパク質レベルを測定する (Sambrooke and Russell in Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。
。一般に、処置を多数の複写物で実施するとき、データは、その複写物処置の平均として提示される。

20

【0302】

使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は、細胞系ごとに変動する。特定の細胞系に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方法は、当該技術分野で周知である (Sambrooke and Russell in Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、LIPOFECTAMINE 2000 (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA)、Lipofectin (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA)、または Cytofectin (商標) (Gentiantis, San Diego, CA) でトランスフェクトするとき、典型的には、1 nM ~ 300 nM の範囲に及ぶ濃度で使用される。エレクトロポレーションを使用してトランスフェクトするときは、625 ~ 20,000 nM の範囲に及ぶ、より高い濃度でアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用する。

30

【0303】

RNA 単離

RNA 分析は、全細胞 RNA またはポリ (A) + mRNA で実施することができる。RNA 単離の方法は、当技術分野において周知である (Sambrooke and Russell in Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。例えば、RNA は、製造業者の推奨プロトコルに従って、TRIzol (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して調製され得る。

40

【0304】

標的レベルまたは発現の阻害の分析

アポ (a) 核酸のレベルまたは発現の阻害は、当技術分野において公知の多様な方法でアッセイすることができる (Sambrooke and Russell in Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Thir

50

d Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York., 2001)。
例えば、標的核酸レベルは、例えば、ノーザンブロット分析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、または定量的リアルタイムPCRによって定量化することができる。RNA分析は、全細胞RNAまたはポリ（A）+mRNAで実施することができる。RNA単離の方法は、当該技術分野において公知である。ノーザンブロット分析も、当該技術分野では、常法である。定量的リアルタイムPCRは、簡便には、市販のABI PRISM 7600、7700、または7900配列検出システム（PE-Applied Biosystems, Foster City, CAより入手可能）を使用して、そして製造業者の説明書に従って使用して達成することができる。

10

【0305】

標的RNAレベルの定量的リアルタイムPCR分析

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

【0306】

リアルタイムPCRに先立って、単離したRNAを逆転写酵素（RT）反応へ処して、相補的DNA（cDNA）を産生してから、これをリアルタイムPCR増幅の基質として使用する。RT反応とリアルタイムPCR反応は、同一の試料ウェルにおいて連続的に実施する。RTおよびリアルタイムPCRの試薬は、Invitrogen（Carlsbad, CA）より入手される。RTおよびリアルタイムPCR反応は、当業者に公知の方法によって行う。

20

【0307】

リアルタイムPCRによって得られる遺伝子（またはRNA）標的の量は、シクロフィリンAもしくはGAPDH等の、その発現が一定である遺伝子の発現レベルを使用して、またはRIBOGREEN（登録商標）（Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA）を使用して全RNAを定量化することによって、正規化され得る。シクロフィリンAまたはGAPDHの発現は、リアルタイムPCRによって、標的と同時に実施する、多重化することによって、または別々に定量化され得る。全RNAは、RIBOGREEN（登録商標）RNA定量試薬（Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA）を使用して定量化する。RIBOGREEN（登録商標）によるRNA定量化の方法は、Jones, L. J. ら（Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374）に教示されている。ACYTOFLUOR（登録商標）4000機器（PE Applied Biosystems, Foster City, CA）を使用して、RIBOGREEN（登録商標）蛍光を測定する。

30

【0308】

アポ（a）核酸とハイブリダイズするようにプローブとプライマーが設計され得る。リアルタイムPCRのプローブおよびプライマーを設計する方法は、当該技術分野で周知であり、PRIMER EXPRESS（登録商標）ソフトウェア（Applied Biosystems, Foster City, CA）等のソフトウェアの使用を含み得る。

40

【0309】

タンパク質レベルの分析

アポ（a）タンパク質レベルを測定することによって、アポ（a）核酸のアンチセンス阻害を評価することができる。アポ（a）のタンパク質レベルは、免疫沈降、ウェスタンブロット分析（イムノブロットティング）、酵素結合免疫吸着法（ELISA）、定量的タンパク質アッセイ、タンパク質活性アッセイ（例えば、カスパーゼ活性アッセイ）、免疫組織化学、免疫細胞化学、または蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）等の、当該技

50

術分野において周知の様々な方法で評価または定量化することができる (Sambrook and Russell in Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)。標的に指向される抗体は、抗体のMSRSSカタログ (Aerie Corporation, Birmingham, MI) 等の様々な供給源より特定して入手するか、あるいは当該技術分野において周知の従来のモノクローナルまたはポリクローナル抗体生成法により調製することができる。アポ (a) の検出に有用な抗体が市販されている。

【0310】

10

アンチセンス化合物の体内試験

アンチセンス化合物、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドは、アポ (a) の発現を阻害し、表現型の変化をもたらすその能力を評価するために、動物において試験される。試験は、正常な動物において、または実験的な疾患モデルにおいて実施され得る。動物への投与のために、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水等の薬学的に許容される希釈剤に製剤化される。投与は、非経口投与経路を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドの投与量および投与頻度の計算は、投与経路および動物体重等の要因に依存する。アンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置の期間に続いて、RNAを組織から単離し、アポ (a) 核酸発現の変化を測定する。アポ (a) タンパク質レベルの変化も測定する。

20

【0311】

ある特定の適応症

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される1つ以上の医薬組成物を投与することを含む、個体を治療する方法が、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、個体は、アポ (a) 関連疾患を有する。ある特定の実施形態では、個体は、Lp (a) 関連疾患を有する。ある特定の実施形態では、個体は、炎症性、心血管、および／または代謝疾患、障害、または状態を有する。

【0312】

ある特定の実施形態では、心血管疾患、障害、または状態は、動脈瘤 (例えば腹部大動脈瘤)、狭心症、不整脈、粥状動脈硬化、脳血管疾患、冠動脈疾患、冠動脈心疾患、脂質異常症、高コレステロール血症、高脂血症、高血圧、高トリグリセリド血症、心筋梗塞、末梢血管疾患 (例えば末梢動脈疾患)、脳卒中等を含むが、これらに限定されない。

30

【0313】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるアポ (a) を標的指向する化合物は、心血管疾患、障害、または状態の生理学的マーカーまたは表現型を調節する。例えば、動物への化合物の投与は、未処置の動物と比較して、これらの動物におけるLDLおよびコレステロールレベルを減少させることができる。ある特定の実施形態では、生理学的マーカーまたは表現型の調節は、化合物によるアポ (a) の阻害に関連し得る。

【0314】

ある特定の実施形態では、心血管疾患、障害、または状態の生理学的マーカーは、定量可能であり得る。例えば、LDLまたはコレステロールレベルは、例えば標準的な脂質試験により測定され、定量化され得る。そのようなマーカーに関して、ある特定の実施形態では、マーカーは、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは99%、またはこれらの値の任意の2つにより定義される範囲だけ減少し得る。

40

【0315】

また、治療を必要とする対象において、心血管疾患、障害、または状態に関連する症状を予防する、治療する、または寛解させるための方法が、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、心血管疾患、障害、または状態に関連する症状の開始速度を低

50

下させるための方法が提供される。ある特定の実施形態では、心血管疾患、障害、または状態に関連する症状の重症度を低下させるための方法が提供される。そのような実施形態では、本方法は、アポ（a）核酸に対して標的指向される治療有効量の化合物を、それを必要とする個体に投与することを含む。

【0316】

心血管疾患、障害、または状態は、多くの身体症状を特徴とし得る。心血管疾患、障害、または状態に関連する当業者に既知の任意の症状は、本明細書に記載される化合物および方法により予防、治療、寛解、またはさもなければ調節され得る。ある特定の実施形態では、症状は、狭心症、胸痛、息切れ、動悸、脱力感、めまい、悪心、発汗、頻拍、徐脈、不整脈、心房細動、下肢の腫れ、チアノーゼ、疲労、失神、顔面のしびれ、四肢のしびれ、跛行もしくは筋肉の痙攣、腹部の膨満、および発熱のいずれかであり得るが、これらに限定されない。

10

【0317】

ある特定の実施形態では、代謝疾患、障害、または状態は、高血糖症、前糖尿病、糖尿病（1型および2型）、肥満、インスリン耐性、代謝症候群、および糖尿病による脂質異常症を含むが、これらに限定されない。

【0318】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるアポ（a）に対して標的指向される化合物は、代謝疾患、障害、または状態の生理学的マーカーまたは表現型を調節する。例えば、動物への化合物の投与は、未処置の動物と比較して、これらの動物におけるグルコースおよびインスリン耐性レベルを減少させることができる。ある特定の実施形態では、生理学的マーカーまたは表現型の調節は、化合物によるアポ（a）の阻害に関連し得る。

20

【0319】

ある特定の実施形態では、代謝疾患、障害、または状態の生理学的マーカーは、定量可能であり得る。例えばグルコースレベルまたはインスリン耐性は、当該技術分野において公知の標準的な試験により測定され、定量化され得る。そのようなマーカーに関して、ある特定の実施形態では、マーカーは、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは99%、またはこれらの値の任意の2つにより定義される範囲だけ減少し得る。別の例では、インスリン感受性は、当該技術分野において公知の標準的な試験により測定され、定量化され得る。そのようなマーカーに関して、ある特定の実施形態では、マーカーは、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは99%、またはこれらの値の任意の2つにより定義される範囲だけ増加し得る。

30

【0320】

また、治療を必要とする対象において、代謝疾患、障害、または状態に関連する症状を予防する、治療する、または寛解させるための方法が、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、代謝疾患、障害、または状態に関連する症状の開始速度を低下させるための方法が提供される。ある特定の実施形態では、代謝疾患、障害、または状態に関連する症状の重症度を低下させるための方法が提供される。そのような実施形態では、本方法は、アポ（a）核酸に対して標的指向される治療有効量の化合物を、それを必要とする個体に投与することを含む。

40

【0321】

代謝疾患、障害、または状態は、多くの身体症状を特徴とし得る。代謝疾患、障害、または状態に関連する当業者に既知の任意の症状は、本明細書に記載される化合物および方法により予防、治療、寛解、またはさもなければ調節され得る。ある特定の実施形態では、症状は、過度の尿生成（多尿症）、過度の口渇、および水分摂取の増加（多飲症）、霧視、不明な体重損失および嗜眠のいずれかであり得るが、これらに限定されない。

【0322】

50

ある特定の実施形態では、炎症性疾患、障害、または状態は、冠動脈疾患（C A D）、アルツハイマー病、および血栓塞栓疾患、障害、または状態を含むが、これらに限定されない。ある特定の血栓塞栓疾患、障害、または状態は、脳卒中、血栓症、心筋梗塞、および末梢血管疾患を含むが、これらに限定されない。

【0323】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるアポ（a）を標的指向する化合物は、炎症性疾患、障害、または状態の生理学的マーカーまたは表現型を調節する。例えば、動物への化合物の投与は、未処置の動物と比較して、これらの動物における炎症性サイトカインまたは他の炎症性マーカーレベルを減少させることができる。ある特定の実施形態では、生理学的マーカーまたは表現型の調節は、化合物によるアポ（a）の阻害に関連し得る。

10

【0324】

ある特定の実施形態では、炎症性疾患、障害、または状態の生理学的マーカーは、定量可能であり得る。例えば、サイトカインレベルは、当該技術分野において公知の標準的な試験により測定され、定量化され得る。そのようなマーカーに関して、ある特定の実施形態では、マーカーは、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは99%、またはこれらの値の任意の2つにより定義される範囲だけ減少し得る。

【0325】

20

また、治療を必要とする対象において、炎症性疾患、障害、または状態に関連する症状を予防する、治療する、または寛解させるための方法が、本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、炎症性疾患、障害、または状態に関連する症状の開始速度を低下させるための方法が提供される。ある特定の実施形態では、炎症性疾患、障害、または状態に関連する症状の重症度を低下させるための方法が提供される。そのような実施形態では、本方法は、アポ（a）核酸に対して標的指向される治療有効量の化合物を、それを必要とする個体に投与することを含む。

【0326】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される治療有効量の1つ以上の医薬組成物を投与することを含む、アポ（a）関連疾患、障害、または状態を有する個体を治療する方法が提供される。ある特定の実施形態では、個体は、上昇したアポ（a）レベルを有する。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される治療有効量の1つ以上の医薬組成物を投与することを含む、Lp（a）関連疾患、障害、または状態を有する個体を治療する方法が提供される。ある特定の実施形態では、個体は、上昇したLp（a）レベルを有する。ある特定の実施形態では、個体は、炎症性、心血管、および／または代謝疾患、障害、または状態を有する。ある特定の実施形態では、アポ（a）核酸に対して標的指向される治療有効量のアンチセンス化合物の投与は、アポ（a）またはLp（a）レベルの監視を伴う。ある特定の実施形態では、アポ（a）核酸に対して標的指向される治療有効量のアンチセンス化合物の投与は、個体のアンチセンス化合物への応答を決定するために、炎症性、心血管、および／または代謝疾患のマーカー、またはアポ（a）の発現に関連する他の疾患過程を監視することを伴う。アポ（a）を標的指向するアンチセンス化合物の投与に対する個体の応答は、本化合物による治療介入の量および継続期間を決定するために、医師によって使用され得る。

30

40

【0327】

ある特定の実施形態では、アポ（a）核酸に対して標的指向されるアンチセンス化合物の投与は、少なくとも約15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは99%、またはこれらの値の任意の2つによって画定される範囲だけアポ（a）発現の減少をもたらす。ある特定の実施形態では、アポ（a）発現は、 $\leq 100 \text{ mg/dL}$ 、 $\leq 90 \text{ mg/dL}$ 、 $\leq 80 \text{ mg/dL}$ 、 $\leq 70 \text{ mg/dL}$ 、 $\leq 60 \text{ mg/dL}$ 、 ≤ 50

50

mg/dL、 ≤ 40 mg/dL、 ≤ 30 mg/dL、 ≤ 20 mg/dL、または ≤ 10 mg/dLに減少する。

【0328】

ある特定の実施形態では、アポ（a）核酸に対して標的指向されるアンチセンス化合物の投与は、少なくとも約15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは99%、またはこれらの値の任意の2つによって画定される範囲だけLp（a）発現の減少をもたらす。

【0329】

ある特定の実施形態では、アポ（a）に対して標的指向されるアンチセンス化合物を含む医薬組成物は、炎症性、心血管、および／または代謝疾患、障害、または状態に罹患する、またはそれに対して感受性を持つ患者を治療するための薬剤の調製のために使用される。

【0330】

投薬

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、投薬レジメン（例えば用量、投薬頻度、および継続期間）に従い投与され、投薬レジメンは所望の効果を達成するように選択され得る。所望の効果は、例えば、アポ（a）の低下、またはアポ（a）に関連する疾患もしくは状態の予防、低下、寛解、またはその進行を緩慢にさせることであり得る。

【0331】

ある特定の実施形態では、投薬レジメンの可変値は、対象において医薬組成物の所望の濃度をもたらすように調整される。投薬レジメンに関して使用される「医薬組成物の濃度」は、医薬組成物の化合物、オリゴヌクレオチド、または活性成分を指し得る。例えば、ある特定の実施形態では、用量および投薬頻度は、所望の効果を達成するのに十分な量の医薬組成物の組織濃度または血漿濃度を提供するように調整される。

【0332】

投薬は、治療される疾患状態の重症度および応答性に依存し、治療過程は、数日～数ヶ月、または治癒がもたらされるか、もしくは疾患状態の減少が達成されるまで続く。投薬は、薬物の効力および代謝にも依存する。ある特定の実施形態では、投与量は、体重1 kg当たり0.01 μ g～100 mgであるか、または0.001 mg～1000 mgの範囲内の投薬であり、1日に、1週間に、1ヶ月に、もしくは1年に1回以上、またはさらには2～20年に1回与えられ得る。有効な治療後、疾患状態の再発を防止するために、患者に維持療法を受けさせることが望ましい場合があり、1日に、1週間に、1ヶ月に、1年に1回以上から2～20年に1回以上、体重の1 kg当たり0.01 μ g～100 mgの範囲、または0.001 mg～1000 mgの投薬範囲の維持用量でオリゴヌクレオチドが投与される。

