

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5896175号
(P5896175)

(45) 発行日 平成28年3月30日 (2016. 3. 30)

(24) 登録日 平成28年3月11日 (2016. 3. 11)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A G

A 6 1 K 31/712 (2006. 01)

A 6 1 K 31/712

A 6 1 K 31/7125 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7125

A 6 1 K 48/00 (2006. 01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 25/00 (2006. 01)

A 6 1 P 25/00

請求項の数 9 (全 154 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-508296 (P2013-508296)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月29日 (2011. 4. 29)
 (65) 公表番号 特表2013-526860 (P2013-526860A)
 (43) 公表日 平成25年6月27日 (2013. 6. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/034661
 (87) 国際公開番号 W02011/139917
 (87) 国際公開日 平成23年11月10日 (2011. 11. 10)
 審査請求日 平成26年4月30日 (2014. 4. 30)
 (31) 優先権主張番号 61/405, 163
 (32) 優先日 平成22年10月20日 (2010. 10. 20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/329, 538
 (32) 優先日 平成22年4月29日 (2010. 4. 29)
 (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
 Ionis Pharmaceutica
 ls, Inc.
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9201
 O, カールズバッド, ガゼル コート 2
 855
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスサイレチン発現の調節

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号80に記載される配列からなる核酸塩基配列を有する、20個の連結したオリゴヌクレオシドからなる一本鎖修飾ヌクレオチドを含む化合物であって:

前記オリゴヌクレオチドが、

10個の連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント;

5個の連結したヌクレオシドからなる5'ウイングセグメント; 及び

5個の連結したヌクレオシドからなる3'ウイングセグメント;

を含み、ギャップセグメントが5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントの間に位置し、それぞれのウイングセグメントの各ヌクレオシドが2'-O-メチル糖を含み、それぞれのヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合であり、そしてそれぞれのシトシンが5-メチルシトシンである、前記化合物。

【請求項 2】

前記オリゴヌクレオチドが複合化している、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

前記化合物が前記一本鎖修飾オリゴヌクレオチドからなる、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

請求項1~3のいずれかに記載の化合物又はその塩、及び少なくとも一つの薬学的に許容される担体又は希釈剤を含む、組成物。

【請求項 5】

請求項1～3のいずれかに記載の化合物又は請求項4に記載の組成物を含む医薬組成物。

【請求項6】

前記化合物または組成物がトランスサイレチンアミロイドーシスを予防し、治療し、改善し又は進行を遅延させる、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項7】

請求項1～3のいずれかに記載の化合物又は請求項4に記載の組成物を含む、動物におけるトランスサイレチンmRNA又はタンパク質の発現を低減するための医薬組成物。

【請求項8】

動物がヒトである、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項9】

請求項1～3のいずれかに記載の化合物または請求項4に記載の組成物を含む、トランスサイレチンアミロイドーシスに関連する症状を低減するための医薬組成物であって、症状が、不穏、協調運動障害、眼振、痙性対麻痺、筋協調障害、視覚障害、不眠症、異常感覚、ミオクロヌス、失明、失語症、手根管症候群、発作、くも膜下出血、脳卒中及び脳内出血、水頭症、運動失調、痙性麻痺、昏睡、感覚性ニューロパチー、知覚異常、感覚鈍麻、運動ニューロパチー、自律神経ニューロパチー、起立性低血圧、反復性便秘、反復性下痢、嘔気、嘔吐、発汗減少、性交不能、胃排出遅延、尿閉、尿失禁、進行性心疾患、疲労、息切れ、体重減少、食欲不振、知覚麻痺、刺痛、脱力、舌肥大、ネフローゼ症候群、鬱血性心不全、労作性呼吸困難、末梢性浮腫、不整脈、動悸、朦朧状態、失神、体位性低血圧、末梢神経疾患、感覚運動障害、下肢ニューロパチー、上肢ニューロパチー、痛覚過敏、温度感覚異常、下肢脱力、悪液質、末梢性浮腫、肝腫大、紫斑、拡張機能障害、心室性期外収縮、脳ニューロパチー、深部腱反射減弱、硝子体のアミロイド沈着、硝子体混濁、ドライアイ、緑内障、瞳孔における波状の外見、および水分貯留による足の浮腫、からなる群から選択される、前記医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本願は電子フォーマットの配列表と共に出願される。配列表は、B I O L O 1 2 3 W O S E Q. t x t のファイル名で2011年4月28日に作成されたサイズ55Kbのファイルとして提出される。電子フォーマットでの配列表の情報は、参照によりその全体が本明細書に取り込まれる。

【0002】

本発明は、動物におけるトランスサイレチンmRNA及びタンパク質の発現を低減する方法、化合物及び組成物を提供する。これらの方法、化合物及び組成物は、例えば、トランスサイレチンアミロイドーシスの治療、予防又は改善に有用である。

【背景技術】

【0003】

トランスサイレチン (TTR) (プレアルブミン、高サイロキシン血症、プレアルブミン異常、サイロキシン；老人性全身性アミロイドーシス、アミロイドポリニューロパチー、アミロイドーシスI型、P A L B；トランスサイレチン異常、H S T 2 6 5 1；T B P A；プレアルブミン異常甲状腺機能正常高サイロキシン血症としても知られる) は、サイロキシン及びレチノールの輸送に関与する、血清／血漿及び脳脊髄液タンパク質である (Sakaki et al, Mol Biol Med. 1989, 6:161-8)。構造的には、TTRはホモテトラマーであり、このタンパク質の点突然変異及び異常な折り畳みは、アミロイド線維の沈着を引き起こし、老人性全身性アミロイドーシス (S S A)、家族性アミロイドポリニューロパチー (F A P)、家族性アミロイド心疾患 (F A C) などの疾患に関係している。

【0004】

TTRは、ヒトにおいて、主に肝臓や脳の脈絡叢で、また比較的少量が網膜で合成される (Palha, Clin Chem Lab Med, 2002, 40, 1292-1300)。肝臓で合成されたトランスサ

10

20

30

40

50

イレチンは血液中に分泌され、脈絡叢由来のトランスサイレチンは脳脊髄液（C S F）に分泌される。脈絡叢では、トランスサイレチンの合成が局所タンパク質合成全体の約 2 0 %を占め、また C S F タンパク質全体の 2 5 %にも及ぶ（Dickson et al., J Biol Chem, 1986, 261, 3475-3478）。

【0005】

遺伝学的及び免疫組織化学的な診断テストの利用により、T T R アミロイドーシスの患者は世界中の多くの国々で見ついている。最近の研究では、T T R アミロイドーシスはこれまで考えられていたような稀な風土病ではなく、高齢者人口の 2 5 %に発症する可能性があることが指摘されている（Tanskanen et al, Ann Med. 2008;40(3):232-9）。

【0006】

生化学的レベルでは、T T R は F A P 患者のアミロイド沈着における主要なタンパク質成分であることが見出され（Costa et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1978, 75:4499-4503）、その後、該タンパク質の 3 0 位のメチオニンがバリンに置換されていることが、該疾患を引き起こす最も一般的な分子欠陥であることが明らかとなった（Saraiva et al, J. Clin. Invest. 1984, 74: 104-119）。F A P では、T T R 凝集物及びアミロイド繊維の広範囲に及ぶ全身的な細胞外沈着が、結合組織全体、特に末梢神経系において発生する（Sousa and Saraiva, Prog. Neurobiol. 2003, 71: 385-400）。T T R 沈着が起きると、次いで軸索変性が、小径の無髄及び有髄線維から生じ始め、最終的に神経節での神経細胞脱落に至る。

【0007】

本明細書に記載する化合物及び治療方法は、T T R 関連疾患に現在用いることができる治療の選択肢に対して、有意な優越性をもたらす。T T R アミロイドーシスは、一般的に 1 0 年以内に死に至り、最近まで治療不能と考えられていた。一般的に肝臓がアミロイド形成 T T R の供給源であるため、肝臓移植は、家族性のケースにおいて、疾患関連対立遺伝子を野生型（W T）対立遺伝子で置き換える有効な方法の一つである。肝臓移植は、遺伝子治療の一形態としては有効であるが、問題がないわけではない。移植は、移植患者及びドナーへの侵襲的手術の必要性、移植後の長期間の免疫抑制療法、ドナーの不足、高額な費用、T T R アミロイドーシスの患者の多くが疾患の進行により適した対象とならないことなど、困難な面がある。また残念ながら、家族性患者の一部では、肝臓移植後であっても W T T T R が沈着し続けることが多く、心アミロイドーシスが進行する場合もある。また、T T R の中枢神経系（C N S）沈着は、脈絡叢での合成に起因するため、移植では治療することができない。最も多くみられる T T R 疾患であり、W T T T R の沈着によって 8 0 歳以上の約 2 5 %が発症する老人性全身性アミロイドーシス（S S A）に対して、移植は実行可能な選択肢ではない。

【0008】

特定の遺伝子産物の発現を低減する有効な手段の一つとして、アンチセンス技術が出現しつつあり、T T R 発現の調節に関する治療、診断及び研究の多数の用途に非常に有用な技術となる可能性がある（米国特許公開第 2 0 0 8 / 0 0 3 9 4 1 8 号及び 2 0 0 7 / 0 2 9 9 0 2 7 号参照）。

【0009】

本発明は、トランスサイレチンの発現を調節するための組成物及び方法を提供する。トランスサイレチンの発現を調節するためのアンチセンス化合物は、前述の公開特許出願に開示されている。しかし、そのような化合物の更なるものに対する必要性が残されている。

【発明の概要】

【0010】

本発明は、トランスサイレチン（T T R）m R N A 及びタンパク質の発現を調節する方法、化合物及び組成物を提供する。ある実施形態では、T T R の m R N A 及びタンパク質の調節に有用な化合物は、アンチセンス化合物である。ある実施形態では、該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。

【0011】

ある実施形態では、調節は細胞又は組織内で起こり得る。ある実施形態では、該細胞又は組織は動物中にある。ある実施形態では、該動物はヒトである。ある実施形態では、TTRmのRNAレベルが低下する。ある実施形態では、TTRのタンパク質レベルが低下する。これらの低下は、時間依存的又は用量依存的に起こり得る。

【0012】

本発明は、トランスサイレチンの発現の調節、及びトランスサイレチンアミロイドーシス及び／又はその症状の治療、予防、進行遅延又は改善のための方法、化合物及び組成物を提供する。ある実施形態では、トランスサイレチンの発現の調節、及びトランスサイレチンアミロイド病又はトランスサイレチンアミロイドーシスあるいはトランスサイレチン関連アミロイドーシス（例えば、遺伝性TTRアミロイドーシス、軟膜アミロイドーシス、トランスサイレチンアミロイドポリニューロパチー、家族性アミロイドポリニューロパチー、家族性アミロイド心筋症、又は老人性全身性アミロイドーシス）の治療、予防、進行遅延又は改善のための方法、化合物及び組成物である。

10

【0013】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある動物を、8～80個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、8～80個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86、87、115、120、122又は124に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

20

【0014】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある動物を、12～50個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、12～50個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86、87、115、120、122又は124に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

30

【0015】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある動物を、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86、87、115、120、122又は124に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

40

【0016】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある動物を、15～25個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、15～25個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86、87、115、120、122

50

又は124に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

【0017】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある動物を、18～21個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、18～21個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86、87、115、120、122又は124に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

10

【0018】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある動物を、20～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、20～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86、87、115、120、122又は124に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

20

【0019】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、8～80個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物、又は、8～80個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86、87、115、120、122又は124に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

30

【0020】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、12～50個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物、又は、12～50個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86、87、115、120、122又は124に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

40

【0021】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物、又は、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86、87、115、120、122又は1

50

24に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

【0022】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、15～25個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、15～25個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86、87、115、120、122又は124に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

10

【0023】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、18～21個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、18～21個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86、87、115、120、122又は124に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

20

【0024】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある、又はトランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、8～80個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、8～80個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86又は87に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

30

【0025】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある、又はトランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、12～50個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、12～50個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86又は87に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

40

【0026】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある、又はトランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番

50

号25、80、86又は87に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

【0027】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある、又はトランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、15～25個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、15～25個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86又は87に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

10

【0028】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある、又はトランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、18～21個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、18～21個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86又は87に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

20

【0029】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある、又はトランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、20～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、20～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号25、80、86又は87に記載する核酸塩基配列のいずれか一つから選択される核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

30

【0030】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある、又はトランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、8～80個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、8～80個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号80に記載する核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

40

【0031】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある、又はトランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、12～50個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、12～50個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番

50

号 80 に記載する核酸塩基配列の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

【0032】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある、又はトランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、12～30 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号 1 又は配列番号 2 に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、12～30 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号 80 に記載する核酸塩基配列の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

10

【0033】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある、又はトランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、15～25 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号 1 又は配列番号 2 に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、15～25 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号 80 に記載する核酸塩基配列の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