【0333】

ある特定の組み合わせ療法

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される化合物を含む第1の薬剤は、1つ以上の第2の薬剤または療法と同時投与される。ある特定の実施形態では、そのような第2の薬剤は、本明細書に記載される第1の薬剤と同じ疾患、障害、または状態を治療するように設計される。ある特定の実施形態では、そのような第2の薬剤は、本明細書に記載される第1の薬剤とは異なる疾患、障害、または状態を治療するように設計される。ある特定の実施形態では、第1の薬剤は、第2の薬剤の望ましくない副作用を治療するように設計される。ある特定の実施形態では、第2の薬剤は、第1の薬剤の望ましくない副作用を治療するように、第1の薬剤と同時投与される。ある特定の実施形態では、そのような第2の薬剤は、本明細書に記載される1つ以上の医薬組成物の望ましくない副作用を治療するように設計される。ある特定の実施形態では、第2の薬剤は、組み合わせ効果をもたらすように第1の薬剤と同時投与される。ある特定の実施形態では、第2の薬剤は、相乗効果をもたらすように第1の薬剤と同時投与される。ある特定の実施形態では、第1および第

2の薬剤の同時投与は、薬剤が独立した療法として投与された場合の治療的または予防的効果を達成するのに必要とされるであろう投与量より低い投与量の使用を可能にする。

【0334】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される1つ以上の組成物および1つ以上の他の医薬品は、同時に投与される。ある特定の実施形態では、本発明の1つ以上の組成物および1つ以上の他の医薬品は、異なる時点で投与される。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される1つ以上の組成物および1つ以上の他の医薬品は、単一製剤と一緒に調製される。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される1つ以上の組成物および1つ以上の他の医薬品は、別々に調製される。

【0335】

ある特定の実施形態では、第2の薬剤は、アポ(a)降下剤、Lp(a)降下剤、アルツハイマー病を治療するための薬剤、血栓塞栓症形成を低下させるための薬剤、コレステロール降下剤、非HDL脂質降下(例えばLDL)剤、HDL上昇剤(HDL raising agent)、魚油、ナイアシン、ニコチン酸、フィブラート、スタチン、DCCR(ジアゾキシドの塩)、グルコース降下剤、抗炎症剤、および/または抗糖尿病剤を含むが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、第1の薬剤は、最大許容量の第2の薬剤と組み合わせて投与される。ある特定の実施形態では、第1の薬剤は、最大許容量の第2の薬剤に応答しない対象に投与される。

【0336】

アポ(a)降下剤の例としては、第1の薬剤とは異なるアポ(a)アンチセンスオリゴヌクレオチド、ナイアシン、ニコチン酸、またはアポBアンチセンスオリゴヌクレオチド(すなわち、ミポメルセン)が挙げられる。アポ(a)降下療法の例は、Lp(a)アフエレススである。

【0337】

グルコース降下および/または抗糖尿病剤の例としては、治療的生活様式の変更、PPAR作動薬、ジペプチジルペプチダーゼ(IV)阻害剤、GLP-1類似体、インスリンもしくはインスリン類似体、インスリン分泌促進物質、SGLT2阻害剤、ヒトアミリン類似体、ビグアナイド、アルファグルコシダーゼ阻害剤、メトホルミン、スルホニル尿素、ロシグリタゾン、メグリチニド、チアゾリジンジオン、アルファグルコシダーゼ阻害剤等が挙げられるが、これらに限定されない。スルホニル尿素は、アセトヘキサミド、クロルプロパミド、トルブタミド、トラザミド、グリメピリド、グリピジド、グリブリド、またはグリクラジドであってよい。メグリチニドは、ナテグリニドまたはレパグリニドであってよい。チアゾリジンジオンは、ピオグリタゾンまたはロシグリタゾンであってよい。アルファグルコシダーゼは、アカルボースまたはミグリトールであってよい。

【0338】

コレステロールまたは脂質降下療法の例としては、療的生活様式の変更、スタチン、胆汁酸捕捉剤、ナイアシン、ニコチン酸、CETP阻害剤、およびフィブラート等のペロオキシソーム増殖活性化受容体作動薬が挙げられるが、これらに限定されない。スタチンは、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、およびシンバスタチン等であってよい。胆汁酸捕捉剤は、コレセベラム、コレステラミン、コレステポール等であってよい。フィブラートは、ゲムフィブロジル、フェノフィブラート、クロフィブラート等であってよい。CETP阻害剤は、CETPアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはトルセトラピブであってよい。

【0339】

ある特定の治療集団

高Lp(a)レベルを有するある特定の対象は、様々な疾患の危険性が非常に高い(Lippi et al., Clinica Chimica Acta, 2011, 412:797-801, Solfrizz et al.)。高Lp(a)レベルを有する多くの対象において、現在の治療は、それらのLp(a)レベルを安全なレベルに低下させることができない。アポ(a)は、Lp(a)の形成に重要な役割を果たし、よって、

10

20

30

40

50

アポ（a）の低下は、Lp（a）を低下させ、Lp（a）に関連する疾患を予防する、治療する、または寛解させることができる。

【0340】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される化合物および方法による治療は、アポ（a）レベルおよび／またはLp（a）レベルの上昇を伴うヒト動物に適応される。ある特定の実施形態では、ヒトは、 $\geq 30 \text{ mg/dL}$ 、 $\geq 40 \text{ mg/dL}$ 、 $\geq 50 \text{ mg/dL}$ 、 $\geq 60 \text{ mg/dL}$ 、 $\geq 70 \text{ mg/dL}$ 、 $\geq 80 \text{ mg/dL}$ 、 $\geq 90 \text{ mg/dL}$ 、または $\geq 100 \text{ mg/dL}$ の上昇したアポ（a）レベルを有する。

【0341】

ある特定の化合物

PCT出願国際公開第2005/000201号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）による選択されたギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドが評価され（実施例1）、最も強力な化合物であるISIS 144367が、本明細書に記載される新規に設計されたアンチセンスオリゴヌクレオチドのベンチマーク比較として使用された。

【0342】

単一用量体外研究により評価されるように（実施例2～3、5）、約90の新規に設計されたアンチセンスオリゴヌクレオチドがベンチマークISIS 144367より強力であることが分かった。約90のアンチセンスオリゴヌクレオチドのうち、約83は、体外多用量応答研究用に選択され、64のアンチセンスオリゴヌクレオチドがベンチマークより強力であることが分かった（実施例4、6）。

【0343】

ヒトアポ（a）遺伝子導入マウスにおける体内研究のために、約32のアンチセンスオリゴヌクレオチドがさらに選択された（実施例7）。体内でベンチマークより強力であった複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドが特定された。

【0344】

体外での粘度試験のために、約24のアンチセンスオリゴヌクレオチドがさらに選択された（実施例13）。粘性であったアンチセンスオリゴヌクレオチドは、さらなる研究に進められなかった。

【0345】

ゲッ歯類の忍容性および薬物動態の体内研究のために、約14のアンチセンスオリゴヌクレオチドがさらに選択された（実施例8～10）。本研究は、ISIS 494372が最も忍容性を示したアンチセンスオリゴヌクレオチドであったことを示した。

【0346】

ISIS 494283、494284、494286、494301、494302、および494372がカニクイザルにおいて試験された（実施例11～12）。本研究は、ISIS 494372がサルにおいて良好に忍容され、強力であったことを示した。

【0347】

実施例

非限定的な開示および参照による組み込み

本明細書に記載されるある特定の化合物、組成物、および方法が、ある特定の実施形態に従って特異的に記載されている一方で、次の例は、本明細書に記載される化合物を例証するのみの役割を果たしており、それらを限定するようには意図されない。本出願に列挙される参考文献の各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【実施例1】

【0348】

ヒト初代培養肝細胞におけるヒトアポリポタンパク質（a）（アポ（a））の用量依存アンチセンス阻害

前述の刊行物（国際公開第2005/000201号、その内容は参照によりその全体

10

20

30

40

50

が本明細書に組み込まれる) による選択されたギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドを、ヒト初代培養肝細胞における単一用量アッセイにおいて試験した。細胞を Tissue Transformation Technologies (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) から入手し、150 nM のアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置した。約 16 時間の処置期間後、RNA を細胞から単離し、定量的リアルタイム PCR によってアポ (a) mRNA レベルを測定した。mRNA レベルを測定するために、ヒトアポ (a) ヒトプライマープローブセット hAPO (a) 3' (順方向配列 ACAGCAATCAAACGAAGACACTG、本明細書では配列番号 5 として指定される; 逆方向配列 AGCTTATACACAAAATACCAAA AATGC、本明細書では配列番号 6 として指定される; プローブ配列 TCCCAGCT ACCAGCTATGCCAAACCTT、本明細書では配列番号 7 として指定される) を使用した。加えて、ヒトアポ (a) プライマープローブセット hAPO (a) 12 k B (順方向配列 CCACAGTGGCCCCGGT、本明細書では配列番号 8 として指定される; 逆方向配列 ACAGGGCTTTTCTCAGGTGGT、本明細書では配列番号 9 として指定される; プローブ配列 CCAAGCACAGAGGCTCCTTCTGAAC AAG、本明細書では配列番号 10 として指定される) を使用して、mRNA レベルも測定された。アポ (a) mRNA レベルを GAPDH mRNA 発現に正規化した。未処置の対照細胞に対するアポ (a) の阻害パーセントとして表 1 に結果を提示する。

【表 1】

ヒト初代培養肝細胞におけるヒトアポ (a) のアンチセンス阻害

ISIS 番号	阻害% (hAPO(a)3'PP セット)	阻害% (hAPO(a)12kB PPセット)
144367	68	77
144368	42	59
144369	43	69
144370	80	75
144371	42	57
144372	87	54
144373	63	49
144374	45	80
144375	33	11
144376	62	82
144377	42	72
144378	0	72
144379	73	46
144380	75	78
144381	63	64
144382	0	58
144383	63	79
144384	38	0
144385	40	94
144386	47	61
144387	38	60
144388	0	57
144389	52	39
144390	12	0
144391	73	57
144392	43	50
144393	83	82
144394	40	76
144395	80	84
144396	53	72
144397	23	64
144398	7	33
144399	43	44
144400	70	75
144401	87	72

【0349】

用量応答アッセイにおいてさらに試験するために、いくつかのアンチセンスオリゴヌクレオチドを選択した。

【0350】

選択されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを、下の表2に指定される25 nM、50 nM、150 nM、または300 nM濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドで、ヒト初代培養肝細胞において試験した。約16時間の処置期間後、RNAを細胞から単離し、定量的リアルタイムPCRによってアポ (a) mRNAレベルを測定した。mRNAレベルを測定するために、ヒトアポ (a) プライマープローブセットhAPO (a) 3'を使用した。アポ (a) mRNAレベルをGAPDH mRNA発現に正規化した。未処置の対照細胞に対するアポ (a) の阻害パーセントとして結果を提示する。

【表 2】

hAPO (a) 3' により測定されるヒト初代培養肝細胞におけるヒトアポ (a) の用量

依存アンチセンス阻害

ISIS 番号	25 nM	50 nM	150 nM	300 nM
144367	52	78	76	74
144370	64	74	68	66
144385	0	15	43	5
144393	0	9	39	25
144395	17	9	8	32

10

【0351】

ISIS 144367は、他のアンチセンスオリゴヌクレオチドより良好な有効性および用量依存性を示した。よって、ISIS 144367は、本明細書に開示される新規に設計されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの効力と比較するためのベンチマークアンチセンスオリゴヌクレオチドとみなされた。

【実施例 2】

【0352】

遺伝子導入マウスの初代培養肝細胞におけるヒトアポ (a) のアンチセンス阻害

20

アポ (a) 核酸を標的指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドが新規に設計され、体外でのアポ (a) mRNAに対するそれらの効果について試験された。類似する培養条件を有する一連の平行実験において、効力についてアンチセンスオリゴヌクレオチドを試験した。ヒトアポ (a) 遺伝子導入マウスからの初代培養肝細胞 (Fraser, K. A. et al., Nat. Genet. 1995, 9: 424-431) が、この研究において使用された。エレクトロポレーションを使用して、ウェル当たり35,000細胞の密度の肝細胞を1,000nM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24時間の処置期間後、RNAを細胞から単離し、定量的リアルタイムPCRによってアポ (a) mRNAレベルを測定した。mRNAレベルを測定するために、ヒトプライマープローブセットhAPO (a) 1.2kBを使用した。RIBOGREEN (登録商標) によって測定される、全RNA含量によりアポ (a) mRNAレベルを調整した。各実験の結果は、下に示される別々の表に提示される。新規アンチセンスオリゴヌクレオチドのベンチマークとして、からのISIS 144367が使用され、本研究においても含まれる。未処置の対照細胞に対するアポ (a) の阻害パーセントとして結果を提示する。これらの培養条件下で、合計1,511のギャップマーを試験した。さらなる研究用に選択されたアンチセンスオリゴヌクレオチドのみが下の表に提示され、各表は別々の実験を表す。

30

【0353】

新規に設計されたキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを5-10-5MOEギャップマーとして設計した。ギャップマーは長さが20個のヌクレオシドであり、中央ギャップセグメントは10個の2'-デオキシヌクレオシドを含み、かつそれぞれ5個のヌクレオシドを含む5'方向および3'方向上のウィングセグメントに隣接する。5'ウィングセグメントの各ヌクレオシドおよび3'ウィングセグメントの各ヌクレオシドは、2'-MOE修飾を有する。各ギャップマー全体のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート (P=S) 結合である。各ギャップマー全体の全てのシトシン残基は、5-メチルシトシンである。

40

【0354】

アポ (a) 標的配列は複数のクリングル反復配列を含有し、したがって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドがクリングル配列を標的指向するか否かにより、アポ (a) の1つ以上の領域を標的指向することができる。「開始部位」は、ギャッ

50

プマーがヒト配列において標的指向される最も 5' 側のヌクレオシドを示す。「停止部位」は、ギャップマーがヒト配列において標的指向される最も 3' 側のヌクレオシドを示す。アポ (a) アンチセンスオリゴヌクレオチドは、クリングル反復を標的指向するか否かにより、2 つ以上の「開始部位」または「停止部位」を有することができる。

【0355】

表に列挙される大半のギャップマーは、本明細書において配列番号 1 として指定されるヒトアポ (a) mRNA (GENBANK 受託番号 NM_005577.2)、もしくは本明細書において配列番号 2 として指定されるヒトアポ (a) ゲノム配列 (ヌクレオチド 3230000~3380000 が先端切断された GENBANK 受託番号 NT_007422.12) のいずれか、またはそれらの両方の 1 つ以上の領域に 100% 相補性で標的指向される。「n/a」は、アンチセンスオリゴヌクレオチドが 100% 相補性でその特定の配列を標的指向しないことを示す。

【表 3】

ISIS 番号	配列番号 1: 開始部位	配列番号 1: 停止部位	配列	阻害%	配列番号 2: 開始部位	配列番号 2: 停止部位	配列番号
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	90	21210	21229	11
494157	238	257	CCTGTGACAGTGGTGGAGTA	95	21199	21218	12
	580	599			26690	26709	
	922	941			32237	32256	
	1606	1625			43330	43349	
	1948	1967			48874	48893	
	2290	2309			54420	54439	
	3316	3335			72037	72056	
494158	239	258	TCCTGTGACAGTGGTGGAGT	95	21200	21219	13
	581	600			26691	26710	
	923	942			32238	32257	
	1607	1626			43331	43350	
	1949	1968			48875	48894	
	2291	2310			54421	54440	
	3317	3336			72038	72057	
494159	241	260	CTTCCTGTGACAGTGGTGGGA	97	21202	21221	14
	583	602			26693	26712	
	925	944			32240	32259	
	1609	1628			43333	43352	
	1951	1970			48877	48896	
	2293	2312			54423	54442	
	3319	3338			72040	72059	
	4663	4682			94404	94423	
	5005	5024			115515	115534	
494160	242	261	CCTTCCTGTGACAGTGGTGG	97	21203	21222	15
	4664	4683			94405	94424	
	5006	5025			115516	115535	
494161	243	262	TCCTTCCTGTGACAGTGGTG	96	21204	21223	16
	4665	4684			94406	94425	
	5007	5026			115517	115536	
494162	244	263	GTCCTTCCTGTGACAGTGGT	95	21205	21224	17
	3664	3683			77585	77604	
	4666	4685			94407	94426	
	5008	5027			115518	115537	
494163	245	264	GGTCCTTCCTGTGACAGTGG	96	21206	21225	18
	4667	4686			94408	94427	
494164	246	265	AGGTCCTTCCTGTGACAGTG	93	21207	21226	19
	4668	4687			94409	94428	
494165	247	266	CAGGTCCTTCCTGTGACAGT	91	21208	21227	20
	4669	4688			94410	94429	
494166	248	267	GCAGGTCCTTCCTGTGACAG	89	21209	21228	21
494167	250	269	TGGCAGGTCCTTCCTGTGAC	92	21211	21230	22
494168	251	270	TTGGCAGGTCCTTCCTGTGA	89	21212	21231	23
494169	252	271	CTTGGCAGGTCCTTCCTGTG	92	21213	21232	24
494170	253	272	GCTTGGCAGGTCCTTCCTGT	88	21214	21233	25