20

【0034】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある、又はトランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、18～21 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号 1 又は配列番号 2 に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、18～21 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号 80 に記載する核酸塩基配列の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

30

【0035】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある、又はトランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、20～30 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号 1 又は配列番号 2 に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、20～30 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号 80 に記載する核酸塩基配列の少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 又は 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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

40

【0036】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスのリスクがある、又はトランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、20 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号 1 又は配列番号 2 に示すトランスサイレチン核酸に相補的である修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、20 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号 80 に記載

50

する核酸塩基配列の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は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を含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

【0037】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1又は配列番号2に示すトランスサイレチン核酸に100%相補的な修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物；又は、20個の連結したヌクレオシドからなり、配列番号80に記載する核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

10

【0038】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物を、20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1に示すトランスサイレチン核酸に100%相補的な修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物であり；また20個の連結したヌクレオシドからなり、配列番号80に記載する核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む該化合物を、該動物に投与することで治療を行う。

【0039】

ある実施形態では、トランスサイレチンアミロイドーシスを有する動物は、20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1に示すトランスサイレチン核酸に100%相補的な修飾オリゴヌクレオチドを含む治療上有効量の化合物であり；20個の連結したヌクレオシドからなり、配列番号80に記載する核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であり；また、10個の連結したデオキシヌクレオシドのギャップセグメントを、それぞれ5つの連結した修飾ヌクレオシドを有する2つのウイングセグメントの間に持つ化合物を、該動物に投与することで治療を行う。ある実施形態では、ウイングセグメント中の1以上の修飾ヌクレオシドは、修飾糖を有する。ある実施形態では、修飾ヌクレオシドは、2'-置換ヌクレオシドである。ある実施形態では、修飾ヌクレオシドは、2'-MOEヌクレオシドである。

20

【0040】

ある実施形態では、調節は細胞、組織、器官又は生物内で起こり得る。ある実施形態では、該細胞、組織又は器官は動物中にある。ある実施形態では、該動物はヒトである。ある実施形態では、トランスサイレチンのmRNAレベルが低下する。ある実施形態では、トランスサイレチンのタンパク質レベルが低下する。これらの低下は、時間依存的又は用量依存的に起こり得る。

30

【0041】

本発明は、また、トランスサイレチンアミロイドーシスに関連する疾患、障害及び状態の予防、治療及び改善に有用な方法、化合物及び組成物を提供する。ある実施形態では、そのような疾患、障害及び状態は、トランスサイレチンアミロイドーシスに関連する疾患、障害及び状態である。

【0042】

ある実施形態では、治療方法は、TTRアンチセンス化合物を、それを必要とする個体に投与することを含む。ある実施形態では、治療方法は、TTRアンチセンスオリゴヌクレオチドを、それを必要とする個体に投与することを含む。

40

【0043】

ある実施形態では、治療方法は、トランスサイレチンアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与、及び更なる治療を、それを必要とする個体に行うことを含む。

【発明を実施するための形態】

【0044】

上記の概略的説明及び下記の詳細な説明は、どちらも例示及び解説にすぎず、請求されている、本発明を限定するものではない。本明細書において、単数形の使用には、別段の

50

明記がない限り、複数形が含まれる。本明細書で使用される「又は (or)」とは、別段の記載がない限り、「及び／又は (and/or)」を意味する。さらに、「含む (including)」という用語、並びに「includes」、「included」などの他の語形の使用は、限定を意味しない。また、「要素 (element)」又は「成分 (component)」などの用語は、別段の明記がない限り、1つのユニットを含む要素及び成分と、2つ以上のサブユニットを含む要素及び成分を、どちらも包含する。

【0045】

本明細書で使用する節の見出しには構成上の目的しかなく、記載される主題を限定するものと解釈されるものではない。本願で言及されるすべての文書又は文書の一部、例えば、限定されないが、特許、特許出願、論文、本、専門書などは、その文書の本明細書で論じた部分ならびにそれら全体が、これにより明示的に、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

10

【0046】

定義

明示的に定義しない限り、本明細書に記載する分析化学、合成有機化学、ならびに医薬品化学及び薬化学に関連して使用される用語体系、ならびにそれらの方法及び技法は、当該分野において公知であり一般的に使用されるものを意味する。化学合成及び化学分析には標準的な技法を使用することができる。可能である場合は、本明細書の全体を通して言及されるすべての特許、出願、出願公開及びその他の公表物、GENBANKアクセッション番号及び国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) などのデータベースから得ることができる関連する配列情報、ならびにその他のデータは、その文書の本明細書で論じた部分ならびにそれら全体が、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

20

【0047】

別段の記述がない限り、以下の用語は次に挙げる意味を有する。

【0048】

「2'-O-メトキシエチル」(2'-MOE及び2'-O(CH₂)₂-OCH₃ともいう)は、フロシル環の2'位のO-メトキシエチル修飾を意味する。2'-O-メトキシエチル修飾糖は修飾糖である。

【0049】

「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。

30

【0050】

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

【0051】

「活性薬剤」とは、個体に投与された時に治療上の利益をもたらす、医薬組成物中の物質又は複数の物質を意味する。例えば、ある実施形態では、トランスサイレチンを標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドが活性薬剤である。

【0052】

「活性標的領域」又は「標的領域」とは、1つ以上の活性アンチセンス化合物が標的とする領域を意味する。「活性アンチセンス化合物」は、標的核酸レベル又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。

40

【0053】

「併用して投与される」とは、2つの薬剤を、両方の薬理効果が患者に同時に認められるような任意の方法によって、共投与することを意味する。併用投与は、両方の薬剤が単一の医薬組成物、同じ剤形、又は同じ投与経路で投与される必要はない。両方の薬剤の効果が同時に現われる必要はない。効果はある期間にわたって重複しているだけでよく、同一の広がりを持つ必要はない。

【0054】

「投与する」とは、医薬剤を個体に与えることを意味し、例えば医療専門家による投与

50

及び自己投与が含まれるが、これらに限定されない。

【0055】

「改善」とは、関連する疾患、障害、又は状態の少なくとも1つの指標、徴候、又は症状の減少を意味する。指標の重症度は、当業者に公知の主観的又は客観的尺度によって決定することができる。

【0056】

「アミロイドーシス」とは、様々な生体組織中の異常なタンパク質（アミロイド又はアミロイド線維）の沈着の結果生じる一連の疾患又は障害である。アミロイドタンパク質は、体内の特定の1領域に沈着する（局所性アミロイドーシス）か、又は全身に沈着する（全身性アミロイドーシス）場合がある。全身性アミロイドーシスには、3つのタイプ、すなわち原発性（AL）、続発性（AA）、家族性（ATTR）が存在する。原発性アミロイドーシスは、他の疾患との関連はなく、それ自体の疾患と考えられている。続発性アミロイドーシスは、他の疾患の結果として生じる。家族性地中海熱は、家族性（遺伝性）アミロイドーシスの1種である。

10

【0057】

「動物」とは、ヒト又は非ヒト動物を意味し、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、及びサル、チンパンジーなどの非ヒト霊長類などが含まれるが、これらに限定されない。

【0058】

「アンチセンス活性」とは、アンチセンス化合物が標的核酸にハイブリダイゼーションすることで生じる、検出可能又は測定可能な活性を意味する。ある実施形態では、アンチセンス活性は、標的核酸又はその標的核酸がコードするタンパク質の量又は発現の減少である。

20

【0059】

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

【0060】

「アンチセンス阻害」とは、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又は標的タンパク質レベルが、アンチセンス化合物の非存在下における標的核酸レベル又は標的タンパク質レベルと比べて減少することを意味する。

30

【0061】

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

【0062】

「二環式糖」とは、2つの非ジェミナル環原子の架橋によって修飾されたフロシル環を意味する。二環式糖は修飾糖である。

【0063】

「二環式核酸」又は「BNA」とは、ヌクレオシド又はヌクレオチドのフラノース部分がフラノース環上の2つの炭素原子を連結する架橋を含み、その結果、二環式の環系を形成しているヌクレオシド又はヌクレオチドを意味する。

40

【0064】

「キャップ構造」又は「末端キャップ部分」とは、アンチセンス化合物のどちらかの末端に組み込まれている化学修飾を意味する。

【0065】

「中枢神経系（CNS）」とは、髄膜に包まれている脊椎動物の神経系を意味する。それは神経系の大部分を含み、脳（脳を持つ脊椎動物の場合）と脊髄で構成される。CNSは背側腔内に収められており、脳は頭蓋腔、脊髄は脊椎腔内に収められている。また、脳は頭蓋骨で守られており、脊髄は、脊椎動物では、脊椎骨で守られている。

【0066】

50

「化学的に異なる領域」とは、アンチセンス化合物において、そのアンチセンス化合物の別の領域とは何らかの形で化学的に異なる領域を意味する。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は、化学的に異なる。

【0067】

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

【0068】

「脈絡叢」とは、脳室上の領域で、脳脊髄液（CSF）が作られる領域である。

【0069】

「共投与」とは、1つの個体に2つ以上の医薬剤を投与することを意味する。2つ以上の医薬剤は、単一の医薬組成物中であってもよいし、別々の医薬組成物中であってもよい。2つ以上の医薬剤は、それぞれ同じ経路又は異なる経路で投与してもよい。共投与は、並行投与又は順次投与を含む。

【0070】

「相補性」とは、第1の核酸と第2の核酸の核酸塩基間で対を形成する能力を意味する。

【0071】

「連続する核酸塩基」とは、互いに直接隣接する核酸塩基を意味する。

【0072】

「希釈剤」とは、薬理活性は持たないが薬学的に必要又は望ましい、組成物中の成分を意味する。例えば、注射される組成物においては、液体、例えば食塩水が希釈剤となり得る。

【0073】

「用量」とは、1回の投与又は特定の期間において与えられる、医薬剤の特定の量を意味する。ある実施形態では、用量を、1つ、2つ又はそれ以上のボラス、錠剤、又は注射剤で投与してもよい。例えば、皮下投与が望まれるある実施形態では、所望する用量が1回の注射では難しい量を要するため、所望する用量を達成するために2つ以上の注射剤を用いることができる。ある実施形態では、医薬剤は長時間の注入又は持続的注入によって投与される。用量は、1時間、1日、1週間、又は1ヶ月あたりの医薬剤の量として記載される。

【0074】

「有効量」とは、その薬剤を必要とする個体において所望の生理学的結果をもたらすのに十分な活性薬剤の量を意味する。有効量は、治療される個体の健康状態や身体状態、治療される個体の分類群、組成物の処方、個体の病状の評価、及びその他の関連する要因に依存して、個体間で変動し得る。

【0075】

「家族性アミロイドーシス」又は「遺伝性アミロイドーシス」とは、遺伝によるアミロイドーシスである。

【0076】

「家族性アミロイドポリニューロパチー」又は「FAP」は、遺伝的に伝達される神経変性疾患で、トランスサイレチンタンパク質のアミロイド変異体が全身に沈着し、進行性の感覚性及び運動性ポリニューロパチーを引き起こすことを特徴とする。

【0077】

「完全に相補的」又は「100%相補的」とは、第1の核酸の核酸塩基配列の各核酸塩基が、第2の核酸の第2の核酸塩基配列における相補的核酸塩基を有することを意味する。ある実施形態では、第1の核酸がアンチセンス化合物であり、標的核酸が第2の核酸である。

【0078】

「ギャップマー（gapmer）」とは、RNaseH開裂を補助する複数のヌクレオシドを

10

20

30

40

50

有する内部領域が、1つ以上のヌクレオシドを有する外部領域の間に位置し、内部領域のヌクレオシドは外部領域のヌクレオシドと化学的に異なる、キメラアンチセンス化合物を意味する。内部領域は、「ギャップセグメント」とも呼ばれることがあり、外部領域は、「ウイングセグメント」とも呼ばれることがある。

【0079】

「ギャップ拡大型 (gap-widened)」とは、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し、それが1~6個のヌクレオシドを有する5'-ウイングセグメントと3'-ウイングセグメントの間に直接隣接して位置する、キメラアンチセンス化合物を意味する。

【0080】

10

「遺伝性トランスサイレチン (TTR) アミロイドーシス」とは、サイロキシン及びビタミンAの血漿輸送タンパク質であるトランスサイレチンの変異によって引き起こされる全身性疾患である。末梢性ニューロパチーや拘束型心筋症に関連している場合が最も多いが、全身的な血管壁や結合組織構造へのアミロイドの沈着は、他の臓器系の機能障害を引き起こすことが多い。該疾患では、消化管の運動性異常が一般的に見られ、胃内容排出遅延から生じる便秘、下痢、及び早期満腹感が見られる。手関節におけるアミロイドの結合組織沈着は、手根管症候群を引き起こす場合がある。脊髄血管及び周辺構造におけるアミロイド沈着は、跛行の症状を伴う脊髄狭窄を引き起こす。