10

20

30

40

【表 4 - 1】

ISIS 番号	配列 番号 1: 開 始部 位	配列 番号 1: 停 止部 位	配列	阻害%	配列番 号 2: 開 始部位	配列番 号 2: 停 止部位	配列 番号
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	91 84	21210	21229	11
494283	584	603	TCTTCCTGTGACAGTGGTGG	93	26694	26713	26
	926	945			32241	32260	
	1610	1629			43334	43353	
	1952	1971			48878	48897	
	2294	2313			54424	54443	
	3320	3339			72041	72060	
494284	585	604	TTCTTCCTGTGACAGTGGTG	95	26695	26714	27
	927	946			32242	32261	
	1611	1630			43335	43354	
	1953	1972			48879	48898	
	2295	2314			54425	54444	
	3321	3340			72042	72061	
494285	586	605	GTTCTTCCTGTGACAGTGGT	95	26696	26715	28
	928	947			32243	32262	
	1612	1631			43336	43355	
	1954	1973			48880	48899	
	2296	2315			54426	54445	
	3322	3341			72043	72062	
494286	587	606	GGTTCTTCCTGTGACAGTGG	95	26697	26716	29
	929	948			32244	32263	
	1613	1632			43337	43356	
	1955	1974			48881	48900	
	2297	2316			54427	54446	
494287	588	607	AGGTTCTTCCTGTGACAGTG	95	26698	26717	30
	930	949			32245	32264	
	1614	1633			43338	43357	
	1956	1975			48882	48901	
	2298	2317			54428	54447	
494288	589	608	CAGGTTCTTCCTGTGACAGT	91	26699	26718	31
	931	950			32246	32265	
	1615	1634			43339	43358	
	1957	1976			48883	48902	
	2299	2318			54429	54448	
	2983	3002			66500	66519	
494290	592	611	TGGCAGGTTCTTCCTGTGAC	90	26702	26721	32
	934	953			32249	32268	
	1618	1637			43342	43361	
	1960	1979			48886	48905	
	2302	2321			54432	54451	

10

20

30

40

【表 4 - 2】

	2986	3005			66503	66522	
494291	593	612	TTGGCAGGTTCTTCCTGTGA	89	26703	26722	33
	935	954			32250	32269	
	1619	1638			43343	43362	
	1961	1980			48887	48906	
	2303	2322			54433	54452	
	2987	3006			66504	66523	
494292	594	613	CTTGGCAGGTTCTTCCTGTG	94	26704	26723	35
	936	955			32251	32270	
	1620	1639			43344	43363	
	1962	1981			48888	48907	
	2304	2323			54434	54453	
	2988	3007			66505	66524	
494294	596	615	AGCTTGGCAGGTTCTTCCTG	90	26706	26725	36
	938	957			32253	32272	
	1622	1641			43346	43365	
	1964	1983			48890	48909	
	2306	2325			54436	54455	
	2990	3009			66507	66526	
494299	626	645	ACTATGCGAGTGTGGTGTCA	91	26736	26755	37
	968	987			32283	32302	
	1310	1329			37830	37849	
	1652	1671			43376	43395	
	1994	2013			48920	48939	
	2336	2355			54466	54485	
	2678	2697			60021	60040	
	3020	3039			66537	66556	
494300	627	646	GACTATGCGAGTGTGGTGTGTC	93	26737	26756	38
	969	988			32284	32303	
	1311	1330			37831	37850	
	1653	1672			43377	43396	
	1995	2014			48921	48940	
	2337	2356			54467	54486	
	2679	2698			60022	60041	
	3021	3040			66538	66557	
494301	628	647	CGACTATGCGAGTGTGGTGT	93	26738	26757	39
	970	989			32285	32304	
	1312	1331			37832	37851	
	1654	1673			43378	43397	
	1996	2015			48922	48941	
	2338	2357			54468	54487	
	2680	2699			60023	60042	

10

20

30

40

【表 4 - 3】

	3022	3041			66539	66558	
494302	629	648	CCGACTATGCGAGTGTGGTG	94	26739	26758	40
	971	990			32286	32305	
	1313	1332			37833	37852	
	1655	1674			43379	43398	
	1997	2016			48923	48942	
	2339	2358			54469	54488	
	2681	2700			60024	60043	
	3023	3042			66540	66559	
494303	630	649	TCCGACTATGCGAGTGTGGT	93	26740	26759	41
	972	991			32287	32306	
	1314	1333			37834	37853	
	1656	1675			43380	43399	
	1998	2017			48924	48943	
	2340	2359			54470	54489	
	2682	2701			60025	60044	
	3024	3043			66541	66560	
494304	631	650	GTCCGACTATGCGAGTGTGG	94	26741	26760	42
	973	992			32288	32307	
	1315	1334			37835	37854	
	1657	1676			43381	43400	
	1999	2018			48925	48944	
	2341	2360			54471	54490	
	2683	2702			60026	60045	
	3025	3044			66542	66561	
494305	632	651	GGTCCGACTATGCGAGTGTG	93	26742	26761	43
	974	993			32289	32308	
	1316	1335			37836	37855	
	1658	1677			43382	43401	
	2000	2019			48926	48945	
	2342	2361			54472	54491	
	2684	2703			60027	60046	
	3026	3045			66543	66562	
494306	633	652	GGGTCCGACTATGCGAGTGT	92	26743	26762	44
	975	994			32290	32309	
	1317	1336			37837	37856	
	1659	1678			43383	43402	
	2001	2020			48927	48946	
	2343	2362			54473	54492	
	2685	2704			60028	60047	
	3027	3046			66544	66563	
494307	1190	1209	CTGCTCAGTCGGTGCTTGTT	91	n/a	n/a	45

10

20

30

40

【表 4 - 4】

	2558	2577					
494310	1193	1212	CCTCTGCTCAGTCGGTGCTT	90	n/a	n/a	46
	2561	2580					
494311	1194	1213	GCCTCTGCTCAGTCGGTGCT	88	37714	37733	47
	2562	2581			59905	59924	
494334	1267	1286	CTTCCAGTGACAGTGGTGGA	90	37787	37806	48
	2635	2654			59978	59997	
494336	1269	1288	TTCTTCCAGTGACAGTGGTG	90	37789	37808	49
	2637	2656			59980	59999	
494337	1270	1289	GTTCTTCCAGTGACAGTGGT	95	37790	37809	50
	2638	2657			59981	60000	
494338	1271	1290	GGTTCTTCCAGTGACAGTGG	91	37791	37810	133
	2639	2658			59982	60001	
494521	6393	6412	GACCTTAAAAGCTTATACAC	82	140049	140068	51
494525	6397	6416	GTCAGACCTTAAAAGCTTAT	84	140053	140072	52
494530	6402	6421	TGTCAGTCAGACCTTAAAAG	82	140058	140077	53
494535	6407	6426	GAATTTGTCAGTCAGACCTT	85	140063	140082	54
494536	6408	6427	AGAATTTGTCAGTCAGACCT	83	140064	140083	55
494544	6417	6436	CCTTAATACAGAATTTGTCA	82	140073	140092	56

【表 5】

ISIS 番号	配列番号 1: 開始部 位	配列番号 1: 停止部 位	配列	阻害%	配列番 号 2: 開 始部位	配列番 号 2: 停止部 位	配列番号
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	84	21210	21229	11
494371	3900	3919	GCTCCGTTGGTGCTTGTTCA	93	n/a	n/a	57
494372	3901	3920	TGCTCCGTTGGTGCTTGTTT	93	n/a	n/a	58
494373	3902	3921	TTGCTCCGTTGGTGCTTGTT	83	n/a	n/a	59
494374	3903	3922	TTTGCTCCGTTGGTGCTTGTT	89	n/a	n/a	60
494375	3904	3923	CTTGCTCCGTTGGTGCTTG	85	n/a	n/a	61
494386	3977	3996	TCCTGTAACAGTGGTGGAGA	86	81985	82004	62
494387	3978	3997	TTCTGTAACAGTGGTGGAG	82	81986	82005	63
494388	3979	3998	CTTCCTGTAACAGTGGTGGGA	86	81987	82006	64
494389	3980	3999	CCTTCCTGTAACAGTGGTGG	92	81988	82007	65
494390	3981	4000	TCCTTCCTGTAACAGTGGTG	92	81989	82008	66
494391	3982	4001	GTCTTCCTGTAACAGTGGT	84	81990	82009	67
494392	3983	4002	TGTCCTTCCTGTAACAGTGG	81	81991	82010	68

【表 6】

ISIS 番 号	配列番号 1: 開始部 位	配列番号 1: 停止部 位	配列	阻害%	配列番号 2: 開始部 位	配列番号 2: 停止部 位	配列 番号
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	86	21210	21229	11
498369	3203	3222	TGGAGCCAGAATAACATTCG	91	70667	70686	69
498379	3213	3232	CCTCTAGGCTTGAGCCAGA	85	70677	70696	70
498408	3323	3342	AGTTCTTCCTGTGACAGTGG	86	72044	72063	71
498433	3367	3386	GTCCGACTATGCTGGTGTGG	87	72088	72107	72
498434	3368	3387	GGTCCGACTATGCTGGTGTG	86	72089	72108	73
498435	3369	3388	GGGTCCGACTATGCTGGTGT	83	72090	72109	74

【表 7】

ISIS 番号	配列番号 1: 開始部 位	配列番号 1: 停止部 位	配列	阻害%	配列番号 2: 開始部 位	配列番号 2: 停止部 位	配列番号
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	90	21210	21229	11
498229	2871	2890	CCTCTAGGCTTGGAATCGGG	90	65117	65136	75
498238	2883	2902	G TTCAGAAGGAGCCTCTAGG	93	65129	65148	76
498239	2884	2903	TG TTCAGAAGGAGCCTCTAG	94	65130	65149	77
498240	2887	2906	GCTTG TTCAGAAGGAGCCTC	98	n/a	n/a	78
	4573	4592					
498241	2888	2907	TGCTTG TTCAGAAGGAGCCT	94	n/a	n/a	79
	4574	4593					
498242	2889	2908	GTGCTTG TTCAGAAGGAGCC	96	n/a	n/a	80
	4575	4594					
498243	2890	2909	GGTGCTTG TTCAGAAGGAGC	97	n/a	n/a	81
	4576	4595					
498244	2891	2910	TGGTGCTTG TTCAGAAGGAG	92	n/a	n/a	82
	4577	4596					
498251	2898	2917	GCTCAGTTGGTGCTTGTTCA	90	n/a	n/a	83
498252	2899	2918	TGCTCAGTTGGTGCTTGTTTC	90	n/a	n/a	84

10

【表 8】

ISIS 番 号	配列番号 1: 開始部 位	配列番号 1: 停止部 位	配列	阻害%	配列番号 2: 開始部 位	配列番号 2: 停止部 位	配列番 号
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	91	21210	21229	11
498517	3548	3567	GCTTGGATCTGGGACCACCG	89	76233	76252	85

20

【表 9】

ISIS 番 号	配列番 号 1: 開 始部位	配列番 号 1: 停 止部位	配列	阻害%	配列番号 2: 開始部 位	配列番号 2: 停止部 位	配列 番号
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	94	21210	21229	11
498833	4900	4919	GCCTCCATGCTTGGAAGTGG	94	114205	114224	86
498859	4926	4945	GCTCAGTTGGTGCTGCTTCA	92	n/a	n/a	87
498868	4978	4997	CCTCGATAACTCTGGCCATT	94	115488	115507	88
498875	5003	5022	TCCTGTGACAGTGGTGGAGA	94	115513	115532	89

30

【表 10】

ISIS 番 号	配列番 号 1: 開 始部位	配列番 号 1: 停 止部位	配列	阻害%	配列番号 2: 開始部 位	配列番号 2: 停止部 位	配列番 号
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	92	21210	21229	11
499020	6257	6276	G TAGGTTGATGCTTCACTCT	91	139913	139932	90
499041	6318	6337	CGTTTGATTGCTGTCTATTA	90	139974	139993	91

40

【表 1 1】

ISIS 番号	配列番号 1: 開始部 位	配列番号 1: 停止部 位	配列	阻害%	配列番号 2: 開始部 位	配列番号 2: 停止部 位	配列番 号
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	91	21210	21229	11
498523	3554	3573	CTCTGTGCTTGGATCTGGGA	94	76239	76258	92
498524	3555	3574	CCTCTGTGCTTGGATCTGGG	96	76240	76259	93
498525	3556	3575	GCCTCTGTGCTTGGATCTGG	94	76241	76260	94
498529	3560	3579	AGAAGCCTCTGTGCTTGGAT	89	76245	76264	95
498535	3566	3585	TTCAGAAGAAGCCTCTGTGC	89	76251	76270	96
498550	3582	3601	GCTCCGTTGGTGCTTCTTCA	90	n/a	n/a	97
498553	3585	3604	TTTGCTCCGTTGGTGCTTCT	87	n/a	n/a	98
498555	3587	3606	GCTTTGCTCCGTTGGTGCTT	90	n/a	n/a	99
	3905	3924					
498556	3588	3607	GGCTTTGCTCCGTTGGTGCT	89	77509	77528	100
	3906	3925			81914	81933	
498557	3589	3608	GGGCTTTGCTCCGTTGGTGCT	89	77510	77529	101
	3907	3926			81915	81934	
498579	3662	3681	CCTTCCTGTGACAGTGGTAG	87	77583	77602	102
498580	3663	3682	TCCTTCCTGTGACAGTGGTA	92	77584	77603	103
498581	3665	3684	TGTCCTTCCTGTGACAGTGG	94	77586	77605	104
	5009	5028			115519	115538	

10

20

【表 1 2】

ISIS 番号	配列番号 1: 開始部 位	配列番号 1: 停止部 位	配列	阻害%	配列番 号 2: 開 始部位	配列番 号 2: 停 止部位	配列番 号
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	100	21210	21229	11
494230	477	496	CCTCTAGGCTTGAACCGGG	95	25380	25399	105
	819	838			30927	30946	
	1161	1180			36471	36490	
	1503	1522			42020	42039	
	1845	1864			47564	47583	
	2187	2206			53110	53129	
	2529	2548			58662	58681	
494243	494	513	TGCTTGTTTCGGAAGGAGCCT	93	n/a	n/a	106
	836	855					
	1178	1197					
	1520	1539					
	1862	1881					
	2204	2223					
494244	2546	2565					
	495	514	GTGCTTGTTTCGGAAGGAGCC	95	n/a	n/a	107
	837	856					
	1179	1198					
	1521	1540					
	1863	1882					
	2205	2224					
494244	2547	2566					

30

40

【表 1 3】

ISIS 番号	配列番号 1: 開始部位	配列番号 1: 停止部位	配列	阻害%	配列番号 2: 開始部位	配列番号 2: 停止部位	配列 番号
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	96	21210	21229	11
494466	4208	4227	GCTTGGAAGTGGGACCACCG	95	85138	85157	108
494470	4212	4231	CTGTGCTTGGAAGTGGGACC	94	85142	85161	109
494472	4214	4233	CTCTGTGCTTGGAAGTGGGA	92	85144	85163	110

【実施例 3】

10

【0 3 5 6】

遺伝子導入マウスの初代培養肝細胞におけるアポ（a）の用量依存アンチセンス阻害

アポ（a）mRNA の有意な体外阻害を示す上述の研究からのギャップマーを選択し、類似する培養条件の一連の平行研究において、遺伝子導入マウスの初代培養肝細胞で様々な用量で試験した。ウェル当たり 35, 000 の密度で細胞を平板培養し、エレクトロポレーションを使用して、0.0625 μM、0.125 μM、0.25 μM、0.500 μM、または 1.000 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 時間の処置期間後、RNA を細胞から単離し、定量的リアルタイム PCR によってアポ（a）mRNA レベルを測定した。mRNA レベルを測定するために、アポ（a）プライマープローブセット hAPO（a）12 k B を使用した。RIBOGREEN（登録商標）によって測定される、全 RNA 含量によりアポ（a）mRNA レベルを調整した。未処置の対照細胞に対するアポ（a）の阻害パーセントとして結果を提示する。

20

【0 3 5 7】

研究のそれぞれの結果は下に提示される表に示され、各表は別々の実験を表す。各オリゴヌクレオチドの半最大阻害濃度（IC₅₀）も表に表す。アポ（a）mRNA レベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチド処置された細胞において、用量依存様式で有意に減少した。新規に設計されたオリゴの効力をベンチマークオリゴヌクレオチド ISIS 144367 と比較した。

【表 1 4】

ISIS 番号	0.0625 μM	0.125 μM	0.250 μM	0.500 μM	1.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	11	27	46	62	80	0.31
494157	11	47	53	76	87	0.23
494158	19	57	75	84	88	0.13
494159	41	65	77	84	92	0.07
494160	44	69	76	85	91	0.06
494161	40	64	74	85	91	0.08
494162	36	63	76	87	88	0.09
494163	20	59	75	85	92	0.13
494164	3	45	62	74	90	0.21
494165	25	39	57	71	75	0.19
494166	17	30	47	59	76	0.31
494167	30	43	55	72	80	0.18
494168	25	36	44	59	75	0.28
494169	19	39	51	61	81	0.25

30

40

【表 1 5】

ISIS 番号	0.0625 μM	0.125 μM	0.250 μM	0.500 μM	1.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	23	40	58	76	88	0.19
494170	38	34	60	76	84	0.13
494230	55	71	89	95	97	0.03
494243	47	73	87	92	97	0.05
494244	58	73	86	92	96	0.03
494283	54	70	84	93	94	0.05
494284	45	62	83	92	95	0.07
494285	56	70	84	92	95	0.04
494286	51	70	87	93	95	0.05
494287	32	60	67	87	91	0.11
494288	26	41	61	79	88	0.17
494290	30	43	64	81	87	0.15
494291	29	40	56	75	85	0.18

10

【表 1 6】

ISIS 番号	0.0625 μM	0.125 μM	0.250 μM	0.500 μM	1.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	10	38	62	68	84	0.23
494292	17	36	74	85	90	0.17
494294	10	34	53	80	91	0.22
494299	32	29	56	77	88	0.16
494300	34	46	76	86	90	0.12
494301	44	56	72	86	89	0.09
494302	42	59	78	88	89	0.08
494303	37	58	70	86	89	0.10
494304	46	71	78	89	90	0.05
494305	39	58	62	85	87	0.10
494306	31	52	65	79	88	0.13
494307	23	23	39	65	78	0.34
494310	14	29	62	70	88	0.25

20

30

【表 1 7】

ISIS 番号	0.0625 μM	0.125 μM	0.250 μM	0.500 μM	1.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	0	29	45	73	92	0.27
494311	28	53	65	85	95	0.13
494334	20	44	66	86	96	0.16
494336	15	38	54	84	97	0.20
494337	28	50	77	90	98	0.12
494338	21	40	68	91	98	0.15
494371	19	0	71	89	97	0.15
494372	33	44	77	91	97	0.12
494373	15	36	65	83	95	0.19
494374	3	17	51	83	90	0.24
494375	1	34	56	80	93	0.23
494386	13	26	46	73	91	0.25
494387	17	27	45	67	88	0.28

10

【表 1 8】

ISIS 番号	0.0625 μM	0.125 μM	0.250 μM	0.500 μM	1.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	35	42	62	70	91	0.15
494537	19	34	54	79	90	0.21
494544	10	38	73	86	94	0.17
498229	36	58	80	92	97	0.10
498238	41	57	75	91	97	0.09
498239	56	71	79	90	94	0.03
498240	91	94	98	99	100	<0.06
498241	75	84	91	96	98	<0.06
498242	11	27	42	47	63	0.49
498243	91	93	96	98	99	<0.06
498244	4	0	0	13	43	>1.00
498251	30	30	42	73	89	0.26
498252	37	33	58	80	92	0.20
498369	22	22	10	22	34	>1.00

20

30

【表 1 9】

ISIS 番号	0.0625 μM	0.125 μM	0.250 μM	0.500 μM	1.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	15	32	54	75	90	0.22
498379	29	48	71	80	95	0.13
498408	38	57	77	88	96	0.09
498433	29	36	70	88	96	0.15
498434	49	43	50	78	90	0.19
498435	27	39	57	78	93	0.18
498517	64	72	82	93	98	<0.06
498721	77	84	88	96	97	<0.06
498833	73	78	91	95	99	<0.06
498859	7	24	37	62	75	0.36
498868	7	14	39	63	81	0.36
498875	16	21	33	55	81	0.39
499020	7	24	23	55	78	0.36
499041	6	16	33	64	83	0.35

10

【表 2 0】

ISIS 番号	0.0625 μM	0.125 μM	0.250 μM	0.500 μM	1.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	14	47	64	79	91	0.14
498523	36	50	80	87	95	0.11
498524	43	79	87	93	97	0.01
498525	32	49	75	86	96	0.12
498529	21	49	57	78	90	0.17
498535	20	34	55	76	86	0.21
498550	12	50	69	84	96	0.11
498553	8	43	55	77	91	0.21
498555	13	35	68	86	94	0.19
498556	27	37	71	85	91	0.15
498557	18	42	75	89	95	0.16
498579	16	38	67	89	95	0.16
498580	36	57	81	91	96	0.10
498581	34	64	75	93	97	0.05

20

30

【表 2 1】

ISIS 番号	0.0625 μM	0.125 μM	0.250 μM	0.500 μM	1.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	0	9	26	49	77	0.47
494388	0	0	21	33	55	0.89
494389	0	15	22	50	79	0.46
494390	5	20	37	68	81	0.33
494391	7	20	32	54	68	0.46
494392	18	24	40	57	76	0.35
494466	33	45	58	69	82	0.16
494470	45	58	68	79	87	0.08
494472	37	50	60	69	83	0.13
494521	0	0	0	15	54	0.17
494525	0	0	2	28	65	0.85
494530	0	6	27	51	80	0.46
494535	0	7	24	53	74	0.49
494536	0	2	15	42	67	0.63

10

【表 2 2】

ISIS 番号	0.0625 μM	0.125 μM	0.250 μM	0.500 μM	1.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	0	4	16	26	77	0.65
498379	12	18	27	32	63	0.81
498408	0	11	46	50	77	0.41
498433	22	30	46	60	83	0.27
498434	39	29	25	47	78	0.40
498435	21	28	26	43	73	0.50
498517	44	48	63	70	84	0.11
498721	54	54	66	75	89	<0.06
498833	44	51	58	67	83	0.11
498859	0	29	14	35	66	0.69
498868	0	12	9	26	60	1.07
498875	0	30	31	53	78	0.40
499020	0	27	19	45	74	0.51
499041	0	12	10	37	65	0.77

20

30

【0 3 5 8】

上の表に提示されるように、ISIS 494157 (配列番号12)、ISIS 494158 (配列番号13)、ISIS 494159 (配列番号14)、ISIS 494160 (配列番号15)、ISIS 494161 (配列番号16)、ISIS 494162 (配列番号17)、ISIS 494163 (配列番号18)、ISIS 494164 (配列番号19)、ISIS 494165 (配列番号20)、ISIS 494167 (配列番号22)、ISIS 494168 (配列番号23)、ISIS 494169 (配列番号24)、ISIS 494170 (配列番号25)、ISIS 494230 (配列番号105)、ISIS 494243 (配列番号106)、ISIS 494244 (配列番号107)、ISIS 494283 (配列番号26)、ISIS 494284 (配列番号27)、ISIS 494285 (配列番号28)、ISIS 494286 (配列番号29)、ISIS 494287 (配列番号30)、ISIS

40

50

S 494288 (配列番号31)、ISIS 494290 (配列番号32)、ISIS
 S 494291 (配列番号33)、ISIS 494292 (配列番号35)、ISIS
 S 494294 (配列番号36)、ISIS 494299 (配列番号37)、ISIS
 S 494300 (配列番号38)、ISIS 494301 (配列番号39)、ISIS
 S 494302 (配列番号40)、ISIS 494303 (配列番号41)、ISIS
 S 494304 (配列番号42)、ISIS 494305 (配列番号43)、ISIS
 S 494306 (配列番号44)、ISIS 494311 (配列番号47)、ISIS
 S 494334 (配列番号48)、ISIS 494336 (配列番号49)、ISIS
 S 494337 (配列番号50)、ISIS 494338 (配列番号133)、IS
 IS 494371 (配列番号57)、ISIS 494372 (配列番号58)、IS
 IS 494373 (配列番号59)、ISIS 494374 (配列番号60)、IS
 IS 494375 (配列番号61)、ISIS 494386 (配列番号62)、IS
 IS 494389 (配列番号65)、ISIS 494390 (配列番号66)、IS
 IS 494392 (配列番号68)、ISIS 494466 (配列番号108)、I
 SIS 494470 (配列番号109)、ISIS 494472 (配列番号110)
 、ISIS 494521 (配列番号51)、ISIS 494530 (配列番号53)
 、ISIS 498229 (配列番号75)、ISIS 498238 (配列番号76)
 、ISIS 498239 (配列番号77)、ISIS 498240 (配列番号78)
 、ISIS 498241 (配列番号79)、ISIS 498243 (配列番号81)
 、ISIS 498379 (配列番号70)、ISIS 498408 (配列番号71
)、ISIS 498433 (配列番号72)、ISIS 498434 (配列番号73
)、ISIS 498435 (配列番号74)、ISIS 498517 (配列番号85
)、ISIS 498523 (配列番号92)、ISIS 498524 (配列番号93
)、ISIS 498525 (配列番号94)、ISIS 498550 (配列番号97
)、ISIS 498580 (配列番号103)、ISIS 498581 (配列番号1
 04)、ISIS 498721 (ATGCCTCGATAACTCCGTCC; 配列番
 号134)、ISIS 498833 (配列番号86)、ISIS 498875 (配列
 番号89)、およびISIS 499020 (配列番号90)は、ISIS 14436
 7 (配列番号11)より強力であった。

10

20

【実施例4】

30

【0359】

遺伝子導入マウスの初代培養肝細胞におけるアポ(a)の用量依存アンチセンス阻害

上述の研究からの強力なギャップマーをさらに選択し、類似する培養条件の一連の研究
 において、遺伝子導入マウスの初代培養肝細胞で様々な用量で試験した。ウェル当たり3
 5, 000の密度で細胞を平板培養し、エレクトロポレーションを使用して、下の表に指
 定されるように、0.049 μ M、0.148 μ M、0.444 μ M、1.333 μ M、
 または4.000 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16時間の処置期間後、RNAを細胞から単離し、定量的リアルタイムPCRによって
 アポ(a)mRNAレベルを測定した。mRNAレベルを測定するために、アポ(a)プ
 ライマープローブセットhAPO(a)12kBを使用した。RIBOGREEN(登録
 商標)によって測定される、全RNA含量によりアポ(a)mRNAレベルを調整した。
 未処置の対照細胞に対するアポ(a)の阻害パーセントとして結果を提示する。

40

【0360】

研究のそれぞれの結果は下に提示される表に示され、各表は別々の実験を表す。各オリ
 ゴヌクレオチドの半最大阻害濃度(IC₅₀)も表に表す。アポ(a)mRNAレベルは
 、アンチセンスオリゴヌクレオチド処置された細胞において、用量依存様式で有意に減少
 した。新規に設計されたオリゴの効力をベンチマークオリゴヌクレオチドISIS 14
 4367と比較した。下の表に提示されるように、ISIS 494157(配列番号1
 2)、ISIS 494158(配列番号13)、ISIS 494159(配列番号1
 4)、ISIS 494160(配列番号15)、ISIS 494161(配列番号1

50

6)、ISIS 494162 (配列番号17)、ISIS 494163 (配列番号18)、ISIS 494164 (配列番号19)、ISIS 494230 (配列番号105)、ISIS 494243 (配列番号106)、ISIS 494244 (配列番号107)、ISIS 494283 (配列番号26)、ISIS 494284 (配列番号27)、ISIS 494285 (配列番号28)、ISIS 494286 (配列番号29)、ISIS 494287 (配列番号30)、ISIS 494290 (配列番号32)、ISIS 494292 (配列番号35)、ISIS 494300 (配列番号38)、ISIS 494301 (配列番号39)、ISIS 494302 (配列番号40)、ISIS 494303 (配列番号41)、ISIS 494304 (配列番号42)、ISIS 494305 (配列番号43)、ISIS 494306 (配列番号44)、ISIS 494310 (配列番号46)、ISIS 494311 (配列番号47)、ISIS 494337 (配列番号50)、ISIS 494371 (配列番号57)、ISIS 494372 (配列番号58)、ISIS 494375 (配列番号61)、ISIS 494388 (配列番号64)、ISIS 494389 (配列番号65)、ISIS 494390 (配列番号66)、ISIS 494392 (配列番号68)、ISIS 494466 (配列番号108)、ISIS 494470 (配列番号109)、ISIS 494472 (配列番号110)、ISIS 498238 (配列番号76)、ISIS 498239 (配列番号77)、ISIS 498433 (配列番号72)、ISIS 498434 (配列番号73)、ISIS 498435 (配列番号74)、ISIS 498523 (配列番号92)、ISIS 498524 (配列番号93)、ISIS 498525 (配列番号94)、ISIS 498580 (配列番号103)、および ISIS 498581 (配列番号104) は、ISIS 144367 (配列番号11) より強力であった。

【表23】

ISIS 番号	0.049 μM	0.148 μM	0.444 μM	1.333 μM	4.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	0	26	67	89	92	0.32
494157	23	50	83	96	96	0.15
494158	26	62	85	96	96	0.11
494159	42	65	87	95	94	0.07
494160	51	70	88	94	94	<0.05
494161	36	67	87	95	96	0.08
494162	40	69	89	94	95	0.07
494163	41	57	87	95	94	0.08
494164	15	43	75	93	96	0.20
494230	39	77	94	99	99	0.05
494243	39	76	92	98	99	0.06
494244	58	79	91	97	99	0.02
494283	18	45	80	93	91	0.18
494284	9	53	80	95	94	0.18

【表 2 4】

ISIS 番号	0.049 μM	0.148 μM	0.444 μM	1.333 μM	4.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	21	40	79	94	93	0.18
494285	53	68	90	97	97	<0.05
494286	46	69	89	96	97	0.05
494287	31	38	79	94	95	0.15
494290	22	53	74	93	94	0.16
494292	37	51	81	93	95	0.11
494294	22	40	72	91	94	0.19
494299	15	43	75	93	95	0.20
494300	25	38	79	95	95	0.17
494301	23	48	82	92	95	0.15
494302	26	59	86	93	94	0.12
494303	10	58	84	92	91	0.16
494304	25	62	83	93	93	0.12

10

【表 2 5】

ISIS 番号	0.049 μM	0.148 μM	0.444 μM	1.333 μM	4.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	23	40	70	90	94	0.19
494305	20	48	82	93	95	0.16
494306	26	53	78	91	92	0.14
494310	36	50	79	88	92	0.12
494311	38	50	74	93	95	0.12
494334	20	42	73	90	94	0.19
494336	5	39	74	92	95	0.23
494337	23	51	87	96	96	0.14
494338	12	42	82	93	95	0.19
494371	28	49	82	94	94	0.14
494372	28	54	81	93	88	0.13
494373	21	28	67	86	92	0.25
494375	26	40	77	85	92	0.18

20

30

【表 2 6】

ISIS 番号	0.049 μM	0.148 μM	0.444 μM	1.333 μM	4.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	5	33	65	78	81	0.32
494388	30	32	60	82	86	0.25
494389	30	45	69	84	84	0.17
494390	32	47	67	83	87	0.16
494392	23	38	54	79	82	0.31
494466	48	67	86	91	95	0.04
494470	74	87	92	96	98	<0.05
494472	69	84	92	96	97	<0.05
494544	5	18	49	74	79	0.48
498238	25	51	76	92	96	0.15
498239	25	62	83	93	97	0.12
498379	5	21	53	71	81	0.55
498408	1	38	63	79	80	0.32
498433	23	43	70	77	79	0.21