【0081】

「ハイブリダイゼーション」とは、相補的核酸分子のアニーリングを意味する。ある実施形態では、相補的核酸分子は、アンチセンス化合物及び標的核酸を含む。

20

【0082】

「直接隣接」とは、直接隣接する要素間に介在要素が存在しないことを意味する。

【0083】

「個体」とは、処置又は治療のために選択されるヒト又は非ヒト動物を意味する。

【0084】

「内脳室 (intracerebroventricular) 投与」、「脳室内 (cerebral intraventricular) 投与」又は「脳室投与」とは、注射又は注入による脳室系への投与を意味する。

【0085】

「腹腔内投与」とは、腹腔への投与を意味する。

30

【0086】

「髄腔内投与」とは、注射又は注入による、脊髄及び脳を満たしている脳脊髄液への投与を意味する。

【0087】

「静脈内投与」とは、静脈中への投与を意味する。

【0088】

「室内投与」とは、脳室又は心室への投与を意味する。

【0089】

「ヌクレオシド間結合」とは、ヌクレオシド間の化学結合を指す。

【0090】

40

「軟膜性」とは、脳及び脊髄を覆っている、最も内側にある2層の組織層である軟膜に関することを意味する。「軟膜性アミロイドーシス」とは、軟膜内のトランスサイレチンアミロイド沈着によって生じる軟膜のアミロイドーシスを意味する。

【0091】

「連結されたヌクレオシド」とは、互いに結合された隣接ヌクレオシドを意味する。

【0092】

「ミスマッチ」又は「非相補的核酸塩基」とは、第1の核酸の核酸塩基が、第2の核酸又は標的核酸の対応する核酸塩基と対を形成する能力を持たない場合を意味する。

【0093】

「修飾ヌクレオシド間結合」とは、天然のヌクレオシド間結合 (すなわち、ホスホジエ

50

ステルヌクレオシド間結合)からの置換又は何らかの変化を意味する。

【0094】

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

【0095】

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

10

【0096】

「修飾オリゴヌクレオチド」とは、少なくとも一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。

【0097】

「修飾糖」とは、天然の糖からの置換又は変化を意味する。

【0098】

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

【0099】

「天然のヌクレオシド間結合」とは、3' - 5' ホスホジエステル結合を意味する。

20

【0100】

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

【0101】

「核酸」とは、単体のヌクレオチドで構成される分子を意味する。核酸には、リボ核酸(RNA)、デオキシリボ核酸(DNA)、一本鎖核酸、二本鎖核酸、低分子干渉リボ核酸(siRNA)、及びマイクロRNA(miRNA)が含まれる。また、核酸は、単一の分子内にこれらの要素の組み合わせを含む場合もある。

【0102】

「核酸塩基」とは、別の核酸の塩基と対を形成する能力を有する複素環部分を意味する。

30

【0103】

「核酸塩基配列」とは、糖、結合又は核酸塩基修飾とは無関係に、連続する核酸塩基の順序を意味する。

【0104】

「ヌクレオシド」とは、糖に連結された核酸塩基を意味する。

【0105】

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

【0106】

「オリゴマー化合物」又は「オリゴマー」とは、核酸分子の少なくとも1つの領域にハイブリダイズする能力を有する、連結された単体サブユニットのポリマーを意味する。

40

【0107】

「オリゴヌクレオチド」とは、それぞれが互いに独立して修飾又は非修飾である連結されたヌクレオチドのポリマーを意味する。

【0108】

「非経口投与」とは、注射又は注入による投与を意味する。非経口投与には、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、動脈内投与、腹腔内投与、又は頭蓋内投与、例えば脳内投与、髄腔内投与、室内投与、室投与、内脳室投与、脳室内投与、脳室投与などが含まれる。投与は、連続投与、長期投与、又は短期若しくは間欠投与でもよい。

50

【0109】

「ペプチド」とは、少なくとも2つのアミノ酸をアミド結合で連結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、ポリペプチド及びタンパク質を意味する。

【0110】

「医薬組成物」とは、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つ以上の活性薬剤と滅菌された水溶液を含むものがある。

【0111】

「薬学的に許容される塩」とは、アンチセンス化合物の生理学的及び薬学的に許容される塩、すなわち親オリゴヌクレオチドの所望の生物学的活性を保ち、望ましくない毒性効果を付与しない塩を意味する。

10

【0112】

「ホスホロチオエート結合」とは、ホスホジエステル結合が非架橋酸素原子の1つを硫黄原子で置き換えることで修飾されている、ヌクレオシド間の結合を意味する。ホスホロチオエート結合は、修飾ヌクレオシド間結合である。

【0113】

「部分 (portion)」とは、核酸における、ある所定数の連続する (すなわち連結した) 核酸塩基を意味する。ある実施形態では、部分は、標的核酸における所定数の連続する核酸塩基である。ある実施形態では、部分は、アンチセンス化合物における所定数の連続する核酸塩基である。

【0114】

「予防」とは、ある疾患、障害又は状態の発症又は発現を、数分から無期限の期間で、遅延させる又は未然に防ぐことを意味する。また、予防は、ある疾患、障害、又は状態が発現するリスクを低下させることも意味する。

20

【0115】

「プロドラッグ」とは、不活性な形態で調製され、体内又はその細胞内で、内因性酵素若しくは他の化学物質の作用又は条件によって活性型に変換される治療剤を意味する。

【0116】

「副作用」とは、治療に起因すると考えられる、所望の効果以外の生理学的応答を意味する。ある実施形態では、副作用には、注射部位反応、肝機能検査異常、腎機能異常、肝毒性、腎毒性、中枢神経系異常、ミオパチー、及び倦怠感が含まれる。例えば、血清中のアミノトランスフェラーゼレベルの増加は肝毒性又は肝機能異常を示す場合がある。例えば、ビリルビンの増加は、肝毒性又は肝機能異常を示す場合がある。

30

【0117】

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

【0118】

「特異的にハイブリダイズ可能」とは、アンチセンスオリゴヌクレオチドと標的核酸との間で、所望の効果を誘導するのに十分な相補性を有する一方、特異的結合が望まれる条件下、すなわちインビボアッセイや治療的処置の場合であれば生理的条件下で、非標的核酸にはごくわずかな効果しか示さないか、又は全く効果を示さないアンチセンス化合物を意味する。

40

【0119】

「皮下投与」とは、皮膚直下への投与を意味する。

【0120】

「標的化」又は「標的化される」とは、標的核酸に特異的にハイブリダイズして所望の効果を誘導するアンチセンス化合物の設計と選択のプロセスを意味する。

【0121】

「標的核酸」、「標的RNA」及び「標的RNA転写物」とは、いずれも、アンチセンス化合物によって標的とされ得る核酸を意味する。

【0122】

50

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

【0123】

「治療上有効量」とは、個体に治療上の利益をもたらす医薬剤の量を意味する。

【0124】

「トランスサイレチン特異的阻害剤」又は「トランスサイレチン阻害剤」とは、トランスサイレチン mRNA 又はタンパク質の発現を減少させることができる化合物を意味する。そのような化合物の例としては、核酸、ペプチド、抗体、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤などが挙げられる。

10

【0125】

「トランスサイレチン特異的調節因子」又は「トランスサイレチン調節因子」とは、トランスサイレチン mRNA 又はタンパク質の発現を増加又は減少させることができる化合物を意味する。

【0126】

「トランスサイレチン関連アミロイドーシス」、「トランスサイレチンアミロイドーシス」又は「トランスサイレチンアミロイド病」とは、本明細書において、トランスサイレチンの機能異常又は異常調節の結果、トランスサイレチンを含有するアミロイド繊維が形成されることに関連する病状又は疾患である。トランスサイレチンアミロイドーシスには、遺伝性 TTR アミロイドーシス、軟膜アミロイドーシス、家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP)、家族性アミロイド心筋症、家族性眼軟膜アミロイドーシス、老人性心アミロイドーシス又は老人性全身性アミロイドーシスが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0127】

「治療」とは、疾患、障害又は状態が変化又は改善するように、医薬組成物を投与することを意味する。

【0128】

「非修飾ヌクレオチド」とは、天然の核酸塩基、糖部分、及びヌクレオシド間結合で構成されたヌクレオチドを意味する。ある実施形態では、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）又は 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。

30

【ある実施形態】

【0129】

ある実施形態では、トランスサイレチン発現を阻害するための方法、化合物及び組成物を提供する。

【0130】

ある実施形態は、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物を提供する。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸は、以下に記載される配列のいずれかである：GENBANK アクセッション番号 NM_000371.2（本明細書に配列番号 1 として組み入れられる）、2009236~2017289 番目のヌクレオチドで切り取られた GENBANK アクセッション番号 NT_010966.10（本明細書に配列番号 2 として組み入れられる）；ヒトエクソンとの類似性に基づき、アカゲザルゲノム配列 GENBANK アクセッション番号 NW_001105671.1 から取り出したエクソン 1~4；及び、628000~638000 番目のヌクレオチドで切り取られた GENBANK アクセッション番号 NW_001105671.1（本明細書に配列番号 4 として組み入れられる）。

40

【0131】

ある実施形態は、8~80 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは配列番号 25、80、86、87、1

50

15、120、122及び124に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも8個の連続する核酸塩基を含む化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号25、80、86、87、115、120、122及び124に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも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個又は少なくとも20個の連続する核酸塩基を含む。

【0132】

ある実施形態は、12～50個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは配列番号25、80、86、87、115、120、122及び124に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも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個又は少なくとも20個の連続する核酸塩基を含む化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号25、80、86、87、115、120、122及び124に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも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個又は少なくとも20個の連続する核酸塩基を含む。

【0133】

ある実施形態は、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは配列番号25、80、86、87、115、120、122及び124に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも8個の連続する核酸塩基を含む化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号25、80、86、87、115、120、122及び124に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも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個又は少なくとも20個の連続する核酸塩基を含む。

【0134】

ある実施形態は、15～25個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは配列番号25、80、86、87、115、120、122及び124に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも8個の連続する核酸塩基を含む化合物を提供する。

【0135】

ある実施形態は、18～21個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは配列番号25、80、86、87、115、120、122及び124に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも8個の連続する核酸塩基を含む化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号25、80、86、87、115、120、122及び124に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも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個又は少なくとも20個の連続する核酸塩基を含む。

【0136】

ある実施形態は、8～80個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは配列番号25、80、86及び87に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも8個の連続する核酸塩基を含む化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号25、80

【 0 1 3 7 】

10

20

30

40

50

ある実施形態は、12～50個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチ

ドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは配列番号 80 に記載する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化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号 80 に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも 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 個又は少なくとも 20 個の連続する核酸塩基を含む。

【0143】

ある実施形態は、12～30 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは配列番号 80 に記載する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化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号 80 に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも 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 個又は少なくとも 20 個の連続する核酸塩基を含む。

10

【0144】

ある実施形態は、15～25 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは配列番号 80 に記載する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化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号 80 に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも 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 個又は少なくとも 20 個の連続する核酸塩基を含む。

20

【0145】

ある実施形態は、18～21 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは配列番号 80 に記載する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化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号 80 に記載する核酸塩基配列から選択される配列の少なくとも 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 個又は少なくとも 20 個の連続する核酸塩基を含む。

30

【0146】

ある実施形態は、20～30 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは配列番号 80 に記載する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化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号 80 に記載する核酸塩基配列の少なくとも 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 個又は少なくとも 19 個の連続する核酸塩基を含む。

【0147】

ある実施形態では、化合物は、配列番号 80 に記載する 20 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む。

40

【0148】

ある実施形態は、12～30 個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは、配列番号 1 の 120～139、212～236、226～245、293～468、293～326、347～381、425～468、425～467、452～478、452～474、459～478、461～519、462～500、500～519、501～535、502～531、505～524、507～526、508～527、514～540、514～539、515～534、516～535、523～542、544～606、544～564、564～583、578～601、580～608、580～599、584～606、5

50

85～604、587～606又は597～617番目のヌクレオチドから選択される領域内の等長の核酸塩基部分と相補的である少なくとも8個の連続する核酸塩基の部分を含む化合物を提供する。ある実施形態では、該領域は、配列番号1の507～526、508～527、515～534、516～535、580～599、585～604、587～606及び589～608から選択される。ある実施形態では、該領域は、配列番号1の501～535又は580～608から選択される。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、ここに記載する領域内で相補的な少なくとも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個又は少なくとも20個の連続する核酸塩基の部分を含む。

10

【0149】

ある実施形態は、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは、配列番号1の501～535又は580～608番目のヌクレオチドから選択される領域内の等長の核酸塩基部分と相補的である少なくとも8個の連続する核酸塩基の部分を含む化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、ここに記載する領域内で相補的な少なくとも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個又は少なくとも20個の連続する核酸塩基の部分を含む。

20

【0150】

ある実施形態は、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは、配列番号1の508～527番目のヌクレオチドから選択される領域内の等長の核酸塩基部分と相補的である少なくとも8個の連続する核酸塩基の部分を含む化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、ここに記載する領域内で相補的な少なくとも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個又は少なくとも20個の連続する核酸塩基の部分を含む。

【0151】

ある実施形態は、15～25個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは、配列番号1の507～526、508～527、515～534、516～535、580～599、585～604、587～606及び589～608番目のヌクレオチドから選択される領域内の等長の核酸塩基部分と相補的である少なくとも8個の連続する核酸塩基の部分を含む化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、ここに記載する領域内で相補的な少なくとも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個又は少なくとも20個の連続する核酸塩基の部分を含む。

30

【0152】

ある実施形態は、18～21個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは、配列番号1の507～526、508～527、515～534、516～535、580～599、585～604、587～606及び589～608番目のヌクレオチドから選択される領域内の等長の核酸塩基部分と相補的である少なくとも8個の連続する核酸塩基の部分を含む化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、ここに記載する領域内で相補的な少なくとも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個又は少なくとも20個の連続する核酸塩基の部分を含む。

40

50

【0153】

ある実施形態は、20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは、配列番号1の507～526、508～527、515～534、516～535、580～599、585～604、587～606及び589～608番目のヌクレオチドから選択される領域内の等長の核酸塩基部分と相補的である少なくとも8個の連続する核酸塩基の部分を含む化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、ここに記載する領域内で相補的な少なくとも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個又は少なくとも20個の連続する核酸塩基の部分を有する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、ヒトトランスサイレチン(TTR)をコードする核酸、例えば配列番号1と、90%、95%、99%又は100%相補的である。

10

【0154】

ある実施形態は、20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、該連結したヌクレオシドは、配列番号1の508～527番目のヌクレオチドから選択される領域内の等長の核酸塩基部分と相補的である少なくとも8個の連続する核酸塩基の部分を含む化合物を提供する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号1の508～527番目のヌクレオチドから選択される領域内の等長の部分と相補的な、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個又は少なくとも20個の連続する核酸塩基の部分を有する。ある実施形態では、該修飾オリゴヌクレオチドは、ヒトトランスサイレチン(TTR)をコードする核酸、例えば配列番号1と、90%、95%、99%又は100%相補的である。

20

【0155】

ある実施形態は、配列番号1の507～526、508～527、515～534、516～535、580～599、585～604、587～606及び589～608番目のヌクレオチドから選択される領域内で60%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

30

【0156】

ある実施形態は、配列番号1の507～526、508～527、515～534、516～535、580～599、585～604、587～606及び589～608番目のヌクレオチドから選択される領域内で70%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0157】

ある実施形態は、配列番号1の507～526、508～527、515～534、516～535、580～599、585～604、587～606及び589～608番目のヌクレオチドから選択される領域内で80%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

40

【0158】

ある実施形態は、配列番号1の507～526、508～527、515～534、516～535、580～599、585～604、587～606及び589～608番目のヌクレオチドから選択される領域内で90%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0159】

ある実施形態は、配列番号1の507～526、508～527、515～534、516～535、580～599、585～604、587～606及び589～608番目のヌクレオチドから選択される領域内で95%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

50

【0160】

ある実施形態は、配列番号1の507～526、508～527、515～534、516～535、580～599、585～604、587～606及び589～608番目のヌクレオチドから選択される領域内で99%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0161】

ある実施形態は、配列番号1の507～526、508～527、515～534、516～535、580～599、585～604、587～606及び589～608番目のヌクレオチドから選択される領域内で100%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

10

【0162】

ある実施形態は、配列番号1の508～527番目のヌクレオチド内で60%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0163】

ある実施形態は、配列番号1の508～527番目のヌクレオチド内で70%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0164】

ある実施形態は、配列番号1の508～527番目のヌクレオチド内で80%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

20

【0165】

ある実施形態は、配列番号1の508～527番目のヌクレオチド内で90%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0166】

ある実施形態は、配列番号1の508～527番目のヌクレオチド内で95%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

30

【0167】

ある実施形態は、配列番号1の508～527番目のヌクレオチド内で99%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0168】

ある実施形態は、配列番号1の508～527番目のヌクレオチド内で100%相補的な20個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0169】

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的としたアンチセンス化合物又は修飾オリゴヌクレオチドは、配列番号1の以下のヌクレオチド領域を標的とする：120～139、212～236、226～245、293～468、293～326、347～381、425～468、425～467、452～478、452～474、459～478、461～519、462～500、500～519、502～531、507～526、505～524、508～527、514～540、514～539、515～534、516～535、523～542、544～606、544～564、564～583、578～601、580～599、584～606、585～604、587～606、又は597～617。

40

【0170】

ある実施形態では、アンチセンス化合物又は修飾オリゴヌクレオチドは、トランスサイ

50

レチン核酸の一領域を標的とする。ある実施形態では、そのようなトランスサイレチン核酸の一領域を標的とした化合物又はオリゴヌクレオチドは、該領域の等長の核酸塩基部分に相補的な、連続する核酸塩基部分を有する。該部分は、例えば、ここに記載する領域の等長の部分に相補的な、少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の連続する核酸塩基の部分となり得る。ある実施形態では、そのような化合物又はオリゴヌクレオチドは、配列番号1の以下のヌクレオチド領域を標的とする：120～139、212～236、226～245、293～381、293～366、353～381、293～468、425～468、425～467、452～476、461～481、461～500、500～519、461～519、502～531、502～539、504～536、505～525、506～530、507～527、508～527、508～536、514～540、523～542、544～606、544～564、544～583、又は597～617。

10

【0171】

ある実施形態では、そのようなトランスサイレチン核酸の一領域を標的とした化合物又はオリゴヌクレオチドは、配列番号1の501～535又は580～608の領域の等長の核酸塩基部分に相補的な、連続する核酸塩基部分を有する。

【0172】

ある実施形態では、配列番号1の以下のヌクレオチド領域は、アンチセンス化合物又はオリゴヌクレオチドの標的とされた場合、少なくとも60%の阻害を示す：226～245、293～366、357～467、452～474、457～476、459～478、462～500、500～519、502～531、504～536、505～525、506～530、507～527、508～527、508～536、514～539、544～564、564～583、578～601、584～606、又は597～617。

20

【0173】

ある実施形態では、配列番号1の以下のヌクレオチド領域は、アンチセンス化合物又はオリゴヌクレオチドの標的とされた場合、少なくとも65%の阻害を示す：293～366、357～376、425～449、432～467、452～474、459～478、462～500、500～519、502～531、504～536、505～525、506～530、507～527、508～527、508～536、514～539、544～563、564～583、578～601、585～606、又は597～617。

30

【0174】

ある実施形態では、配列番号1の以下のヌクレオチド領域は、アンチセンス化合物又はオリゴヌクレオチドの標的とされた場合、少なくとも70%の阻害を示す：293～366、425～449、432～467、452～474、459～478、462～500、500～519、502～531、504～536、505～525、506～530、507～527、508～527、508～536、514～539、564～583、578～598、581～600、又は597～617。

【0175】

ある実施形態では、配列番号1の以下のヌクレオチド領域は、アンチセンス化合物又はオリゴヌクレオチドの標的とされた場合、少なくとも75%の阻害を示す：293～322、347～366、425～449、432～467、452～474、459～478、462～500、500～519、503～531、504～536、505～525、506～530、507～527、508～527、508～536、514～539、578～598、581～600、又は597～616。

40

【0176】

ある実施形態では、配列番号1の以下のヌクレオチド領域は、アンチセンス化合物又はオリゴヌクレオチドの標的とされた場合、少なくとも80%の阻害を示す：303～322、425～449、432～460、443～467、452～473、481～50

50

0、500～519、503～531、504～536、505～525、506～530、507～527、508～527、508～536、514～536、519～539、579～598、581～600、又は597～616。

【0177】

ある実施形態では、配列番号1の以下のヌクレオチド領域は、アンチセンス化合物又はオリゴヌクレオチドの標的とされた場合、少なくとも85%の阻害を示す：427～449、432～458、441～460、443～467、452～473、504～531、504～536、505～525、506～530、507～527、508～527、508～536、514～536、519～539、又は581～600。

【0178】

ある実施形態では、配列番号1の以下のヌクレオチド領域は、アンチセンス化合物又はオリゴヌクレオチドの標的とされた場合、少なくとも90%の阻害を示す：428～449、432～456、439～458、441～460、445～466、452～473、504～525、508～527、又は515～536

【0179】

ある実施形態では、配列番号1の以下のヌクレオチド領域は、アンチセンス化合物又はオリゴヌクレオチドの標的とされた場合、少なくとも95%の阻害を示す：434～453、436～456、441～460、445～465、505～524、又は516～535。

【0180】

ある実施形態では、以下のアンチセンス化合物は、ヒトトランスサイレチンをコードする核酸である配列番号1の一領域を標的とし、トランスサイレチンmRNAの少なくとも60%の阻害を示す：ISIS番号420954、420904、304286、420874、420948、420883、420955、420952、420956、420957、420882、420947、420950、304312、304307、420879、420910、420902、420908、420924、420877、420880、304309、304289、420906、304311、420878、420911、304284、304288、420909、304296、420949、304290、304299、420898、420920、420925、420951、304287、420894、420916、420918、420926、304285、420919、420923、420886、420900、420912、420915、420917、420921、420884、420885、420887、420889、420892、420901、420914、420897、420899、420888、420895、420896、420913、420922、420893、420890、又は420891。

【0181】

ある実施形態では、以下のアンチセンス化合物は、ヒトトランスサイレチンをコードする核酸である配列番号1の一領域を標的とし、トランスサイレチンmRNAの少なくとも65%の阻害を示す：ISIS番号420955、420952、420956、420957、420882、420947、420950、304312、304307、420879、420910、420902、420908、420924、420877、420880、304309、304289、420906、304311、420878、420911、304284、304288、420909、304296、420949、304290、304299、420898、420920、420925、420951、304287、420894、420916、420918、420926、304285、420919、420923、420886、420900、420912、420915、420917、420921、420884、420885、420887、420889、420892、420901、420914、420897、420899、420888、420895、420896、420913、420922、420893、420890、又は420891。

10

20

30

40

50

【0182】

ある実施形態では、以下のアンチセンス化合物は、ヒトトランスサイレチンをコードする核酸である配列番号1の一領域を標的とし、トランスサイレチンmRNAの少なくとも70%の阻害を示す：ISIS番号304312、304307、420879、420910、420902、420908、420924、420877、420880、304309、304289、420906、304311、420878、420911、304284、304288、420909、304296、420949、304290、304299、420898、420920、420925、420951、304287、420894、420916、420918、420926、304285、420919、420923、420886、420900、420912、420915、420917、420921、420884、420885、420887、420889、420892、420901、420914、420897、420899、420888、420895、420896、420913、420922、420893、420890、又は420891。

10

【0183】

ある実施形態では、以下のアンチセンス化合物は、ヒトトランスサイレチンをコードする核酸である配列番号1の一領域を標的とし、トランスサイレチンmRNAの少なくとも75%の阻害を示す：ISIS番号420877、420878、420880、304284、304285、420884、420885、420886、420887、420888、420889、420890、420891、304287、420892、304288、420893、304289、304290、420894、420895、420896、420897、420898、420899、420900、420901、420902、420906、420908、304296、420909、420911、420912、420913、420914、304299、420915、420916、420917、420918、420919、420920、420921、420922、420923、420924、420925、420926、304309、420949、420951、又は304311。

20

【0184】

ある実施形態では、以下のアンチセンス化合物は、ヒトトランスサイレチンをコードする核酸である配列番号1の一領域を標的とし、トランスサイレチンmRNAの少なくとも80%の阻害を示す：ISIS番号304311、420878、420911、304284、304288、420909、304296、420949、304290、304299、420898、420920、420925、420951、304287、420894、420916、420918、420926、304285、420919、420923、420886、420900、420912、420915、420917、420921、420884、420885、420887、420889、420892、420901、420914、420897、420899、420888、420895、420896、420913、420922、420893、420890、又は42089。

30

【0185】

ある実施形態では、以下のアンチセンス化合物は、ヒトトランスサイレチンをコードする核酸である配列番号1の一領域を標的とし、トランスサイレチンmRNAの少なくとも85%の阻害を示す：ISIS番号304290、304299、420898、420920、420925、420951、304287、420894、420916、420918、420926、304285、420919、420923、420886、420900、420912、420915、420917、420921、420884、420885、420887、420889、420892、420901、420914、420897、420899、420888、420895、420896、420913、420922、420893、420890、又は420891。

40

【0186】

50

ある実施形態では、以下のアンチセンス化合物は、ヒトトランスサイレチンをコードする核酸である配列番号1の一領域を標的とし、トランスサイレチンmRNAの少なくとも90%の阻害を示す：ISIS番号420923、420886、420900、420912、420915、420917、420921、420884、420885、420887、420889、420892、420901、420914、420897、420899、420888、420895、420896、420913、420922、420893、420890、又は420891。