10

【表 2 7】

ISIS 番号	0.049 μM	0.148 μM	0.444 μM	1.333 μM	4.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	0	40	76	90	93	0.26
498434	32	44	64	78	84	0.20
498435	24	42	64	77	79	0.23
498517	28	23	53	81	85	0.45
498523	50	64	81	90	93	<0.05
498524	53	70	84	93	96	<0.05
498525	38	55	80	92	96	0.09
498550	12	18	62	81	83	0.33
498557	13	33	67	79	83	0.33
498579	6	42	69	80	85	0.31
498580	6	46	76	82	83	0.23
498581	5	40	78	81	84	0.25
498721	40	31	58	78	83	0.35
498833	21	20	58	80	90	0.44

20

30

【実施例 5】

【0 3 6 1】

遺伝子導入マウスの初代培養肝細胞におけるヒトアポ（a）のアンチセンス阻害

アポ（a）核酸を標的指向するさらなるアンチセンスオリゴヌクレオチドが新規に設計され、体外でのアポ（a）mRNAに対するそれらの効果について試験された。類似する培養条件を有する一連の実験において、アンチセンスオリゴヌクレオチドを試験した。ヒトアポ（a）遺伝子導入マウスからの初代培養肝細胞を本研究に使用した。エレクトロポレーションを使用して、ウェル当たり35,000細胞の密度の肝細胞を1,000nM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24時間の処置期間後、RNAを細胞から単離し、定量的リアルタイムPCRによってアポ（a）mRNAレベル

40

50

を測定した。mRNAレベルを測定するために、ヒトプライマープローブセットhAPO (a) 12 k Bを使用した。RIBOGREEN (登録商標) によって測定される、全RNA含量によりアポ (a) mRNAレベルを調整した。各実験の結果は、下に示される別々の表に提示される。比較のために、ISIS 144367も本研究に含まれた。未処置の対照細胞に対するアポ (a) の阻害パーセントとして結果を提示する。これらの培養条件下で、合計231のアンチセンスオリゴヌクレオチドを試験した。さらなる研究用に選択されたアンチセンスオリゴヌクレオチドのみが下に提示される。

【0362】

新規に設計されたキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドを3-10-4MOEギャップマーとして設計した。ギャップマーは長さが17個のヌクレオシドであり、中央ギャップセグメントは10個の2'-デオキシヌクレオシドを含み、かつそれぞれ、3個のヌクレオシドおよび4個のヌクレオシドを含む5'方向および3'方向上のウィングセグメントに隣接する。5'ウィングセグメントの各ヌクレオシドおよび3'ウィングセグメントの各ヌクレオシドは、2'-MOE修飾を有する。各ギャップマー全体のヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート (P=S) 結合である。各ギャップマー全体の全てのシトシン残基は、5-メチルシトシンである。

10

【0363】

アポ (a) 標的配列は複数のクリングル反復配列を含有し、したがって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドがクリングル配列を標的指向するか否かにより、アポ (a) の1つ以上の領域を標的指向することができる。「開始部位」は、ギャップマーがヒト配列において標的指向される最も5'側のヌクレオシドを示す。「停止部位」は、ギャップマーがヒト配列において標的指向される最も3'側のヌクレオシドを示す。アポ (a) アンチセンスオリゴヌクレオチドは、クリングル反復を標的指向するか否かにより、2つ以上の「開始部位」または「停止部位」を有することができる。

20

【0364】

表に列挙される大半のギャップマーは、本明細書において配列番号1として指定されるヒトアポ (a) mRNA (GENBANK受託番号NM_005577.2)、もしくは本明細書において配列番号2として指定されるヒトアポ (a) ゲノム配列 (ヌクレオチド3230000~3380000が先端切断されたGENBANK受託番号NT_007422.12) のいずれか、またはそれらの両方の複数の領域に100%相補性で標的指向される。「n/a」は、アンチセンスオリゴヌクレオチドが100%相補性でその特定の配列を標的指向しないことを示す。

30

【表 28-1】

ISIS 番号	配列番号 1: 開始部位	配列番号 1: 停止部位	配列	阻害%	配列番号 2: 開始部位	配列番号 2: 停止部位	配列番号	
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	64	21210	21229	11	
510542	241	257	CCTGTGACAGTGGTGGA	79	21202	21218	111	10
	583	599	CCTGTGACAGTGGTGGA		26693	26709		
	925	941	CCTGTGACAGTGGTGGA		32240	32256		
	1609	1625	CCTGTGACAGTGGTGGA		43333	43349		
	1951	1967	CCTGTGACAGTGGTGGA		48877	48893		
	2293	2309	CCTGTGACAGTGGTGGA		54423	54439		
	3319	3335	CCTGTGACAGTGGTGGA		72040	72056		
	4663	4679	CCTGTGACAGTGGTGGA		94404	94420		
	5005	5021	CCTGTGACAGTGGTGGA		115515	115531		
510543	242	258	TCCTGTGACAGTGGTGG	75	21203	21219	112	20
	584	600	TCCTGTGACAGTGGTGG		26694	26710		
	926	942	TCCTGTGACAGTGGTGG		32241	32257		
	1610	1626	TCCTGTGACAGTGGTGG		43334	43350		
	1952	1968	TCCTGTGACAGTGGTGG		48878	48894		
	2294	2310	TCCTGTGACAGTGGTGG		54424	54440		
	3320	3336	TCCTGTGACAGTGGTGG		72041	72057		
	4664	4680	TCCTGTGACAGTGGTGG		94405	94421		
	5006	5022	TCCTGTGACAGTGGTGG		115516	115532		
510544	243	259	TTCCTGTGACAGTGGTG	73	21204	21220	113	30
	585	601	TTCCTGTGACAGTGGTG		26695	26711		
	927	943	TTCCTGTGACAGTGGTG		32242	32258		
	1611	1627	TTCCTGTGACAGTGGTG		43335	43351		
	1953	1969	TTCCTGTGACAGTGGTG		48879	48895		
	2295	2311	TTCCTGTGACAGTGGTG		54425	54441		
	3321	3337	TTCCTGTGACAGTGGTG		72042	72058		
	4665	4681	TTCCTGTGACAGTGGTG		94406	94422		
	5007	5023	TTCCTGTGACAGTGGTG		115517	115533		
510545	244	260	CTTCCTGTGACAGTGGT	65	21205	21221	114	40
	586	602	CTTCCTGTGACAGTGGT		26696	26712		
	928	944	CTTCCTGTGACAGTGGT		32243	32259		
	1612	1628	CTTCCTGTGACAGTGGT		43336	43352		
	1954	1970	CTTCCTGTGACAGTGGT		48880	48896		
	2296	2312	CTTCCTGTGACAGTGGT		54426	54442		
	3322	3338	CTTCCTGTGACAGTGGT		72043	72059		
	3664	3680	CTTCCTGTGACAGTGGT		77585	77601		
	4666	4682	CTTCCTGTGACAGTGGT		94407	94423		
	5008	5024	CTTCCTGTGACAGTGGT		115518	115534		

【表 2 8 - 2】

510546	245	261	CCTTCCTGTGACAGTGG	74	21206	21222	115
	3665	3681	CCTTCCTGTGACAGTGG		77586	77602	
	4667	4683	CCTTCCTGTGACAGTGG		94408	94424	
	5009	5025	CCTTCCTGTGACAGTGG		115519	115535	
510547	246	262	TCCTTCCTGTGACAGTG	77	21207	21223	116
	3666	3682	TCCTTCCTGTGACAGTG		77587	77603	
	4668	4684	TCCTTCCTGTGACAGTG		94409	94425	
	5010	5026	TCCTTCCTGTGACAGTG		115520	115536	
510548	247	263	GTCCTTCCTGTGACAGT	73	21208	21224	117
	3667	3683	GTCCTTCCTGTGACAGT		77588	77604	
	4669	4685	GTCCTTCCTGTGACAGT		94410	94426	
	5011	5027	GTCCTTCCTGTGACAGT		115521	115537	
510549	248	264	GGTCCTTCCTGTGACAG	67	21209	21225	118
	4670	4686	GGTCCTTCCTGTGACAG		94411	94427	
510595	632	648	CCGACTATGCGAGTGTG	76	26742	26758	119
	974	990	CCGACTATGCGAGTGTG		32289	32305	
	1316	1332	CCGACTATGCGAGTGTG		37836	37852	
	1658	1674	CCGACTATGCGAGTGTG		43382	43398	
	2000	2016	CCGACTATGCGAGTGTG		48926	48942	
	2342	2358	CCGACTATGCGAGTGTG		54472	54488	
	2684	2700	CCGACTATGCGAGTGTG		60027	60043	
	3026	3042	CCGACTATGCGAGTGTG		66543	66559	
510597	634	650	GTCCGACTATGCGAGTG	70	26744	26760	120
	976	992	GTCCGACTATGCGAGTG		32291	32307	
	1318	1334	GTCCGACTATGCGAGTG		37838	37854	
	1660	1676	GTCCGACTATGCGAGTG		43384	43400	
	2002	2018	GTCCGACTATGCGAGTG		48928	48944	
	2344	2360	GTCCGACTATGCGAGTG		54474	54490	
	2686	2702	GTCCGACTATGCGAGTG		60029	60045	
	3028	3044	GTCCGACTATGCGAGTG		66545	66561	
510598	635	651	GGTCCGACTATGCGAGT	70	26745	26761	121
	977	993	GGTCCGACTATGCGAGT		32292	32308	
	1319	1335	GGTCCGACTATGCGAGT		37839	37855	
	1661	1677	GGTCCGACTATGCGAGT		43385	43401	
	2003	2019	GGTCCGACTATGCGAGT		48929	48945	
	2345	2361	GGTCCGACTATGCGAGT		54475	54491	
	2687	2703	GGTCCGACTATGCGAGT		60030	60046	
	3029	3045	GGTCCGACTATGCGAGT		66546	66562	

【表 2 9】

ISIS 番号	配列番号 1: 開始部位	配列番号 1: 停止部位	配列	阻害%	配列番号 2: 開始部位	配列番号 2: 停止部位	配列番号
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	83	21210	21229	11
510783	6400	6416	GTCAGACCTTAAAAGCT	75	140056	140072	122
512944	3561	3577	AAGCCTCTGTGCTTGGGA	81	76246	76262	123
512947	3560	3576	AGCCTCTGTGCTTGGAT	85	76245	76261	124
512958	3559	3575	GCCTCTGTGCTTGGATC	82	76244	76260	125
512959	3585	3601	GCTCCGTTGGTGCTTCT	77	n/a	n/a	126

10

20

30

40

【表 3 0】

ISIS 番号	配列番号 1: 開始部位	配列番号 1: 停止部位	配列	阻害%	配列番号 2: 開始部位	配列番号 2: 停止部位	配列 番号
144367	249	268	GGCAGGTCCTTCCTGTGACA	76	21210	21229	11
510701	4217	4233	CTCTGTGCTTGGAAGT	78	85147	85163	127
510702	219	235	TGCCTCGATAACTCTGT	79	21180	21196	128
	561	577			26671	26687	
	903	919			32218	32234	
	1245	1261			37765	37781	
	1587	1603			43311	43327	
	1929	1945			48855	48871	
	2271	2287			54401	54417	
	2613	2629			59956	59972	
	4299	4315			86472	86488	
510704	563	579	TGTGCCTCGATAACTCT	80	26673	26689	129
	905	921			32220	32236	
	1247	1263			37767	37783	
	1589	1605			43313	43329	
	1931	1947			48857	48873	
	2273	2289			54403	54419	
	2615	2631			59958	59974	
	4301	4317			86474	86490	
	4985	5001			115495	115511	
510757	4929	4945	GCTCAGTTGGTGCTGCT	74	n/a	n/a	130

【実施例 6】

【0365】

遺伝子導入マウスの初代培養肝細胞におけるアポ（a）の用量依存アンチセンス阻害

上述の研究からの強力なギャップマーをさらに選択し、類似する培養条件の一連の研究において、遺伝子導入マウスの初代培養肝細胞で様々な用量で試験した。ウェル当たり 35, 000 の密度で細胞を平板培養し、エレクトロポレーションを使用して、下の表に指定されるように、0.156 μ M、0.313 μ M、0.625 μ M、1.250 μ M、2.500 μ M、または 5.000 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 16 時間の処置期間後、RNA を細胞から単離し、定量的リアルタイム PCR によってアポ（a）mRNA レベルを測定した。mRNA レベルを測定するために、アポ（a）プライマープローブセット hAPO（a）12 k B を使用した。RIBO GREEN（登録商標）によって測定される、全 RNA 含量によりアポ（a）mRNA レベルを調整した。未処置の対照細胞に対するアポ（a）の阻害パーセントとして結果を提示する。

【0366】

研究のそれぞれの結果は下に提示される表に示され、各表は別々の実験を表す。各オリゴヌクレオチドの半最大阻害濃度（IC₅₀）も表に表す。

【表 3 1】

ISIS 番号	0.156 μM	0.312 μM	0.625 μM	1.250 μM	2.500 μM	5.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	28	55	70	83	90	92	0.31
510542	33	58	75	87	89	90	0.27
510543	33	45	68	78	89	89	0.34
510544	33	50	65	78	88	90	0.33
510545	33	58	76	87	91	90	0.26
510546	39	62	76	87	89	91	0.22
510547	36	66	82	84	86	91	0.22
510548	50	70	82	91	88	90	0.13
510549	32	59	73	85	86	90	0.27
510595	26	57	78	88	90	90	0.29
510597	30	53	76	85	89	89	0.30

10

【表 3 2】

ISIS 番号	0.156 μM	0.312 μM	0.625 μM	1.250 μM	2.500 μM	5.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	36	52	78	87	93	94	0.26
510598	48	58	81	88	93	92	0.18
510701	45	59	78	87	95	95	0.18
510702	49	63	75	90	94	95	0.15
510704	55	67	80	93	94	95	<0.16
510757	34	48	68	79	90	93	0.33
510783	21	32	51	58	78	84	0.69
512944	57	72	81	91	96	97	<0.16
512947	64	74	86	92	96	97	<0.16
512958	48	69	83	91	96	97	0.13
512959	39	59	76	84	93	93	0.22

20

30

【表 3 3】

ISIS 番号	0.156 μM	0.312 μM	0.625 μM	1.250 μM	2.500 μM	5.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	41	58	75	81	88	87	0.22
510542	38	54	69	74	85	83	0.27
510545	21	43	73	77	80	78	0.39
510546	37	58	73	81	83	81	0.24
510547	38	58	72	79	84	86	0.24
510548	40	63	77	79	81	84	0.21
510549	37	47	67	77	81	83	0.31
510595	34	66	73	81	80	75	0.23
510597	39	59	74	83	76	77	0.23

40

【表 3 4】

ISIS 番号	0.156 μM	0.312 μM	0.625 μM	1.250 μM	2.500 μM	5.000 μM	IC ₅₀ (μM)
144367	33	60	72	83	81	81	0.26
510598	47	62	75	75	76	76	0.18
510701	41	67	80	87	92	91	0.19
510702	51	64	77	80	80	83	0.13
510704	54	61	77	84	89	80	0.12
512944	71	74	81	88	92	94	0.02
512947	65	77	86	90	93	95	0.03
512958	63	73	84	92	93	96	0.06
512959	39	62	80	82	86	82	0.22

10

【0367】

アポ (a) mRNA レベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチド処置された細胞において、用量依存様式で有意に減少した。新規に設計されたオリゴヌクレオチドの効力をベンチマークオリゴヌクレオチド ISIS 144367 と比較した。上の表に提示されるように、ISIS 510542 (配列番号111)、ISIS 510545 (配列番号114)、ISIS 510546 (配列番号115)、ISIS 510547 (配列番号116)、ISIS 510548 (配列番号117)、ISIS 510549 (配列番号118)、ISIS 510595 (配列番号119)、ISIS 510597 (配列番号120)、ISIS 510598 (配列番号121)、ISIS 510701 (配列番号127)、ISIS 510702 (配列番号128)、ISIS 510704 (配列番号129)、ISIS 512944 (配列番号123)、ISIS 512947 (配列番号124)、ISIS 512958 (配列番号125)、および ISIS 512959 (配列番号126) は、ISIS 144367 (配列番号11) より強力であった。

20

【実施例7】

【0368】

ヒトアポ (a) 遺伝子導入マウスにおけるヒトアポ (a) の体内でのアンチセンス阻害に対する効果

30

ヒトアポ (a) 遺伝子を有する遺伝子導入マウス (Frazer, K. A. et al., Nat. Genet. 1995, 9: 424-431) を以下に記載される研究において利用した。上述のように、体外で統計的に有意なアポ (a) mRNA の阻害を示した ISIS アンチセンスオリゴヌクレオチドを、このモデルにおいてさらに評価した。