【0187】

ある実施形態では、以下のアンチセンス化合物は、ヒトトランスサイレチンをコードする核酸である配列番号1の一領域を標的とし、トランスサイレチンmRNAの少なくとも95%の阻害を示す：ISIS番号420888、420895、420896、420913、420922、420893、420890、又は420891。

【0188】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の120～139番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の120～139番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号37から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の120～139番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、ISIS番号420872から選択される。

【0189】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の212～236番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の212～236番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号8及び38から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の212～236番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、ISIS番号420873又は304267から選択される。

【0190】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の226～245番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の226～245番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号39から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の226～245番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、ISIS番号420874から選択される。

【0191】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の293～381番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の293～381番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号10、42～48から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の293～381番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、ISIS番号420877、420878、420879、420880、304280、420881、420882、又は420883から選択される。

【0192】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の293～366番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の293～366番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号42～45から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の293～366番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、ISIS番号420877、420878、420879、又は420880から選択される。

【0193】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の353～381番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の353～381番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号10、46～48から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の353～381番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号304280、420881、420882、又は420883から選択される。

【0194】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の293～468番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の293～468番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号10～18、42～63から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の293～468番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号420877、420878、420879、420880、304280、420881、420882、420883、304284、304285、420884、420885、304286、420886、420887、420888、420889、420890、420891、304287、420892、304288、420893、304289、304290、420894、420895、420896、420897、420898、又は304291から

10

20

【0195】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の425～468番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の425～468番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号11～18、49～63から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の425～468番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号304284、304285、420884、420885、304286、420886、420887、420888、420889、420890、420891、304287、420892、304288、420893、304289、304290、420894、420895、420896、420897、420898、又は304291から選択される。

30

【0196】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の425～467番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の425～468番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号11～17、49～63から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の425～468番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号304284、304285、420884、420885、304286、420886、420887、420888、420889、420890、420891、304287、420892、304288、420893、304289、304290、420894、420895、420896、420897、又は420898から選択される。

40

【0197】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の452～476番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の452～476番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号64～69から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の452～476番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号420889、420890、420891、30428

50

7、420892、304288、420893、304289、304290、420894、420895、420896、420897、420898、304291、304292、304293、420899、420900、420901、420902、420903、又は420904から選択される。

【0198】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の461～481番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の461～481番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号72～73から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の461～481番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号420907又は420908から選択される。

10

【0199】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の461～500番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の461～500番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号22、72及び73から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の461～500番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号420907、420908、又は304296から選択される。

【0200】

20

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の500～519番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の500～519番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号74から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の500～519番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号420909から選択される。

【0201】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の461～519番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の461～519番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号22、23、72～74から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の461～519番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号420907、420908、304296、又は420909から選択される。

30

【0202】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の502～531番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の502～531番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号25、75～84から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の502～531番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号420910、420911、420912、420913、420914、304299、420915、420916、420917、420918、又は420919から選択される。

40

【0203】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の502～539番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の502～539番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号25、26、75～91から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の502～539番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号420910、420911、420912

50

、420913、420914、304299、420915、420916、420917、420918、420919、304300、420920、420921、420922、420923、420924、420925、又は420926から選択される。

【0204】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の504～536番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の504～536番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号25、26、77～88から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の504～536番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号420912、420913、420914、304299、420915、420916、420917、420918、420919、304300、420920、420921、420922、又は420923から選択される。

10

【0205】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の505～535番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の505～535番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号25、26、78～87から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の505～535番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号420913、420914、304299、420915、420916、420917、420918、420919、304300、420920、420921、又は420922から選択される。

20

【0206】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の506～530番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の506～530番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号25、79～83から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の506～530番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号420913、420914、304299、420915、420916、420917、420918、又は420919から選択される。

30

【0207】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の507～527番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の507～527番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号25又は80から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の507～527番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号304299又は420915から選択される。

【0208】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の508～527番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の508～527番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号80から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号1の508～527番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S番号420915から選択される。

40

【0209】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号1の514～540番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号1の514～540番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチ

50

センス化合物は、配列番号 85～92 から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号 1 の 514～540 番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S 番号 420920、420921、420922、420923、420924、420925、420926、又は 420927 から選択される。

【0210】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号 1 の 523～542 番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号 1 の 523～542 番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号 94 から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号 1 の 523～542 番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S 番号 420929 から選択される。

10

【0211】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号 1 の 544～606 番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号 1 の 544～606 番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号 30～33、112～122 から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号 1 の 544～606 番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S 番号 420947、420948、304304、304307、304308、304309、420949、420950、420951、420952、420953、420954、420955、420956、又は 420957 から選択される。

20

【0212】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号 1 の 544～564 番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号 1 の 544～564 番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号 112～113 から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号 1 の 544～564 番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S 番号 420947 又は 420948 から選択される。

【0213】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号 1 の 544～583 番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号 1 の 544～583 番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号 30、31、112、及び 113 から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号 1 の 544～583 番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S 番号 420947、420948、304304、又は 304307 から選択される。

30

【0214】

ある実施形態では、標的領域は、配列番号 1 の 597～617 番目のヌクレオチドである。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、配列番号 1 の 597～617 番目のヌクレオチドを標的とする。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、配列番号 34～35 から選択される核酸塩基配列を含む。特定のそのような実施形態では、配列番号 1 の 597～617 番目のヌクレオチドを標的とするアンチセンス化合物は、I S I S 番号 304311 又は 304312 から選択される。

40

【0215】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、一本鎖修飾オリゴヌクレオチドからなる。

【0216】

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、20 個の連結したヌクレオシドからなる。

【0217】

50

ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、その全長にわたり、配列番号 1、2、又は 4 の核酸塩基配列と少なくとも 90% 相補的である。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、その全長にわたり、配列番号 1、2、又は 4 の核酸塩基配列と少なくとも 95% 相補的である。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、その全長にわたり、配列番号 1、2、又は 4 と少なくとも 99% 相補的である。ある実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドの核酸塩基配列は、その全長にわたり、配列番号 1、2、又は 4 の核酸塩基配列と 100% 相補的である。

【0218】

ある実施形態では、化合物は、少なくとも一つの修飾ヌクレオシド間結合を有する。ある実施形態では、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。

10

【0219】

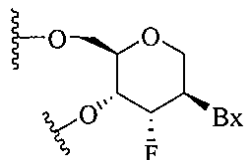
ある実施形態では、化合物は、修飾糖を含むヌクレオシドを少なくとも一つ有する。ある実施形態では、該少なくとも一つの修飾糖は二環式糖である。ある実施形態では、該少なくとも一つの二環式糖は、4'-CH(CH₃)-O-2' 架橋を含む。ある実施形態では、該少なくとも一つの修飾糖は、2'-O-メトキシエチルを含む。

【0220】

ある実施形態では、化合物は、フラノース環がテトラヒドロピラン環に置換されたテトラヒドロピラン修飾ヌクレオシドの少なくとも一つを、少なくとも一つ含む。ある実施形態では、該少なくとも一つのテトラヒドロピラン修飾ヌクレオシドは、下記の構造を有する：

20

【化1】



式中、B x は、保護されていてもよいヘテロ環塩基部分を表す。

【0221】

ある実施形態では、化合物は、修飾核酸塩基を含むヌクレオシドを少なくとも一つ有する。ある実施形態では、該修飾核酸塩基は、5-メチルシトシンである。

30

【0222】

ある実施形態では、化合物の修飾オリゴヌクレオチドは、
 (i) 連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント；
 (ii) 連結したヌクレオシドからなる 5' ウイングセグメント；
 (iii) 連結したヌクレオシドからなる 3' ウイングセグメント
 を含み、ギャップセグメントは 5' ウイングセグメントと 3' ウイングセグメントの間に位置し、また、それぞれのウイングセグメントの各ヌクレオシドは修飾糖を含む。

【0223】

ある実施形態では、化合物の修飾オリゴヌクレオチドは、
 (i) 10 個の連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント；
 (ii) 5 個の連結したヌクレオシドからなる 5' ウイングセグメント；
 (iii) 5 個の連結したヌクレオシドからなる 3' ウイングセグメント
 を含み、ギャップセグメントは 5' ウイングセグメントと 3' ウイングセグメントの間に直接隣接して位置し、それぞれのウイングセグメントの各ヌクレオシドは 2'-O-メトキシエチル糖を含み；また、各ヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合である。

40

【0224】

ある実施形態では、化合物の修飾オリゴヌクレオチドは、
 (i) 8 個の連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント；
 (ii) 6 個の連結したヌクレオシドからなる 5' ウイングセグメント；

50

(i i i) 6 個の連結し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の間に直接隣接して位置し、それぞれの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；また、各ヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合である。

【0225】

ある実施形態では、化合物の修飾オリゴヌクレオチドは、

(i) 8 個の連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント；

(i i) 5 個の連結したヌクレオシドからなる 5' ウィングセグメント；

(i i i) 5 個の連結し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の間に直接隣接して位置し、それぞれの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；また、各ヌクレオシド間結合はホスホロチオエート結合である。

10

【0226】

ある実施形態では、化合物の修飾オリゴヌクレオチドは、

(i) 10 個の連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント；

(i i) 5 個の連結したヌクレオシドからなる 5' ウィングセグメント；

(i i i) 5 個の連結し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の間に直接隣接して位置し、それぞれの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；また、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；また、核酸塩基配列は、配列番号 80 に記載する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。

20

【0227】

ある実施形態では、化合物の修飾オリゴヌクレオチドは、

(i) 10 個の連結したデオキシヌクレオシドからなるギャップセグメント；

(i i) 5 個の連結したヌクレオシドからなる 5' ウィングセグメント；

(i i i) 5 個の連結し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の間に直接隣接して位置し、それぞれの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；また、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；また、核酸塩基配列は、配列番号 80 に記載する配列である。

30

【0228】

ある実施形態は、本明細書に記載する化合物又はその塩、及び薬学的に許容される担体又は希釈剤を含む組成物を提供する。ある実施形態では、組成物は、12～30 個の連結したヌクレオシドからなり、配列番号 25、80、86、87、115、120、122、及び 124 に記載する核酸塩基配列から選択される核酸塩基配列の少なくとも 12 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチド又はその塩、及び薬学的に許容される担体又は希釈剤を含む。

【0229】

ある実施形態は、本明細書に記載する化合物又はその塩、及び薬学的に許容される担体又は希釈剤を含む組成物を提供する。ある実施形態では、組成物は、12～30 個の連結したヌクレオシドからなり、配列番号 80 に記載する核酸塩基配列の少なくとも 12 個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチド又はその塩、及び薬学的に許容される担体又は希釈剤を含む。

40

【0230】

ある実施形態は、本明細書に記載する化合物を含み、粘度レベルが 40 cP 未満である組成物を提供する。ある実施形態では、組成物の粘度レベルは 15 cP 未満である。ある実施形態では、組成物の粘度レベルは 12 cP 未満である。ある実施形態では、組成物の粘度レベルは 10 cP 未満である。

【0231】

50

ある実施形態は、トランスサイレチンアミロイドーシスの治療、予防、改善の方法を提供する。

【0232】

ある実施形態は、本明細書に記載する化合物を動物に投与することを含む方法を提供する。ある実施形態では、該方法は、12～30個の連結したヌクレオシドからなり、配列番号25、80、86、87、115、120、122、及び124に記載する核酸塩基配列から選択される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修飾オリゴヌクレオチドを、動物に投与することを含む。

【0233】

ある実施形態は、本明細書に記載する化合物を動物に投与することを含む方法を提供する。ある実施形態では、該方法は、12～30個の連結したヌクレオシドからなり、該連結したヌクレオシドは配列番号1の501～535又は580～608番目のヌクレオチドから選択される領域内の等長の部分と相補的な少なくとも8個の連続する核酸塩基部分を含む化合物又は修飾オリゴヌクレオチドを、動物に投与することを含む。

10

【0234】

ある実施形態は、本明細書に記載する化合物を動物に投与することを含む方法を提供する。ある実施形態では、該方法は、12～30個の連結したヌクレオシドからなり、配列番号80に記載する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修飾オリゴヌクレオチドを、動物に投与することを含む。

【0235】

20

ある実施形態は、本明細書に記載する化合物を動物に投与することを含む方法を提供する。ある実施形態では、該方法は、12～30個の連結したヌクレオシドからなり、該連結したヌクレオシドは配列番号1の508～527番目のヌクレオチドから選択される領域内の等長の部分と相補的な少なくとも8個の連続する核酸塩基部分を含む化合物又は修飾オリゴヌクレオチドを、動物に投与することを含む。