【0369】

研究1

雌のヒトアポ (a) 遺伝子導入マウスを12時間の明/暗サイクルで維持し、通常の実験食餌を自由に摂取させた。マウスをそれぞれ4匹のマウスからなる処置群に分けた。本群は、2週間の間、1週間に2回、25mg/kg の用量で、ISIS 494159、ISIS 494160、ISIS 494161、ISIS 494162、ISIS 494163、ISIS 494230、ISIS 494243、ISIS 494244、ISIS 494283、ISIS 494284、ISIS 494285、ISIS 494286、ISIS 494301、ISIS 494302、ISIS 494304、ISIS 494466、ISIS 494470、ISIS 494472、ISIS 498239、ISIS 498408、ISIS 498517、ISIS 494158、ISIS 494311、ISIS 494337、ISIS 494372、ISIS 498238、ISIS 498523、ISIS 498525、ISIS 510548、ISIS 512944、ISIS 512947

40

50

、またはISIS 512958の腹腔内注射を受けた。マウスの1群は、2週間の間、1週間に2回、PBSの腹腔内注射を受けた。PBS群を対照群とした。最終用量の2日後、マウスを安楽死させ、臓器を採取し、分析が行われた。

【0370】

ヒトアポ(a) mRNAの阻害

全RNAを治療群のいくつかの肝臓から抽出し、RT-PCRによってヒトアポ(a) mRNAを定量化した。結果は表35に提示され、PBS対照と比較したアポ(a) mRNAの阻害パーセントとして表される。

【表35】

遺伝子導入マウスにおけるヒトアポ(a) mRNAの阻害パーセント

ISIS 番号	阻害%
144367	98
494159	100
494160	95
494161	98
494162	100
494163	100
494230	96
494243	99
494244	99
494283	100
494284	100
494285	100
494286	98
494301	99
494302	96
494304	94
494466	97
494470	93
494472	98
498239	72
498408	100
498517	98

【0371】

データは、いくつかのISISオリゴヌクレオチドによるアポ(a) mRNAの有意な阻害を示す。ISIS 494159 (配列番号14)、ISIS 494162 (配列番号17)、ISIS 494163 (配列番号18)、ISIS 494243 (配列番号106)、ISIS 494244 (配列番号107)、ISIS 494283 (配列番号26)、ISIS 494284 (配列番号27)、ISIS 494285 (配列番号28)、ISIS 494301 (配列番号39)、およびISIS 498408 (配列番号71)は、ベンチマークISIS 144367 (配列番号11)より強力であった。

【0372】

ヒトアポ(a) タンパク質の阻害

アポ(a) ELISAキット(Mercodia 10-1106-01, Uppsala, Sweden)を使用して、全治療群からの血漿ヒトアポ(a) タンパク質を測定した。結果は表36に提示され、PBS対照と比較したアポ(a) mRNAの阻害パーセ

ントとして表される。

【表 3 6】

遺伝子導入マウスにおけるヒトアポ（a）タンパク質の阻害パーセント

ISIS 番号	阻害%
144367	86
494159	86
494160	0
494161	82
494162	84
494163	82
494230	60
494243	84
494244	87
494283	98
494284	98
494285	89
494286	89
494301	93
494302	88
494304	83
494466	76
494470	73
494472	72
498239	54
498408	84
498517	56
494158	71
494311	83
494337	80
494372	78
498238	58
498523	47
498525	58
510548	74
512944	18
512947	65
512958	72

10

20

30

40

【0 3 7 3】

データは、いくつかのISISオリゴヌクレオチドによるアポ（a）mRNAの有意な阻害を示す。ISIS 494159（配列番号14）、ISIS 494244（配列番号82）、ISIS 494283（配列番号26）、ISIS 494284（配列番号27）、ISIS 494285（配列番号28）、ISIS 494286（配列番号29）、ISIS 494301（配列番号39）、およびISIS 494302（配列番号40）は、ベンチマークISIS 144367（配列番号11）と同じくらい、またはそれ以上強力であった。

【0 3 7 4】

研究 2

50

ISIS 494159、ISIS 494161、ISIS 494162、ISIS 494163、およびISIS 494243を、この遺伝子導入モデルにおいてさらに評価した。比較のために、ISIS 144367が含まれた。

【0375】

処置

雌のヒトアポ（a）遺伝子導入マウスをそれぞれ4匹のマウスからなる処置群に分けた。本群は、2週間の間、1週間に2回、1.5mg/kg、5mg/kg、15mg/kg、または50mg/kgの用量で、ISIS 144367、ISIS 494159、ISIS 494161、ISIS 494162、ISIS 494163、またはISIS 494243の腹腔内注射を受けた。マウスの1群は、2週間の間、1週間に2回、PBSの腹腔内注射を受けた。PBS群を対照群とした。最終用量の2日後、マウスを安楽死させ、臓器を採取し、分析が行われた。

10

【0376】

ヒトアポ（a）mRNAの阻害

全RNAを治療群の肝臓から抽出し、RT-PCRによってヒトアポ（a）mRNAを定量化した。結果は表37に提示され、PBS対照と比較したアポ（a）mRNAの阻害パーセントとして表される。

【表 3 7】

遺伝子導入マウスにおけるヒトアポ (a) mRNA の用量依存阻害

ISIS 番号	用量 (mg/kg/週)	阻害%	ED ₅₀
144367	100	71	31
	30	42	
	10	0	
	3	5	
494159	100	91	5
	30	67	
	10	48	
	3	39	
494161	100	82	6
	30	49	
	10	61	
	3	30	
494162	100	90	5
	30	67	
	10	58	
	3	25	
494163	100	83	5
	30	66	
	10	58	
	3	21	
494243	100	80	32
	30	26	
	10	0	
	3	6	

【0 3 7 7】

データは、いくつかの ISIS オリゴヌクレオチドによるアポ (a) mRNA の有意な阻害を示す。ISIS 494159 (配列番号 14)、ISIS 494161 (配列番号 16)、494162 (配列番号 17)、および ISIS 94163 (配列番号 18) は、ベンチマーク ISIS 144367 (配列番号 11) より有効であった。

【0 3 7 8】

ヒトアポ (a) タンパク質レベルの低下

処置群から血液を採取し、アポ (a) ELISA キット (Merckodia 10-1106-01, Uppsala, Sweden) でヒトアポ (a) タンパク質レベルを定量化した。結果は表 38 に提示され、PBS 対照と比較したアポ (a) タンパク質レベルの低下パーセントとして表される。

【表 3 8】

遺伝子導入マウスにおけるヒトアポ（a）タンパク質の用量依存阻害

ISIS 番号	用量 (mg/kg/週)	阻害%	ED ₅₀
144367	100	73	71
	30	0	
	10	6	
	3	69	
494159	100	88	2
	30	88	
	10	85	
	3	36	
494161	100	90	2
	30	85	
	10	73	
	3	44	
494162	100	89	3
	30	78	
	10	76	
	3	24	
494163	100	90	3
	30	86	
	10	60	
	3	37	
494243	100	61	174
	30	0	
	10	0	
	3	0	

【0379】

データは、いくつかのISISオリゴヌクレオチドによるアポ（a）血漿タンパク質レベルの有意な低下を示す。ISIS 494159（配列番号14）、ISIS 494161（配列番号16）、ISIS 494162（配列番号17）、およびISIS 494163（配列番号18）は、ベンチマークISIS 144367（配列番号11）より有効であった。

【0380】

研究3

ISIS 494244、ISIS 494283、およびISIS 494284を、このモデルにおいてさらに評価した。比較のために、ISIS 144367が含まれた。

【0381】

処置

雌のヒトアポ（a）遺伝子導入マウスをそれぞれ4匹のマウスからなる処置群に分けた。本群は、2週間の間、1週間に2回、0.75mg/kg、2.5mg/kg、7.5mg/kg、または25mg/kgの用量で、ISIS 144367、ISIS 49

10

20

30

40

50

4244、ISIS 494283、またはISIS 494284の腹腔内注射を受けた。マウスの1群は、2週間の間、1週間に2回、PBSの腹腔内注射を受けた。PBS群を対照群とした。最終用量の2日後、マウスを安楽死させ、臓器を採取し、分析が行われた。

【0382】

ヒトアポ(a) mRNAの阻害

全RNAを治療群の肝臓から抽出し、RT-PCRによってヒトアポ(a) mRNAを定量化した。結果は表39に提示され、PBS対照と比較したアポ(a) mRNAの阻害パーセントとして表される。

【表39】

遺伝子導入マウスにおけるヒトアポ(a) mRNAの用量依存阻害

ISIS 番号	用量 (mg/kg/週)	阻害%	ED ₅₀
144367	50	75	22
	15	60	
	5	0	
	1.5	0	
494244	50	73	18
	15	41	
	5	34	
	1.5	0	
494283	50	74	16
	15	52	
	5	24	
	1.5	0	
494284	50	73	16
	15	58	
	5	17	
	1.5	2	

【0383】

データは、いくつかのISISオリゴヌクレオチドによるアポ(a) mRNAの有意な阻害を示す。ISIS 494244 (配列番号107)、ISIS 494283 (配列番号26)、およびISIS 494284 (配列番号27)は、ベンチマークISIS 144367 (配列番号11)より有効であった。

【0384】

ヒトアポ(a) タンパク質レベルの低下

処置群から血液を採取し、アポ(a) ELISAキット(Mercodia 10-1106-01, Uppsala, Sweden)でヒトアポ(a) タンパク質レベルを定量化した。結果は表40に提示され、PBS対照と比較したアポ(a) タンパク質レベルの低下パーセントとして表される。

【表 40】

遺伝子導入マウスにおけるヒトアポ (a) 血漿タンパク質の用量依存阻害

ISIS 番号	用量 (mg/kg/週)	阻害%	ED ₅₀
144367	50	64	16
	15	14	
	5	0	
	1.5	0	
494244	50	67	2
	15	60	
	5	58	
	1.5	0	
494283	50	64	4
	15	65	
	5	64	
	1.5	69	
494284	50	66	4
	15	63	
	5	51	
	1.5	54	

10

20

【0385】

データは、いくつかの ISIS オリゴヌクレオチドによるアポ (a) 血漿タンパク質レベルの有意な低下を示す。ISIS 494244 (配列番号 107)、ISIS 494283 (配列番号 26)、および ISIS 494284 (配列番号 27) は、ベンチマーク ISIS 144367 (配列番号 11) より有効であった。

【0386】

研究 4

ISIS 494285、ISIS 494286、ISIS 494301、ISIS 494302、および ISIS 494311 を、このモデルにおいてさらに評価した。

30

【0387】

処置

雄のヒトアポ (a) 遺伝子導入マウスをそれぞれ 4 匹のマウスからなる処置群に分けた。そのような各群は、2 週間の間、1 週間に 1 回、5 mg/kg、15 mg/kg、または 50 mg/kg の用量で、ISIS 494285、ISIS 494286、ISIS 494301、ISIS 494302、または ISIS 494311 の腹腔内注射を受けた。3 匹のマウスの 1 群は、2 週間の間、1 週間に 1 回、PBS の腹腔内注射を受けた。PBS 群を対照群とした。最終用量の 2 日後、マウスを安楽死させ、臓器を採取し、分析が行われた。

40

【0388】

ヒトアポ (a) mRNA の阻害

全 RNA を治療群の肝臓から抽出し、RT-PCR によってヒトアポ (a) mRNA を定量化した。結果は表 41 に提示され、PBS 対照と比較したアポ (a) mRNA の阻害パーセントとして表される。データは、ISIS 494285 (配列番号 28)、ISIS 494286 (配列番号 29)、ISIS 494301 (配列番号 39)、ISIS 494302 (配列番号 40)、および ISIS 494311 (配列番号 47) によるアポ (a) mRNA の有意な阻害を示す。

【表 4 1】

遺伝子導入マウスにおけるヒトアポ (a) mRNAの用量依存阻害

ISIS 番号	用量 (mg/kg/週)	阻害%	ED ₅₀
494285	50	98	1
	15	97	
	5	79	
494286	50	97	1
	15	91	
	5	80	
494301	50	98	3
	15	96	
	5	59	
494302	50	98	2
	15	88	
	5	72	
494311	50	99	1
	15	96	
	5	87	

10

【0389】

20

ヒトアポ (a) タンパク質レベルの低下

処置群から血液を採取し、アポ (a) ELISAキット (Merckodia 10-1106-01, Uppsala, Sweden) でヒトアポ (a) タンパク質レベルを定量化した。結果は表 4 2 に提示され、PBS 対照と比較したアポ (a) タンパク質レベルの低下パーセントとして表される。データは、ISIS 494285、ISIS 494286、ISIS 494301、ISIS 494302、および ISIS 494311 によるアポ (a) 血漿タンパク質レベルの有意な低下を示す。

【表 4 2】

遺伝子導入マウスにおけるヒトアポ (a) タンパク質の用量依存阻害

30

ISIS 番号	用量 (mg/kg/週)	阻害%	ED ₅₀
494285	50	88	2
	15	88	
	5	72	
494286	50	90	2
	15	85	
	5	75	
494301	50	89	5
	15	86	
	5	38	
494302	50	90	3
	15	82	
	5	61	
494311	50	90	3
	15	82	
	5	69	

40

【0390】

研究 5

ISIS 494372、ISIS 498524、ISIS 498581、ISI 50

S 498721、およびISIS 498833を、このモデルにおいてさらに評価した。

【0391】

処置

雌のヒトアポ（a）遺伝子導入マウスをそれぞれ4匹のマウスからなる処置群に分けた。本群は、2週間の間、1週間に1回、5mg/kg、15mg/kg、または50mg/kgの用量で、ISIS 494372、ISIS 498524、ISIS 498581、ISIS 498721、またはISIS 498833の腹腔内注射を受けた。3匹のマウスの1群は、2週間の間、1週間に1回、PBSの腹腔内注射を受けた。PBS群を対照群とした。最終用量の2日後、マウスを安楽死させ、臓器を採取し、分析が行われた。

10

【0392】

ヒトアポ（a）mRNAの阻害

全RNAを治療群の肝臓から抽出し、RT-PCRによってヒトアポ（a）mRNAを定量化した。結果は表43に提示され、PBS対照と比較したアポ（a）mRNAの阻害パーセントとして表される。データは、ISIS 494372（配列番号28）、ISIS 498524（配列番号93）、ISIS 498581（配列番号104）、およびISIS 498721（ATGCCCTCGATAACTCCGTCC；配列番号134）によるアポ（a）mRNAの有意な阻害を示す。

20

【表43】

遺伝子導入マウスにおけるヒトアポ（a）mRNAの用量依存阻害

ISIS 番号	用量 (mg/kg/週)	阻害%	ED ₅₀
494372	50	88	18
	15	49	
	5	0	
498524	50	83	8
	15	74	
	5	34	
498581	50	98	7
	15	58	
	5	48	
498721	50	97	14
	15	68	
	5	0	
498833	50	61	155
	15	0	
	5	17	

30

40

【0393】

ヒトアポ（a）タンパク質レベルの低下

処置群から血液を採取し、アポ（a）ELISAキット（Mercodia 10-1106-01, Uppsala, Sweden）でヒトアポ（a）タンパク質レベルを定量化した。結果は表44に提示され、PBS対照と比較したアポ（a）タンパク質レベルの低下パーセントとして表される。データは、ISIS 494372（配列番号28）、ISIS 498581（配列番号104）、およびISIS 498721（ATGCCCTCGATAACTCCGTCC；配列番号134）によるアポ（a）血漿タンパク

50

質レベルの有意な低下を示す。

【表 4 4】

遺伝子導入マウスにおけるヒトアポ（a）タンパク質の用量依存阻害

ISIS 番号	用量 (mg/kg/週)	阻害%	ED ₅₀
494372	50	68	32
	15	25	
	5	12	
498524	50	38	118
	15	0	
	5	0	
498581	50	79	9
	15	52	
	5	49	
498721	50	81	10
	15	63	
	5	29	
498833	50	15	738
	15	0	
	5	67	