【0236】

ある実施形態では、動物はヒトである。

【0237】

ある実施形態では、投与は、本明細書に記載するトランスサイレチンアミロイドーシスの進行を予防、治療、改善、又は遅延する。

30

【0238】

ある実施形態では、化合物は、第2の薬剤と共投与される。

【0239】

ある実施形態では、化合物と第2の薬剤は、併用して投与される。

【0240】

ある実施形態では、投与は非経口投与である。ある実施形態では、非経口投与は皮下投与である。ある実施形態では、投与のための製剤は、食塩水中の化合物である。ある実施形態では、化合物は、12～30個の連結したヌクレオシドからなり、配列番号25、80、86、87、115、120、122、及び124に記載する核酸塩基配列から選択される核酸塩基配列の少なくとも12個の連続する核酸塩基を含む核酸塩基配列を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む。ある実施形態では、製剤は、安定剤、又は脂質剤を含む付加的な安定剤を含まない。

40

【0241】

ある実施形態では、投与は非経口投与である。ある実施形態では、非経口投与は頭蓋内投与である。ある実施形態では、頭蓋内投与は、脳内投与、髄腔内投与、室内投与、室投与、内脳室投与、脳室内投与、脳室投与である。

【0242】

ある実施形態は、さらに、動物におけるトランスサイレチンmRNA又はタンパク質の発現を減少させるために本明細書に記載する化合物又は組成物を動物に投与することを含む、動物におけるトランスサイレチンmRNA又はタンパク質の発現を減少させる方法を

50

提供する。ある実施形態では、動物はヒトである。ある実施形態では、トランスサイレチンmRNA又はタンパク質の発現の減少は、トランスサイレチンアミロイドーシスの進行を予防、治療、改善、又は遅延する。

【0243】

ある実施形態は、トランスサイレチン関連疾患を有するヒトを特定し、該ヒトに本明細書に記載する治療上有効量の化合物又は組成物を投与することを含む、トランスサイレチン関連疾患を有するヒトの治療方法を提供する。ある実施形態では、治療は、以下からなる群から選択される症状を緩和する：不穏、協調運動障害、眼振、痙性対麻痺、筋協調障害、視覚障害、不眠症、異常感覚、ミオクロヌス、失明、失語症、手根管症候群、発作、くも膜下出血、脳卒中及び脳内出血、水頭症、運動失調、痙性麻痺、昏睡、感覚性ニューロパチー、知覚異常、感覚鈍麻、運動ニューロパチー、自律神経ニューロパチー、起立性低血圧、反復性便秘、反復性下痢、嘔気、嘔吐、発汗減少、性交不能、胃排出遅延、尿閉、尿失禁、進行性心疾患、疲労、息切れ、体重減少、食欲不振、知覚麻痺、刺痛、脱力、舌肥大、ネフローゼ症候群、鬱血性心不全、労作性呼吸困難、末梢性浮腫、不整脈、動悸、朦朧状態、失神、体位性低血圧、末梢神経疾患、感覚運動障害、下肢ニューロパチー、上肢ニューロパチー、痛覚過敏、温度感覚異常、下肢脱力、悪液質、末梢性浮腫、肝腫大、紫斑、拡張機能障害、心室性期外収縮、脳ニューロパチー、深部腱反射減弱、硝子体のアミロイド沈着、硝子体混濁、ドライアイ、緑内障、瞳孔における波状の外見、水分貯留による足の浮腫。ある実施形態では、症状は、以下からなる群から選択される認知症状である：記憶障害、判断力障害、思考障害、計画力障害、柔軟性障害、抽象的思考障害、ルール獲得力障害、適切な行動を取る能力の障害、不適切な行動を抑制する能力の障害、短期記憶障害、長期記憶障害、偏執病、見当識障害、錯乱、幻覚、及び痴呆。ある実施形態では、症状は、以下からなる群から選択される精神症状である：痴呆；不安、抑鬱、情動鈍麻、自己中心性、攻撃性、強迫行動、被刺激性、人格変化（記憶障害、判断力障害及び思考障害を含む）、及び自殺念慮。

10

20

【0244】

さらなる実施形態は、心アミロイドーシスを引き起こすトランスサイレチンアミロイドーシスを有するヒトに治療を行い、本明細書に記載する治療上有効量の化合物又は組成物を該ヒトに投与する方法を提供する。ある実施形態では、治療は、以下からなる群から選択される症状を緩和する：鬱血性心不全、心肥大、労作性呼吸困難、末梢性浮腫、不整脈、動悸、朦朧状態、失神、重度の体位性低血圧を引き起こし得る末梢血管系の内皮下層内の沈着、拡張機能障害、心ブロック、心室性期外収縮、及び種々の頻脈性不整脈。

30

【0245】

さらなる実施形態は、末梢性神経障害を引き起こすトランスサイレチンアミロイドーシスを有するヒトに治療を行い、本明細書に記載する治療上有効量の化合物又は組成物を該ヒトに投与する方法を提供する。ある実施形態では、治療は、以下からなる群から選択される症状を緩和する：末梢神経疾患、感覚運動障害、下肢ニューロパチー、上肢ニューロパチー、痛覚過敏、温度感覚異常、下肢脱力、疼痛、しばしば性機能障害又は泌尿器機能障害として現れる自律神経機能障害、対称感覚障害及び減弱、起立性低血圧、下痢、及び／又は性交不能。

40

【0246】

さらなる実施形態は、消化器疾患を引き起こすトランスサイレチンアミロイドーシスを有するヒトに治療を行い、本明細書に記載する治療上有効量の化合物又は組成物を該ヒトに投与する方法を提供する。ある実施形態では、治療は、以下からなる群から選択される症状を緩和する：下痢、便秘、嘔気、嘔吐、及び関連する腎障害及び肝障害。

【0247】

さらに、本明細書に記載する治療上有効量の化合物又は組成物をヒトに投与し、それによりトランスサイレチンアミロイドーシスを緩和又は予防することを含む、トランスサイレチンアミロイドーシスの緩和又は予防の方法を提供する。

【0248】

50

さらに、本明細書に記載する治療上有効量の化合物又は組成物をヒトに投与し、それにより心疾患を緩和又は予防することを含む、心疾患の緩和又は予防の方法を提供する。さらに、本明細書に記載する治療上有効量の化合物又は組成物をヒトに投与し、それにより神経疾患を緩和又は予防することを含む、神経疾患の緩和又は予防の方法を提供する。さらに、本明細書に記載する治療上有効量の化合物又は組成物をヒトに投与し、それにより消化器疾患を緩和又は予防することを含む、消化器疾患の緩和又は予防の方法を提供する。

【0249】

さらに、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1、2、又は4に特異的にハイブリダイズする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を、それを必要とするヒトに投与し、それによりヒトにおけるトランスサイレチンアミロイドーシスの症状を改善することを含む、トランスサイレチンアミロイドーシスの症状を改善する方法を提供する。

10

【0250】

さらに、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1、2、又は4に特異的にハイブリダイズする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を、それを必要とするヒトに投与し、それによりヒトにおけるトランスサイレチンアミロイドーシスの症状の進行速度を遅らせることを含む、トランスサイレチンアミロイドーシスに関連する症状の進行速度を遅らせる方法を提供する。

20

【0251】

さらに、12～30個の連結したヌクレオシドからなる修飾オリゴヌクレオチドであって、配列番号1、2、又は4に特異的にハイブリダイズする修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を、それを必要とするヒトに投与し、それによりヒトにおけるトランスサイレチンアミロイド病の症状が示す変性を後退させる、トランスサイレチンアミロイドーシスに関連する症状が示す変性を後退させる方法を提供する。

【0252】

さらに、12～30個の連結したヌクレオシドからなり、配列番号80に記載する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修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を、それを必要とするヒトに投与し、それによりヒトにおけるトランスサイレチンアミロイドーシスの症状を改善することを含む、トランスサイレチンアミロイドーシスの症状を改善する方法を提供する。

30

【0253】

さらなる実施形態は、12～30個の連結したヌクレオシドからなり、配列番号80に記載する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修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を、それを必要とするヒトに投与し、それによりヒトにおけるトランスサイレチンアミロイドーシスの治療を行う、トランスサイレチンアミロイドーシスを有するヒトの治療方法を提供する。

【0254】

ある実施形態では、症状は、身体症状、認知症状、精神症状、又は周辺症状である。ある実施形態では、症状は、以下からなる群から選択される身体症状である：不穏、協調運動障害、眼振、痙性対麻痺、筋協調障害、視覚障害、不眠症、異常感覚、ミオクロヌス、失明、失語症、手根管症候群、発作、くも膜下出血、脳卒中及び脳内出血、水頭症、運動失調、痙性麻痺、昏睡、感覚性ニューロパチー、知覚異常、感覚鈍麻、運動ニューロパチー、自律神経ニューロパチー、起立性低血圧、反復性便秘、反復性下痢、嘔気、嘔吐、発汗減少、性交不能、胃排出遅延、尿閉、尿失禁、進行性心疾患、疲労、息切れ、体重減少、食欲不振、知覚麻痺、刺痛、脱力、舌肥大、ネフローゼ症候群、鬱血性心不全、労作性呼吸困難、末梢性浮腫、不整脈、動悸、朦朧状態、失神、体位性低血圧、末梢神経疾患、感覚運動障害、下肢ニューロパチー、上肢ニューロパチー、痛覚過敏、温度感覚異常、下肢脱力、悪液質、末梢性浮腫、肝腫大、紫斑、拡張機能障害、心室性期外収縮、脳ニューロパチー、深部腱反射減弱、硝子体のアミロイド沈着、硝子体混濁、ドライアイ、緑内

40

50

障、瞳孔における波状の外見、水分貯留による足の浮腫。

【0255】

ある実施形態では、症状は、以下からなる群から選択される認知症状である：記憶障害、判断力障害、思考障害、計画力障害、柔軟性障害、抽象的思考障害、ルール獲得力障害、適切な行動を取る能力の障害、不適切な行動を抑制する能力の障害、短期記憶障害、長期記憶障害、偏執病、見当識障害、錯乱、幻覚、及び痴呆。ある実施形態では、症状は、以下からなる群から選択される精神症状である：痴呆；不安、抑鬱、情動鈍麻、自己中心性、攻撃性、強迫行動、被刺激性、人格変化（記憶障害、判断力障害及び思考障害を含む）、及び自殺念慮。

【0256】

10

ある実施形態では、症状は、少なくとも一つの身体症状、少なくとも一つの認知症状、少なくとも一つの精神症状、及び少なくとも一つの周辺症状の少なくとも一つである。

【0257】

ある実施形態では、身体症状は以下からなる群から選択される：不穏、協調運動障害、無意識的に起きる動作、無意識的に中断される動作、歩行不安定、舞踏病、固縮、苦悶動作、異常肢位、不安定性、異常顔貌、咀嚼困難、嚥下困難、発話困難、発作、及び睡眠障害。

【0258】

ある実施形態では、認知症状は以下からなる群から選択される：記憶障害、判断力障害、思考障害、計画力障害、柔軟性障害、抽象的思考障害、ルール獲得力障害、適切な行動を取る能力の障害、不適切な行動を抑制する能力の障害、短期記憶障害、長期記憶障害、偏執病、見当識障害、錯乱、幻覚、及び痴呆。

20

【0259】

ある実施形態では、精神症状は以下からなる群から選択される：痴呆；不安、抑鬱、情動鈍麻、自己中心性、攻撃性、強迫行動、被刺激性、人格変化（記憶障害、判断力障害及び思考障害を含む）、及び自殺念慮。

【0260】

ある実施形態では、周辺症状は以下からなる群から選択される：脳質量減少、筋萎縮、心不全、耐糖能障害、体重減少、骨粗鬆症、及び精巣萎縮。

【0261】

30

また、中枢神経系関連疾患の治療、予防、又は改善のための薬剤を調製するための方法及び化合物も提供する。

【0262】

ある実施形態は、トランスサイレチンアミロイドーシスの治療、改善、又は予防のための薬剤の製造における、本明細書に記載する化合物の使用を提供する。

【0263】

ある実施形態は、本明細書に記載する付加的な薬剤又は療法との併用療法による、本明細書に記載するトランスサイレチンアミロイドーシスの治療、予防、又は改善における使用のための、本明細書に記載する化合物を提供する。薬剤又は療法は、共投与又は併用して投与することができる。

40

【0264】

ある実施形態は、本明細書に記載する付加的な薬剤又は療法との併用療法による、本明細書に記載するトランスサイレチンアミロイドーシスの治療、予防、又は改善のための薬剤の製造における、本明細書に記載する化合物の使用を提供する。薬剤又は療法は、共投与又は併用して投与することができる。

【0265】

ある実施形態は、本明細書に記載する付加的な薬剤又は療法の投与をそれに続いて受ける患者での本明細書に記載するトランスサイレチンアミロイドーシスの治療、予防、又は改善のための薬剤の製造における、本明細書に記載する化合物の使用を提供する。

【0266】

50

ある実施形態は、本明細書に記載するトランスサイレチンアミロイドーシスの治療、予防、又は改善のためのキットであって、

(i) 本明細書に記載する化合物；及び、選択的に、

(ii) 本明細書に記載する付加的な薬剤又は療法を含むキットを提供する。

【0267】

本明細書に記載するキットは、さらに、本明細書に記載する併用療法により本明細書に記載するトランスサイレチンアミロイドーシスを治療、予防、又は改善するための該キットの使用の説明を含む場合がある。

【0268】

アンチセンス化合物

オリゴマー化合物には、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオチド模倣剤、アンチセンス化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、及び siRNA が含まれるが、これらに限定されない。オリゴマー化合物は、標的核酸に対して「アンチセンス」、すなわち、水素結合を介して標的核酸にハイブリダイゼーションすることができる場合がある。

【0269】

ある実施形態では、アンチセンス化合物は、5' から 3' への方

【0270】

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、12～30 個のヌクレオチドの長さである。言い換えれば、アンチセンス化合物は、12～30 個の連結した核酸塩基である。その他の実施形態では、アンチセンス化合物は、8～80、12～50、12～30、15～30、18～24、18～21、19～22、又は 20 個の連結した核酸塩基からなる修飾オリゴヌクレオチドを含む。特定のそのような実施形態では、アンチセンス化合物は、長さが 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、又は 80 個、又は前記個数のうちのいずれか 2 つによって定められる範囲である、連結した核酸塩基からなる修飾オリゴヌクレオチドを含む。

【0271】

ある実施形態では、アンチセンス化合物は、短縮又は切断された修飾オリゴヌクレオチドを含む。短縮又は切断された修飾オリゴヌクレオチドは、1 つのヌクレオシドが、5' 端から欠失（5' 切断）、あるいは 3' 端から欠失（3' 切断）している。短縮又は切断された修飾オリゴヌクレオチドは、5' 端から 2 つのヌクレオシドが欠失していてもよく、あるいは、3' 端から 2 つのサブユニットが欠失していてもよい。あるいは、欠失するヌクレオシドは修飾オリゴヌクレオチド中に分散していてもよく、例えば、5' 端から 1 つのヌクレオシドが欠失し、3' 端から 1 つのヌクレオシドが欠失したアンチセンス化合物がある。

【0272】

延長されたオリゴヌクレオチドで 1 つの付加ヌクレオシドが存在する場合、付加ヌクレオシドは、オリゴヌクレオチドの 5' 端又は 3' 端に位置することができる。2 つ以上の付加ヌクレオシドが存在する場合、付加ヌクレオシドは互いに隣接してもよく、例えば、2 つのヌクレオシドがオリゴヌクレオチドの 5' 端に付加（5' 付加）、あるいは、3'

10

20

30

40

50

端に付加（3'付加）したオリゴヌクレオチドがある。あるいは、付加ヌクレオシドは、アンチセンス化合物中に分散していてもよく、例えば、5'端に1つのヌクレオシドが付加し、3'端に1つのサブユニットが付加したオリゴヌクレオチドがある。

【0273】

アンチセンスオリゴヌクレオチドなどのアンチセンス化合物は、活性を消失することなく、その長さを増加又は減少させ、及び／又は、ミスマッチ塩基を導入することが可能である。例えば、Woelfら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992）では、13～25核酸塩基長の一連のアンチセンスオリゴヌクレオチドについて、卵母細胞注射モデルにおける標的RNAの開裂を誘導する能力が試験されている。アンチセンスオリゴヌクレオチドの末端近くに8又は11個のミスマッチ塩基を有する25核酸塩基長のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ミスマッチを含有しないアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも低い程度ではあるが、標的mRNAの特異的開裂を誘導可能であった。同様に、標的の特異的な開裂は、1又は3個のミスマッチを有するものを含む13核酸塩基長のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることでも達成されている。

10

【0274】

Gautschiら（J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, March 2001）では、bcl-2 mRNAに対して100%の相補性を有し、かつbcl-xL mRNAに対して3個のミスマッチを有するオリゴヌクレオチドは、インビトロ及びインビボで、bcl-2とbcl-xLの両方の発現を減少させることが示されている。さらに、このオリゴヌクレオチドは、インビボで強い抗腫瘍活性を示している。

20

【0275】

Maher and Dolnick（Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988）では、一連の縦列型14核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチド、及びそれぞれ2又は3個の縦列型アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列で構成される28及び42核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドについて、ウサギ網状赤血球アッセイにおいて、ヒトDHFRの翻訳を停止させる能力が試験されている。3つの14核酸塩基アンチセンスオリゴヌクレオチドは、28又は42核酸塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドよりも低いレベルではあるが、それぞれ単独で翻訳の阻害が可能であった。

【0276】

アンチセンス化合物モチーフ

30

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とす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、又はインビボでのヌクレアーゼによる分解への耐性などの性質を、アンチセンス化合物に付与するようなパターン又はモチーフで配置された、化学修飾されたサブユニットを有する。

【0277】

キメラアンチセンス化合物は、一般的には、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増加、細胞取込みの増加、標的核酸への結合親和性の増加、及び／又は阻害活性の増加をもたらすように修飾された、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、RNA：DNA二本鎖のRNA鎖を開裂する細胞エンドヌクレアーゼRNase Hの基質として機能してもよい。

40

【0278】

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して考えられる。ギャップマーでは、RNase H開裂を補助する、複数のヌクレオチド又は連結したヌクレオシドを有する内部領域が、内部領域のヌクレオチド又は連結したヌクレオシドとは化学的に異なる複数のヌクレオチド又は連結したヌクレオシドを有する外側領域の間に位置する。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、ギャップセグメントは、一般的にエンドヌクレアーゼ切断のための基質として機能し、一方、ウイングセグメントは修飾ヌクレオシドを含む。ある実施形態では、ギャップマーの領域は、それぞれの異なる領域を構成する糖部分のタイプによって区別される。ギャップマーの領域を区別するために用いられる糖成分のタイプとしては、いくつかの実施

50

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（そのような2'-修飾ヌクレオシドとしては、例えば2'-MOE及び2'-O-CH₃などが挙げられる）、及び二環式糖修飾ヌクレオシド（そのような二環式糖修飾ヌクレオシドとしては、例えば4'-(CH₂)_n-O-2'架橋（n=1又はn=2）を有するものが挙げられる）などがある。好ましくは、それぞれの異なる領域は、一様な糖部分を含む。ウイングーギャップーウイングモチーフは、しばしば「X-Y-Z」と記載され、その場合、「X」は5'ウイ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'ウイング領域の長さを表す。本明細書において、「X-Y-Z」と記載されるギャップマーは、ギャップセグメントが5'ウイングセグメントと3'ウイングセグメントのそれぞれに直接隣接して位置するような構成を有する。したがって、5'ウイングセグメントとギャップセグメントの間、又はギャップセグメントと3'ウイングセグメントの間には、介在ヌクレオチドは存在しない。本明細書に記載するアンチセンス化合物は、いずれもギャップマーモチーフを有することができる。いくつかの実施形態ではXとZは同一であり、その他の実施形態ではそれらは異なる。好ましい一実施形態では、Yは8～15個のヌクレオチドである。X、Y又はZは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、又はそれ以上のヌクレオチドのいずれであってもよい。したがって、ギャップマーには、例えば、5-10-5、4-8-4、4-12-3、4-12-4、3-14-3、2-13-5、2-16-2、1-18-1、3-10-3、2-10-2、1-10-1、2-8-2、6-8-6、又は5-8-5が含まれるが、これらに限定されない。

【0279】

ある実施形態では、アンチセンス化合物が、ウイングーギャップ又はギャップーウイングの構成、すなわち、ギャップマーの構成に関して上述したX-Y又はY-Zの構成を有する「ウイングマー」モチーフを有する。したがって、ウイングマーの構成には、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、又は5-13が含まれるが、これらに限定されない。

【0280】

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とす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有する。

【0281】

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、6-8-6ギャップマーモチーフを有する。

【0282】

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、5-8-5ギャップマーモチーフを有する。

【0283】

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、ギャップ拡大型モチーフを有する。

【0284】

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするギャップ拡大型アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5個の化学修飾ヌクレオシドからなるウイングセグメントの間に直接隣接して位置する、10個の2'-デオキシリボヌクレオチドからなるギャップセグメントを有する。ある実施形態では、化学修飾は2'-糖修飾を含む。別の実施形態では、化学修飾は2'-MOE糖修飾を含む。

【0285】

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするギャップ拡大型アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5個の化学修飾ヌクレオシドからなるウイングセグメントの間に直接隣接して位置する、8個の2'-デオキシリボヌクレオチドからなるギャップセグメ

ントを有する。ある実施形態では、化学修飾は2'-糖修飾を含む。別の実施形態では、化学修飾は2'-MOE糖修飾を含む。

【0286】

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするギャップ拡大型アンチセンスオリゴヌクレオチドは、6個の化学修飾ヌクレオシドからなるウイングセグメントの間に直接隣接して位置する、8個の2'-デオキシリボヌクレオチドからなるギャップセグメントを有する。ある実施形態では、化学修飾は2'-糖修飾を含む。別の実施形態では、化学修飾は2'-MOE糖修飾を含む。

【0287】

標的核酸、標的領域及びヌクレオチド配列

10

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸は、以下に記載される配列のいずれかである：GENBANKアクセッション番号NM_000371.2、GENBANK（登録商標）に2008年2月13日に初めて登録（本明細書に配列番号1として組み入れられる）、2009236~2017289番目のヌクレオチドで切り取られたGENBANKアクセッション番号NT_010966.10、GENBANK（登録商標）に2002年8月1日に初めて登録（本明細書に配列番号2として組み入れられる）；ヒトエクソンの類似性に基づき、アカゲザルゲノム配列GENBANKアクセッション番号NW_001105671.1から取り出したエクソン1~4；及び、628000~638000番目のヌクレオチドで切り取られたGENBANKアクセッション番号NW_001105671.1、GENBANK（登録商標）に2006年3月28日に初めて登録（本明細書に配列番号4として組み入れられる）。

20

【0288】

本明細書の実施例において、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、又は核酸塩基へのいかなる修飾にも影響を受けないと解釈される。そのため、ある配列番号によって定義されるアンチセンス化合物は、独立して、糖部分、ヌクレオシド間結合、又は核酸塩基への1つ以上の修飾を含むことができる。ISIS番号（Isis Number (Isis No)又はISIS NO）で記載されるアンチセンス化合物は、核酸塩基配列とモチーフの組み合わせを示す。

【0289】

ある実施形態では、標的領域は、標的核酸の構造的に定義された領域である。例えば、標的領域は、3'UTR、5'UTR、エクソン、イントロン、エクソン／イントロン接合部、コーディング領域、翻訳開始領域、翻訳終結領域、又はその他の定義された核酸領域を包含し得る。トランスサイレチンの構造的に定義された領域は、NCBIなどの配列データベースからアクセッション番号によって入手することができ、そのような情報は参照により本明細書に組み入れられる。ある実施形態では、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。

30

【0290】

標的化は、アンチセンス化合物がハイブリダイズして所望の効果が生じる、少なくとも1つの標的セグメントの決定を含む。ある実施形態では、所望の効果は、mRNA標的核酸レベルの低減である。ある実施形態では、所望の効果は、標的核酸がコードするタンパク質のレベルの低減、又は標的核酸に関連する表現型の変化である。

40

【0291】

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部分的に重なり合っているいてもよい。あるいは、重なり合っていないいてもよい。ある実施形態では、標的領域内の標的セグメントは、約300より多いのヌクレオシドで隔てられることはない。ある実施形態では、標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上の250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、又は10個のヌクレオチド、およそその数のヌクレオチド、それ以下の数のヌクレオチド、およそそれ以下の数のヌクレオチド、又は、上記の数のいずれか2つによって定められる範

50

囲の数のヌクレオチドで、隔てられる。ある実施形態では、標的領域内の標的セグメントは、標的核酸上の5個以下又は約5個以下のヌクレオチドで隔てられる。ある実施形態では、標的セグメントは連続している。考えられるものとして、本明細書に記載する5'標的部位又は3'標的部位のいずれかである、開始核酸を有する範囲によって定められる標的領域がある。

【0292】

適切な標的セグメントは、5'UTR、コーディング領域、3'UTR、イントロン、エクソン、又はエクソン／イントロン接合部内に見いだすことができる。開始コドン又は終止コドンを含む標的セグメントも、適切な標的セグメントである。適切な標的セグメントは、例えば開始コドン又は終止コドンなど、特定の構造的に定義された領域を、特異的に除外することもできる。

10

【0293】

適切な標的セグメントの決定には、標的核酸の配列と、ゲノム全体の他の配列との比較が含まれ得る。例えば、BLASTアルゴリズムを使って、異なる核酸間で類似性を有する領域を特定することができる。この比較により、選択した標的核酸以外の配列（すなわち非標的配列又は標的外配列）に非特異的にハイブリダイズする可能性のあるアンチセンス化合物配列の選択を防ぐことができる。