10

20

【実施例 8】

【0394】

ゲッ歯類モデルにおけるヒトアポ（a）を標的指向するアンチセンスオリゴヌクレオチドの忍容性

ヒトアポ（a）を標的指向するギャップマーアンチセンスオリゴヌクレオチドは、CD1 マウスおよびスプラーグドローリーラットにおける忍容性研究のために、上述の研究から選択された。ゲッ歯類は内因性アポ（a）を発現せず、よって、これらの研究は、動物におけるアポ（a）を阻害することによって起こり得る任意の表現型の変化ではなく、動物における各ヒトアンチセンスオリゴヌクレオチドの忍容性を試験した。

30

【0395】

CD1 マウスにおける忍容性：研究 1

CD1（登録商標）マウス（Charles River, MA）は、多目的マウスモデルであり、安全性および有効性試験に頻繁に利用される。マウスを上述の研究から選択した ISIS アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、様々な血漿化学マーカーのレベルの変化について評価した。

【0396】

処置

雄の CD1 マウスの群は、6 週間の間、1 週間に 2 回、50 mg/kg の ISIS 494159、ISIS 494161、ISIS 494162、ISIS 494244、ISIS 494283、ISIS 494284、ISIS 494285、ISIS 494286、ISIS 494301、ISIS 494302、ISIS 494311、ISIS 494337、ISIS 494372、および ISIS 510548 を皮下注射された。6 週齢の雄の CD1 マウスの 1 群は、6 週間の間、1 週間に 2 回、PBS を皮下注射された。最終用量の 48 時間後、マウスを安楽死させ、さらなる分析のために臓器および血漿を採取した。

40

【0397】

血漿化学マーカー

肝臓および腎臓の機能に対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析器（Hitachi Olympus AU400e, Melville

50

e, NY) を使用して、トランスアミナーゼ、ビリルビン、アルブミン、クレアチニン、および BUN の血漿レベルを測定した。結果を表 4 5 に提示する。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想範囲外の肝臓または腎臓の機能マーカーのいずれかのレベルにおいて変化を引き起こした ISIS オリゴヌクレオチドは、さらなる研究において除外された。

【表 4 5】

CD 1 マウスの血漿化学マーカー

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	アルブ ミン (g/dL)	BUN (mg/dL)	クレア チニン (mg/dL)	ビリル ビン (mg/dL)
PBS	38	71	2.9	25.2	0.16	0.15
ISIS 494159	615	525	2.7	23.9	0.11	0.20
ISIS 494161	961	670	2.6	23.7	0.15	0.14
ISIS 494162	1373	1213	2.7	23.7	0.14	0.18
ISIS 494283	237	242	2.5	26.2	0.14	0.13
ISIS 494284	192	307	2.3	27.1	0.14	0.10
ISIS 494285	582	436	2.3	25.4	0.16	0.11
ISIS 494286	191	227	2.5	21.1	0.12	0.15
ISIS 494301	119	130	2.7	26.4	0.15	0.12
ISIS 494302	74	96	2.8	24.8	0.14	0.15
ISIS 494311	817	799	2.7	28.7	0.12	0.17
ISIS 494337	722	397	2.5	20.0	0.13	0.11
ISIS 494372	73	164	2.6	28.5	0.16	0.11
ISIS 510548	2819	2245	3.1	26.0	0.15	0.15

【0398】

臓器重量

肝臓、脾臓、および腎臓の重量を、研究の終了時に測定し、表 4 6 に提示する。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想範囲外の臓器重量において任意の変化を引き起こした ISIS オリゴヌクレオチドは、さらなる研究から除外された。

【表 4 6】

CD 1 マウスの臓器重量 (g)

	腎臓	肝臓	脾臓
PBS	0.68	2.0	0.13
ISIS 494159	0.68	3.0	0.21
ISIS 494161	0.62	3.5	0.20
ISIS 494162	0.60	3.3	0.20
ISIS 494283	0.65	2.8	0.24
ISIS 494284	0.69	2.7	0.29
ISIS 494285	0.59	3.2	0.21
ISIS 494286	0.64	2.8	0.25
ISIS 494301	0.72	3.0	0.43
ISIS 494302	0.63	2.3	0.23
ISIS 494311	0.61	3.2	0.19
ISIS 494337	0.56	2.3	0.17
ISIS 494372	0.60	2.5	0.27
ISIS 510548	0.55	3.7	0.20

10

20

【0399】

スプラグドローラットにおける忍容性

スプラグドローラットは、安全性および有効性評価に使用される多目的モデルである。ラットを上述の研究から選択したISISアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、様々な血漿化学マーカーのレベルの変化について評価した。

【0400】

処置

雄のスプラグドローラットの群は、8週間の間、1週間に2回、30mg/kgのISIS 494159、ISIS 494161、ISIS 494162、ISIS 494244、ISIS 494283、ISIS 494284、ISIS 494285、ISIS 494286、ISIS 494301、ISIS 494302、ISIS 494311、ISIS 494337、ISIS 494372、およびISIS 510548を皮下注射された。6匹の雄のスプラグドローラットの1群は、8週間の間、1週間に2回、PBSを皮下注射された。最終用量の48時間後、マウスを安楽死させ、さらなる分析のために臓器および血漿を採取した。

30

【0401】

血漿化学マーカー

肝臓および腎臓の機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、自動臨床化学分析器(Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY)を使用して、トランスアミナーゼ、ビリルビン、アルブミン、クレアチニン、およびBUNの血漿レベルを測定した。結果を表47に提示する。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想範囲外の肝臓または腎臓の機能マーカーのいずれかのレベルにおいて変化を引き起こしたISISオリゴヌクレオチドは、さらなる研究において除外された。

40

【表 4 7】

スプラッグドローリーラットの血漿化学マーカー

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ビリルビン (mg/dL)	アルブミ ン(mg/dL)	BUN (mg/dL)	クレアチ ニン (mg/dL)
PBS	30	82	0.09	3.2	19	0.28
ISIS 494159	182	208	0.14	3.4	22	0.35
ISIS 494161	36	86	0.13	3.4	23	0.35
ISIS 494162	102	158	0.17	2.6	28	0.32
ISIS 494283	53	156	0.13	2.9	24	0.32
ISIS 494284	34	113	0.08	2.0	28	0.32
ISIS 494285	110	294	0.10	1.4	110	0.52
ISIS 494286	40	83	0.07	1.6	48	0.44
ISIS 494301	38	132	0.08	3.0	18	0.33
ISIS 494302	47	105	0.09	3.2	19	0.34
ISIS 494311	93	185	0.51	2.7	23	0.30
ISIS 494372	54	119	0.12	3.0	19	0.33
ISIS 510548	116	181	0.11	1.7	65	0.66

【 0 4 0 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、自動臨床化学分析器（Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY）を使用して、総タンパク質量およびクレアチニンの尿レベルを測定した。結果は表48に提示され、mg/dLで表される。

【表 4 8】

スプラッグドローリーラットにおける腎臓機能マーカー（mg/dL）

	クレア チニン	総タン パク質 量
PBS	103	118
ISIS 494159	70	279
ISIS 494161	105	315
ISIS 494162	58	925
ISIS 494283	114	1091
ISIS 494284	97	2519
ISIS 494285	38	2170
ISIS 494286	51	625
ISIS 494301	62	280
ISIS 494302	101	428
ISIS 494311	48	1160
ISIS 494372	46	154
ISIS 510548	55	2119

【0403】

臓器重量

肝臓、脾臓、および腎臓重量を、研究の終了時に測定し、表49に提示する。アンチセンスオリゴヌクレオチドの予想範囲外の臓器重量において任意の変化を引き起こしたISISオリゴヌクレオチドは、さらなる研究から除外された。

【表49】

スプラッグドローリーラットの臓器重量 (g)

	腎臓	肝臓	脾臓
PBS	3.5	13.1	0.9
ISIS 494159	3.1	11.7	1.6
ISIS 494161	2.8	12.5	2
ISIS 494162	3.1	14.2	1.6
ISIS 494283	3.3	12.9	2.3
ISIS 494284	4.1	15.8	2.7
ISIS 494285	3.8	13.4	0.8
ISIS 494286	4.2	16.7	2.5
ISIS 494301	3.2	12.1	2.3
ISIS 494302	3.4	13.3	2.4
ISIS 494311	3.5	17.4	3.2
ISIS 494372	3.6	12.9	3.2
ISIS 510548	6.4	21.2	1.5

10

20

【0404】

ゲッ歯類の忍容性研究による所見は、一般に、スクリーニングされた忍容性マーカー全てを考慮し、ISIS 494372がCD1マウスモデルおよびスプラッグドローリーラットモデルの両方において、最良の忍容性を示したアンチセンス化合物であったことを示した。

30

【実施例9】

【0405】

CD1マウスにおけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの薬物動態

CD1マウスをISISオリゴヌクレオチドで処置し、肝臓および腎臓のオリゴヌクレオチド濃度を評価した。

【0406】

処置

40

1群に4匹のCD1マウスの群は、6週間の間、1週間に2回、50mg/kgのISIS 494283、ISIS 494284、ISIS 494286、ISIS 494301、ISIS 494302、またはISIS 494372を皮下注射された。マウスを最終用量2日後に屠殺した。肝臓を分析のために採取した。

【0407】

オリゴヌクレオチド濃度の測定

総オリゴヌクレオチド濃度の濃度を測定した。使用された方法は、以前に公開された方法の改良であり (Leeds et al., 1996, Geary et al., 1999)、これはフェノールクロロホルム (液体-液体) 抽出、続いて固相抽出からなる。抽出前に、内標準 (ISIS 355868、27-mer 2'-O-メトキシエ

50

チル修飾ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、配列番号131として本明細書に示されるGCGTTTGCTCTTCTTCTTGC GTTTT)を付加した。校正曲線を使用して組織サンプル濃度を計算し、定量の下限(LLOQ)は約1.14 $\mu\text{g/g}$ であった。次に、WinNonlinソフトウェア(PHARSIGHT)を使用して、半減期を計算した。

【0408】

結果は表50に提示され、 $\mu\text{g/g}$ 肝臓または腎臓組織として表される。データは、ISIS 494372が肝臓および腎臓において許容される濃度であったことを示す。

【表50】

CD1マウスにおけるISIS オリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド濃度 ($\mu\text{g/g}$ 組織)

ISIS 番号	肝臓	腎臓
494283	581	549
494284	511	678
494286	368	445
494301	812	347
494302	617	263
494372	875	516

10

20

【実施例10】

【0409】

スプラグドローラットにおけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの薬物動態

雄のスプラグドローラットをISISオリゴヌクレオチドで処置し、肝臓および腎臓におけるオリゴヌクレオチド濃度を評価した。

【0410】

処置

1群に4匹のラットの群は、3週間の間、1週間に2回、10mg/kgのISIS 494283、ISIS 494284、ISIS 494286、ISIS 494301、ISIS 494302、またはISIS 494372を皮下注射された。ラットを最終用量2日後に屠殺した。肝臓を分析のために採取した。

30

【0411】

オリゴヌクレオチド濃度の測定

総オリゴヌクレオチド濃度の濃度を測定した。使用された方法は、以前に公開された方法の改良であり(Leeds et al., 1996、Geary et al., 1999)、これはフェノールクロロホルム(液体-液体)抽出、続いて固相抽出からなる。抽出前に、内標準(ISIS 355868、27-mer 2'-O-メトキシエチル修飾ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド、配列番号131として本明細書に示されるGCGTTTGCTCTTCTTCTTGC GTTTT)を付加した。校正曲線を使用して組織サンプル濃度を計算し、定量の下限(LLOQ)は約1.14 $\mu\text{g/g}$ であった。次に、WinNonlinソフトウェア(PHARSIGHT)を使用して、半減期を計算した。

40

【0412】

結果は表51に提示され、 $\mu\text{g/g}$ 肝臓または腎臓組織として表される。データは、ISIS 494372が肝臓および腎臓において許容される濃度であったことを示す。

【表 5 1】

スプラッグドローリーラットにおける I S I S オリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド濃度 ($\mu\text{g}/\text{g}$ 組織)

ISIS 番号	肝臓	腎臓
494283	220	434
494284	178	573
494286	234	448
494301	279	540
494302	205	387
494372	288	663

10

【実施例 1 1】

【0 4 1 3】

カニクイザルにおけるヒトアポ (a) を標的指向する I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果

カニクイザルを上述の研究から選択した I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置した。この研究を始めたとき、カニクイザルのゲノム配列は国立生物工学情報センター (NCBI) データベースで利用可能ではなかったため、カニクイザル遺伝子配列との交差反応性は確認できなかった。代わりに、カニクイザルにおいて使用された I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列を、相同性に関してアカゲザル配列と比較した。アカゲザル配列に相同性を有する I S I S オリゴヌクレオチドは、カニクイザル配列とも完全に交差反応性であると予想される。

20

【0 4 1 4】

試験されたヒトアンチセンスオリゴヌクレオチドは、アカゲザルの mRNA 配列 (XM_001098061.1; 配列番号 132 と本明細書において示される) 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との間の相補性が大きければ大きいほど、ヒトオリゴヌクレオチドがアカゲザル配列と交差反応することができる可能性が大きい。配列番号 132 に対する各オリゴヌクレオチドの開始および停止部位は表 5 2 に提示される。各アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号 132 の 2 つ以上の領域を標的指向し、複数の開始部位を有する。「開始部位」は、ギャップマーがアカゲザル配列において標的指向される最も 5' 側のヌクレオチドを示す。「ミスマッチ」は、ヒトオリゴヌクレオチド配列とアカゲザル配列との間のミスマッチしたヌクレオチドの数を示す。

30

【0 4 1 5】

肝臓および腎臓におけるアンチセンスオリゴヌクレオチド忍容性ならびにそれらの薬物動態プロファイルが評価された。

【表 5 2】

配列番号 1 3 2 に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド

ISIS 番号	開始部位	ミスマッチ
494283	278	2
	620	2
	923	2
	1265	2
	1607	1
	1949	1
	2267	1
	2609	1
	2951	1
	3293	1
494284	279	1
	621	1
	924	1
	1266	1
	1608	1
	1950	1
	2268	1
	2610	1
	2952	1
	3294	1
494286	281	1
	623	1
	926	1
	1268	1
	1610	2
	1952	2
	2270	2
	2612	2
	2954	2
	3296	2
494301	322	2
	664	2
	967	2
	1309	1
	1651	2
494302	323	2
	968	2
	1310	1
	1652	2
494372	1186	2
	1870	1
	2188	1

10

20

30

40

処置

研究前に、少なくとも30日間の間、サルを隔離し、その間、一般健康状態についてこれらの動物を毎日観察した。サルは2～4歳であり、体重は2～4kgであった。無作為に割り付けられた1群に4匹の雄のカニクイザルの7つの群は、適切な大きさのステンレススチール製の投薬針およびシリンジを使用して、サルの背面の4つの部位のうちの1つにISISオリゴヌクレオチドまたはPBSを皮下注射された。注射は1投薬につき1部位で、時計回りに与えられた。サルは、最初の週に関しては、負荷用量として1週間に4回（1、3、5、および7日目）、そしてその後、2～12週目の間、1週間に1回、40mg/kgのISIS 494283、ISIS 494284、ISIS 494286、ISIS 494301、ISIS 494302、またはISIS 494372を皮下投薬された。8匹のカニクイザルの対照群は、最初の週に関しては、1週間に3×4回（1、3、5、および7日目）、そしてその後、2～12週目の間、1週間に1回PBSを皮下注射された。

10

【0417】

研究期間中、少なくとも1日1回、病気または苦痛の兆候についてサルを観察した。処置、損傷、もしくは病気により瞬時に上回るまたはわずかの痛みもしくは苦痛を経験した任意の動物は、研究責任者と相談した後、痛みを軽減するために、承認された鎮痛薬または薬剤で獣医職員によって処置された。健康が不良なまたは危篤状態の可能性のある任意の動物は、さらなる監視および安楽死の可能性について特定された。例えば、ISIS 494302の処置群の1匹の動物は、56日目に危篤状態であることが分かり、安楽死させた。動物の計画的安楽死は、深麻酔下、失血により86日目と87日目に行われた。実施例に記載されるプロトコルは、施設内動物実験委員会（IACUC）によって承認された。

20

【0418】

標的の低下

RNA分析

86日目に、ヒトプライマープローブセットABI Hs00916691_m1（Applied Biosystems, Carlsbad CA）を使用するアポ（a）のリアルタイムPCR分析のためにRNAを肝臓組織から抽出した。結果は、PBS対照に対するアポ（a）mRNAの阻害パーセントとして提示される。表53に示されるように、ISISアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置は、PBS対照と比較して、アポ（a）mRNAの有意な低下をもたらした。

30

【0419】

プラスミノーゲン、別のクリングル含有タンパク質のmRNAレベルも測定した。ISIS 494372による処置は、プラスミノーゲンのmRNAレベルを変更しなかった。

【表53】

PBS対照に対するカニクイザルの肝臓におけるアポ（a）mRNAの阻害パーセント

ISIS 番号	阻害%
494283	91
494284	99
494286	96
494301	88
494302	89
494372	93

40

【0420】

タンパク質分析

異なる日に、全ての研究ザルの橈側皮静脈、伏在静脈、または大腿静脈から1mLの血液を採取した。血液サンプルを、血漿分離のためにK2-EDTAを含有する管に入れた

50

。管を3, 000 rpmで10分間、室温で遠心分離して血漿を得た。アポ(a) ELISAキット(Merckodia 10-1106-01, Uppsala, Sweden)によりアポ(a)タンパク質レベルを分析した。結果は、ベースラインからのレベルのパーセンテージ変化として表される。表54に示されるように、いくつかのISISアンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置は、PBS対照と比較して、アポ(a)タンパク質レベルの有意な低下をもたらした。具体的には、ISIS 494372による処置は、アポ(a)のカニクイザル血漿タンパク質レベルを低下させた。

【0421】

アポBのタンパク質レベルも本研究群において測定された。アポ(a)のアンチセンス阻害は、アポBレベルに影響がなかった。

【表54】

カニクイザルにおけるアポ(a)血漿タンパク質レベル(ベースライン値に対する阻害%)

	16日目	30日目	44日目	56日目	72日目	86日目
PBS	0	0	10	0	0	0
ISIS 494283	78	79	81	66	66	70
ISIS 494284	92	95	95	93	93	94
ISIS 494286	92	95	96	94	94	94
ISIS 494301	41	45	52	20	17	29
ISIS 494302	17	0	2	0	0	20
ISIS 494372	67	80	83	79	78	81

【0422】

忍容性研究

体重および臓器重量測定

動物の全体的な健康状態に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、体重および臓器重量を86日目に測定した。体重を測定し、表55に提示する。臓器重量を測定し、データを表56に提示する。結果は、ISIS 494372による処置がサルの体重および臓器重量に関して良好に忍容されたことを示す。

【表55】

カニクイザルにおける体重(g)

	14日目	35日目	49日目	56日目	70日目	84日目
PBS	2637	2691	2748	2733	2739	2779
ISIS 494283	2591	2670	2698	2656	2704	2701
ISIS 494284	2559	2661	2676	2675	2662	2646
ISIS 494286	2693	2770	2838	2800	2796	2816
ISIS 494301	2587	2604	2627	2591	2596	2604
ISIS 494302	2759	2760	2839	2825	3113	3122
ISIS 494372	2719	2877	2985	2997	3037	3036

【表56】

カニクイザルにおける臓器重量(体重%)

	脾臓	腎臓	肝臓	心臓	肺
PBS	0.14	0.38	2.2	0.33	0.51
ISIS 494283	0.24	0.95	2.8	0.33	0.49
ISIS 494284	0.19	0.60	2.6	0.36	0.55
ISIS 494286	0.22	0.63	2.7	0.38	0.55
ISIS 494301	0.38	0.81	3.0	0.36	0.61
ISIS 494302	0.17	0.95	2.5	0.39	0.57
ISIS 494372	0.18	1.16	2.6	0.36	0.56

【0423】

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、血液採取前にサルを一晩絶食させた。約1.5mLの血液を各動物から採取し、血清分離のために抗凝固剤なしの管に入れた。管を最低90分間室温に保ち、その後、3,000rpmで10分間、室温で遠心分離して血清を得た。Toshiba 200FR NEO化学分析器（Toshiba Co., Japan）を使用して様々な肝臓機能マーカーのレベルを測定した。ALTおよびASTの血漿レベルを測定し、結果は表57に提示され、IU/Lで表される。同様に肝臓機能マーカーであるビリルビン（mg/dL）を測定し、表57に提示し、mg/dLで表す。結果は、ISIS 494372による処置がサルの肝臓機能に関して良好に忍容されたことを示す。

10

【表57】

カニクイザルの血漿における肝臓機能マーカー

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ビリル ビン (mg/dL)
PBS	33	43	0.20
ISIS 494283	75	73	0.12
ISIS 494284	115	79	0.17
ISIS 494286	67	73	0.13
ISIS 494301	129	90	0.15
ISIS 494302	141	75	0.15
ISIS 494372	46	75	0.17

20

【0424】

C反応性タンパク質レベル分析

カニクイザルにおけるISISオリゴヌクレオチドの任意の炎症性作用を評価するために、血液サンプルを分析用に採取した。血液採取前にサルを一晩絶食させた。約1.5mLの血液を各動物から採取し、血清分離のために抗凝固剤なしの管に入れた。管を最低90分間室温に保ち、その後、3,000rpmで10分間、室温で遠心分離して血清を得た。肝臓において合成され、炎症のマーカーとして機能するC反応性タンパク質（CRP）を、Toshiba 200FR NEO化学分析器（Toshiba Co., Japan）を使用して測定した。結果は、ISIS 494372による処置がサルにおいていずれの炎症も引き起こさなかったことを示す。

30

【表58】

カニクイザルの血漿におけるC反応性タンパク質レベル（mg/L）

	CRP
PBS	1.4
ISIS 494283	14.7
ISIS 494284	7.7
ISIS 494286	4.4
ISIS 494301	3.5
ISIS 494302	2.4
ISIS 494372	10.2

40

【0425】

補体C3分析

カニクイザルにおける補体経路に対するISISオリゴヌクレオチドの任意の効果を評価するために、84日目（投薬前）、および85日目（投薬24時間後）に血液サンプルを分析用に採取した。約0.5mLの血液を各動物から採取し、血清分離のために抗凝固

50

剤なしの管に入れた。管を最低90分間室温に保ち、その後、3,000rpmで10分間、室温で遠心分離して血清を得た。Toshiba 200FR NEO化学分析器（Toshiba Co., Japan）を使用してC3を測定した。結果は、ISIS 494372による処置がサルにおいて補体経路に対していずれの効果も引き起こさなかったことを示す。

【表59】

カニクイザルの血漿における補体C3レベル (mg/dL)

	投薬前	投薬後
PBS	140	139
ISIS 494283	127	101
ISIS 494284	105	75
ISIS 494286	84	38
ISIS 494301	118	76
ISIS 494302	98	58
ISIS 494372	123	109

10

【0426】

血液学

血液学的パラメータに対するカニクイザルにおけるISISオリゴヌクレオチドの任意の効果の評価するために、87日目に利用可能な研究動物のそれぞれから約0.5mLの血液の血液サンプルを、K₂-EDTAを含有する管に採取した。ADVIA 120血液分析器（Bayer, USA）を使用して、赤血球（RBC）数、白血球（WBC）数、ならびに血小板数に関してサンプルを分析した。データを表60に提示する。

20

【0427】

結果は、ISIS 494372による処置がサルの血液学的パラメータに関して良好に忍容されたことを示す。

【表60】

カニクイザルにおける血液細胞数

	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	血小板 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
PBS	15	6.3	329
ISIS 494283	16	5.3	456
ISIS 494284	13	6.3	330
ISIS 494286	14	5.5	304
ISIS 494301	15	6.0	392
ISIS 494302	12	6.3	305
ISIS 494372	11	6.1	447

30

【実施例12】

【0428】

カニクイザルにおけるISIS 494372の薬理活性の特徴付け

ISIS 494372の薬理活性は、化合物を13週間にわたって投与され、さらに13週間回復させたサルの肝臓アポ(a)mRNAおよび血漿アポ(a)レベルを測定することにより特徴付けされた。

40

【0429】

処置

1群に14匹の無作為に割り付けられた雄および雌のカニクイザルの5つの群は、適切な大きさのステンレススチール製の投薬針およびシリンジを使用して、サルの背面（肩甲部）の4つの部位のうちの1つにISISオリゴヌクレオチドまたはPBSを皮下注射された。サルは、最初の週に関しては、負荷用量として1週間に4回（1、3、5、および

50

7日目)、そしてその後、2～13週目の間、1週間に1回、下の表に示される維持量を投薬された。最初の週の間の負荷用量は、 $\text{mg}/\text{kg}/\text{週}$ として表され、一方、2～13週目の維持量は、 $\text{mg}/\text{kg}/\text{週}$ として表される。

【表61】

カニクイザルの投薬群

群	試験物	用量	検死の動物数		
			中間	末期	回復
1	PBS	-	4	6	4
2	ISIS 494372	4	-	6	-
3		8	-	6	-
4		12	4	6	4
5		40	4	6	4

10

【0430】

動物からの肝臓サンプルを、アポ(a)mRNAの分析用に研究の中間、末期および回復段階で採取した。加えて、異なる日に血漿サンプルを採取して、アポ(a)タンパク質レベルを測定した。この非臨床研究は、アメリカ食品医薬品局(FDA)の試験実施(GLP)規則21 CFR Part 58に従い行われた。

【0431】

20

RNA分析

30、93、および182日目に肝臓サンプルをサルから採取し、凍結した。簡潔に、凍結肝臓の一部(0.2g)を2mLのRLT溶液(Qiagen)に均質化した。得られた可溶化液をQiagen RNeasyミニカラムに適用した。精製および定量化後、組織をRT-PCR分析にかけた。リアルタイム蛍光RT-PCR検出を使用するPerkin-Elmer ABI Prism 7700配列検出システムを使用して、アポ(a)mRNAを定量化した。アッセイは、対向する端の蛍光レポーターおよび消光剤色素で標識された標的特異的プローブに基づく。プローブをTaq DNAポリメラーゼの5'エクソヌクレアーゼを通して加水分解し、反応中に検出することができるレポーター色素の蛍光発光の増加を引き起こした。アカゲザルのアポ(a)mRNA転写GENBANK受託番号XM_001098061.2(配列番号XXX)配列の1512位を標的指向するプローブセット(ABI Rhesus LPAプローブセットID Rh02789275_m1, Applied Biosystems, Carlsbad CA)を使用して、カニクイザルの肝臓アポ(a)mRNA発現レベルを測定した。アポ(a)発現はRIBOGREEN(登録商標)を使用して正規化された。結果は、PBS対照に対するアポ(a)mRNAの阻害パーセントとして提示される。

30

【0432】

表62に示されるように、ISIS 494372による処置は、PBS対照と比較して、アポ(a)mRNAの用量依存低下をもたらした。30日目に、肝臓のアポ(a)mRNA発現は、 $12\text{mg}/\text{kg}/\text{週}$ および $40\text{mg}/\text{kg}/\text{週}$ の投薬コホートにおいて、用量依存様式で、それぞれ、74%および99%低下した。これらの低下は、一元配置ANOVAにより統計的に有意である(Dunnett多重比較検定、 $P<0.05$)。

40

【0433】

アポ(a)mRNAレベルも回復段階中に測定された。最終用量88日後の肝臓発現レベルはなお、 $12\text{mg}/\text{kg}/\text{週}$ および $40\text{mg}/\text{kg}/\text{週}$ 投薬コホートにおいて、それぞれ、49%および69%低下した。

【表 6 2】

I S I S 4 9 4 3 7 2 により処置されたカニクイザルの投薬段階における肝臓アポ (a)

mRNAの阻害パーセントレベル

日数	用量 (mg/kg/週)	阻害%
30	12	73
	40	99
93	4	44
	8	43
	12	53
	40	93

10

【0 4 3 4】

タンパク質分析

20

市販のアポ (a) E L I S A キット (M e r c o d i a 1 0 - 1 1 0 6 - 0 1, U p p s a l a, S w e d e n) を使用して、約 $20\mu\text{l}$ の血漿を分析した。アッセイプロトコルは製造者によって説明されるように実施された。結果は、1 日目の投薬前アポ (a) 血漿タンパク質濃度からのパーセンテージ変化として表 6 3 および 6 4 に提示される。D u n n e t t 多重比較検定を使用した1 日目のベースライン血漿アポ (a) からの統計的に有意な差には星印を付ける。

【0 4 3 5】

血漿アポ (a) タンパク質における最大低下が、9 3 日目までに全ての投薬コホートにおいて観察された。回復段階において、 40mg/kg/週 の投薬コホートにおけるアポ (a) 血漿タンパク質レベルは、4 週および1 3 週 (1 2 1 日目および1 8 2 日目) の回復後、それぞれ、ベースラインの2 2 % および9 3 % であった。 12mg/kg/週 のコホートの回復速度は、 40mg/kg/週 のコホートに見られるものと類似した。

30

【表 6 3】

I S I S 4 9 4 3 7 2により処置されたカニクイザルの投薬段階における1日目のレベルのパーセントとしてのアポ (a) 血漿タンパク質レベル

日数	用量 (mg/kg/週)	%
30	4	93
	8	70
	12	49
	40	15*
93	4	73
	8	56
	12	32*
	40	11*

10

20

【表 6 4】

I S I S 4 9 4 3 7 2により処置されたカニクイザルの回復段階における1日目のレベルのパーセントとしてのアポ (a) 血漿タンパク質レベル

日数	用量 (mg/kg/週)	%
121	12	38*
	40	22*
182	12	84
	40	93

30

【実施例 1 3】

【0 4 3 6】

ヒトアポ (a) を標的指向する I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドの粘度の測定

40 c P を超える粘度を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドをスクリーニングして排除する目的で、上述の研究からの選択したアンチセンスオリゴヌクレオチドの粘度を測定した。40 c P を超える粘度を有するオリゴヌクレオチドは、最適未満の粘度を有するであろう。

40

【0 4 3 7】

I S I S オリゴヌクレオチド (32 ~ 35 mg) をガラスのバイアルに量り入れ、120 μ L の水を添加し、バイアルを50℃に加熱することによりアンチセンスオリゴヌクレオチドを溶液に溶解した。予め加熱したサンプルの一部 (75 μ L) をマイクロ粘度計 (C a m b r i d g e) にピペットで注入した。マイクロ粘度計の温度を25℃に設定し、サンプルの粘度を測定した。85℃、260 nMでのUV読み取り (C a r y U V 機器) のために、予め加熱したサンプルの別の一部 (20 μ L) を10 mLの水にピペットで注入した。結果は表 6 5 に提示され、アンチセンスオリゴヌクレオチド溶液の大半が上述

50

の基準によりそれらの粘度が最適であることを示す。最適ではないものは「粘性」と示される。具体的には、I S I S 4 9 4 3 7 2 は、上述の基準によりその粘度が最適であった。

【表 6 5】

ヒトアポ（a）を標的指向する I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドの粘度および濃度

ISIS 番号	モチーフ	粘度(cP)	濃度(mg/mL)
494158	5-10-5 MOE	9.0	350
494159	5-10-5 MOE	11.7	325
494161	5-10-5 MOE	12.0	350
494162	5-10-5 MOE	25.8	350
494163	5-10-5 MOE	粘性	275
494243	5-10-5 MOE	28.4	325
494244	5-10-5 MOE	19.2	300
494283	3-10-4 MOE	13.4	300
494284	5-10-5 MOE	13.4	350
494285	5-10-5 MOE	23.1	350
494286	5-10-5 MOE	16.5	275
494301	5-10-5 MOE	17.1	325
494302	5-10-5 MOE	24.3	350
494304	5-10-5 MOE	49.3	275
494311	5-10-5 MOE	10.8	325
494337	5-10-5 MOE	29.5	325
494372	5-10-5 MOE	12.5	350
494466	5-10-5 MOE	粘性	275
494470	5-10-5 MOE	16.7	350
494472	5-10-5 MOE	23.6	350
498408	5-10-5 MOE	31.5	300
510548	5-10-5 MOE	9.0	350
512947	3-10-4 MOE	6.8	350
512958	5-10-5 MOE	26.0	350

【配列表】

0006082809000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00

(74)代理人 100118902
弁理士 山本 修

(74)代理人 100128750
弁理士 廣瀬 しのぶ

(74)代理人 100198018
弁理士 取違 絵理

(72)発明者 クルック, ロザンヌ・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州92010, カールズバッド, ガゼル・コート 2855

(72)発明者 グラハム, マーク・ジェイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州92010, カールズバッド, ガゼル・コート 2855

(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92010, カールズバッド, ガゼル・コート 2855

審査官 植原 克典

(56)参考文献 国際公開第2005/000201 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/REGISTRY/BIOSIS (STN)