【0294】

活性標的領域内での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）には、ばらつきがあり得る。ある実施形態では、トランスサイレチンmRNAレベルの低下は、トランスサイレチン発現の阻害を示す。また、トランスサイレチンタンパク質のレベルの低下は、標的mRNA発現の阻害を示す。さらに、表現型の変化は、トランスサイレチン発現の阻害を示す。測定可能な表現型の変化としては、例えば、脳の大きさの正常までの増加、運動協調性の改善、頻繁な筋痙縮（ジストニア）の減少、被刺激性及び／又は不安の減少、記憶力の改善、又は精力の増加などがある。例えばトランスサイレチンアミロイドーシスに関連する症状などのその他の表現型の兆候も、以下に記載するように測定することが可能である。

20

【0295】

ハイブリダイゼーション

いくつかの実施形態では、本明細書に開示するアンチセンス化合物とトランスサイレチン核酸との間でハイブリダイゼーションが起こる。最も一般的なハイブリダイゼーションの機序には、核酸分子の相補的核酸塩基間の水素結合形成（例えばワトソンクリック型、フーグスティーン型又は逆フーグスティーン型水素結合形成）が関与する。

30

【0296】

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

【0297】

ある配列が標的核酸に特異的にハイブリダイズ可能であるかどうかを決定する方法は、当該技術分野で周知である。ある実施形態では、本明細書に記載するアンチセンス化合物は、トランスサイレチン核酸と特異的にハイブリダイズ可能である。

40

【0298】

相補性

アンチセンス化合物の十分な数の核酸塩基が、所望の効果（例えば、トランスサイレチン核酸などの標的核酸のアンチセンス阻害）を生じる形で、標的核酸の対応する核酸塩基と水素結合することができる場合、そのアンチセンス化合物と標的核酸は互いに相補的である。

【0299】

アンチセンス化合物は、介在又は隣接するセグメントがハイブリダイゼーションに関与しない形（例えば、ループ構造、ミスマッチ又はヘアピン構造）で、トランスサイレチン核酸の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。

50

【0300】

ある実施形態では、本明細書に記載するアンチセンス化合物又はその特定の部分は、70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%、若しくは少なくともその割合で、トランスサイレチン核酸、その標的領域、標的セグメント又は特定の部分に対して相補的である。アンチセンス化合物の標的核酸に対する相補性パーセントは、常法によって決定することができる。

【0301】

例えば、アンチセンス化合物の20個の核酸塩基のうち18個が標的領域に相補的であって、そのため特異的にハイブリダイズすると考えられるアンチセンス化合物は、相補性パーセントが90%である。この例の場合、残りの非相補的核酸塩基は、相補的核酸塩基と集合しているか分散していてもよく、互いに又は相補的核酸塩基と連続していなくてもよい。したがって、18核酸塩基の長さで、標的核酸塩基と完全に相補的な2つの領域に挟まれた4個の非相補的核酸塩基を有するアンチセンス化合物は、標的核酸に対して77.8%の全相補性を有し、したがって本発明の範囲に含まれる。アンチセンス化合物と標的核酸のある領域との相補性パーセントは、常法により、当該技術分野で公知のBLASTプログラム（基本的な局所アライメントサーチツール）及びPowerBLASTプログラムを用いて決定することができる（Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656）。相同性パーセント、配列同一性パーセント又は相補性パーセントは、例えば、Smith and Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)のアルゴリズムを用いるギャッププログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.）により、デフォルト設定で決定することができる。

【0302】

ある実施形態では、本明細書に記載するアンチセンス化合物又はその特定の部分は、標的核酸又はその特定の部分に、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、トランスサイレチン核酸、その標的領域、標的セグメント又は標的配列に、完全に相補的である場合がある。本明細書において、「完全に相補的」とは、アンチセンス化合物の各核酸塩基が、標的核酸の対応する核酸塩基と正確な塩基対形成ができることを意味する。例えば、400核酸塩基長の標的配列に関して、20核酸塩基のアンチセンス化合物は、該アンチセンス化合物に完全に相補的な対応する20核酸塩基部分が標的核酸に存在すれば、該400核酸塩基長の標的配列に完全に相補的である。また、完全に相補的とは、第1及び/又は第2核酸の特定の部分についても用いることができる。例えば、30核酸塩基のアンチセンス化合物の20核酸塩基部分が、400核酸塩基長の標的配列に「完全に相補的」であることができる。30核酸塩基の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核酸塩基部分であって、各核酸塩基がアンチセンス化合物の20核酸塩基部分に相補的である部分を有する場合、標的配列に完全に相補的である。同時に、その30核酸塩基の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りの10核酸塩基も標的配列に相補的であるかどうかによって、標的配列に対して完全に相補的である場合も、完全には相補的でない場合もあり得る。

【0303】

非相補的核酸塩基の位置は、アンチセンス化合物の5'端又は3'端であってもよい。あるいは、非相補的核酸塩基又は核酸塩基は、アンチセンス化合物の内部部分に位置してもよい。2個以上の非相補的核酸塩基が存在する場合、それらは連続して（すなわち、連結されて）いてもよく、連続していなくてもよい。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イングセグメント中に位置する。

【0304】

ある実施形態では、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは20核酸塩基長、又は最大でその核酸塩基長であるアンチセンス化合物は、トランスサイレチン核酸などの標的核酸又はその特定の部分に関して、4個より多く、3個より多く、2個

より多く、又は1個より多い非相補的核酸塩基を含むことはない。

【0305】

ある実施形態では、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、若しくは30核酸塩基長、又は最大でその核酸塩基長であるアンチセンス化合物は、トランスサイレチン核酸などの標的核酸又はその特定の部分に関して、6個より多く、5個より多く、4個より多く、3個より多く、2個より多く、又は1個より多い非相補的核酸塩基を含むことはない。

【0306】

本明細書に記載するアンチセンス化合物は、標的核酸の一部分に相補的であるものも含む。本明細書において、「部分」とは、標的核酸のある領域又はセグメント内の所定数の連続する（すなわち連結した）核酸塩基を意味する。「部分」は、アンチセンス化合物の所定数の連続する核酸塩基を意味することもある。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも8核酸塩基部分に相補的である。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも12核酸塩基部分に相補的である。ある実施形態では、アンチセンス化合物は、標的セグメントの少なくとも15核酸塩基部分に相補的である。また、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個若しくはそれ以上、又はこれらの個数のいずれか2つによって定めら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が考えられる。

【0307】

同一性

本明細書に記載するアンチセンス化合物は、特定のヌクレオチド配列、配列番号、若しくは特定のISS番号で表される化合物、又はそれらの一部分に対して、所定の同一性パーセントを有することがある。本明細書において、アンチセンス化合物が本明細書に開示する配列と同じ核酸塩基対合形成能を有する場合、そのアンチセンス化合物は該配列と同一である。例えば、開示するDNA配列中のチミジンの代わりにウラシルを含有するRNAでは、ウラシルとチミジンはどちらもアデニンと対を形成するため、そのDNA配列と同一であるとみなされる。本明細書に記載するアンチセンス化合物の短縮型及び延長型、ならびに本明細書に記載するアンチセンス化合物と比較して非同一塩基を有する化合物も企図される。非同一塩基は、互いに隣接していてもよいし、アンチセンス化合物中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、比較対象である配列と比較して同一の塩基対形成を有する塩基の数によって算出される。

【0308】

ある実施形態では、アンチセンス化合物又はその一部分は、本明細書に開示するアンチセンス化合物若しくは配列番号、又はその一部分の1つ以上に対して、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である。

【0309】

修飾

ヌクレオシドは塩基-糖の組み合わせである。ヌクレオシドの核酸塩基（塩基とも呼ばれる）部分は通常は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の場合、リン酸基は糖の2'、3'又は5'ヒドロキシル部分に連結することができる。オリゴヌクレオチドは、隣接ヌクレオシドが互いに共有結合されて線状のポリマー状オリゴヌクレオチドを形成することによって形成される。オリゴヌクレオチド構造内では、リン酸基は一般にオリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合を形成するとされる。

【0310】

アンチセンス化合物に対する修飾には、ヌクレオシド間結合、糖部分、又は核酸塩基の置換又は改変が包含される。修飾アンチセンス化合物は、例えば、細胞取込みの向上、核

酸標的に対する親和性の向上、ヌクレアーゼ存在下での安定性の増強、又は阻害活性の増強などの望ましい性質を有するため、ネイティブ型よりも好ましいことが多い。

【0311】

化学修飾ヌクレオシドについても、短縮型又は切断型アンチセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸に対する結合親和性を増強させるために用いることができる。その結果、そのような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、同等の結果が得られる場合が多い。

【0312】

修飾ヌクレオシド間結合

RNA及びDNAの天然のヌクレオシド間結合は、3' - 5' ホスホジエステル結合である。1つ以上の修飾された、すなわち非天然のヌクレオシド間結合を有するアンチセンス化合物は、例えば、細胞取込みの向上、標的核酸に対する親和性の向上、ヌクレアーゼ存在下での安定性の増強などの望ましい性質を有するため、天然のヌクレオシド間結合を有するアンチセンス化合物によりも優先して選択される場合が多い。

【0313】

修飾ヌクレオシド間結合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結合、ならびにリン原子を持たないヌクレオシド間結合が含まれる。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合には、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホルアミデート、及びホスホロチオエートが含まれるが、これらに限定されない。リン含有結合及び非リン含有結合の形成方法は公知である。

【0314】

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とす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。

【0315】

修飾糖部分

本発明のアンチセンス化合物は、糖基が修飾されている1つ以上のヌクレオシドを含有してもよい。そのような糖修飾ヌクレオシドは、ヌクレアーゼ安定性の向上、結合親和性の増強、又はその他の有益な生物学的性質を、アンチセンス化合物に付与し得る。ある実施形態では、ヌクレオシドは化学修飾された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、置換基の付加（5' 及び2' 置換基を含む）、非ジェミナル環原子の架橋による二環式核酸（BNA）の形成、リボシル環酸素原子のS、N（R）、又はC（R₁）（R₂）（R、R₁、R₂は、それぞれ独立して、H、C₁-C₁₂アルキル又は保護基を表す）による置換、及びこれらの組み合わせが含まれるが、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（他の開示されている5'、2'-ビス置換ヌクレオシドについては、PCT国際出願第2008/101157号（公開日2008年8月21日）を参照）、又は、リボシル環酸素原子のSによる置き換えと2'位におけるさらなる置換（公開米国特許出願第2005-0130923号（公開日2005年6月16日）参照）、あるいは、BNAの5'-置換（PCT国際出願第2007/134181号（公開日2007年11月22日）参照；ここでは、LNAが例えば5'-メチル基又は5'-ビニル基で置換される）が含まれる。

【0316】

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又はS）、4'-S、2'-F、2'-OCH₃、2'-OCH₂CH₃、2'-OCH₂CH₂F、及び2'-O（CH₂）₂OCH₃置換基を含むヌクレオシドが挙げられるが、これらに限定されない。また、2'位の置換基は、以下から選択することができる：アリル、アミノ、アジド、チオ、O-アリル、O-C₁-C₁₀アルキル、OCF₃、OCH₂F、O（CH₂）₂SCH₃、O（CH₂）₂-O-N（R_m）（R_n）、O-CH₂

—C(=O)—N(R_m)(R_n)、及びO—CH₂—C(=O)—N(R₁)—(CH₂)₂—N(R_m)(R_n)(R₁、R_m及びR_nは、それぞれ独立して、H又は置換若しくは非置換のC₁—C₁₀アルキルである)。

【0317】

本明細書において、「二環式ヌクレオシド」とは、二環式糖部分を含む修飾ヌクレオシドを意味する。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'リボシル環原子の間の架橋を含むヌクレオシドが含まれるが、これに限定されない。ある実施形態では、本明細書に記載す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'架橋を有する二環式ヌクレオシドの例としては、以下の式の一つが挙げられるがこれに限定されない：4'—(CH₂)—O—2'(LNA)；4'—(CH₂)—S—2'；4'—(CH₂)₂—O—2'(ENA)；4'—CH(CH₃)—O—2'及び4'—CH(CH₂OCH₃)—O—2'(及びその類似体：米国特許第7,399,845号(発行日2008年7月15日)参照)；4'—C(CH₃)(CH₃)—O—2'(及びその類似体：公開国際出願第2009/006478号(公開日2009年1月8日)参照)；4'—CH₂—N(OCH₃)—2'(及びその類似体：公開国際出願第2008/150729号(公開日2008年12月11日)参照)；4'—CH₂—O—N(CH₃)—2'(公開米国特許出願第2004-0171570号(公開日2004年9月2日)参照)；4'—CH₂—N(R)—O—2'、ここでRはH、C₁—C₁₂アルキル又は保護基を表す(米国特許第7,427,672号(発行日2008年9月23日)参照)；4'—CH₂—C(H)(CH₃)—2'(Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134参照)；及び4'—CH₂—C(=CH₂)—2'(及びその類似体：公開国際出願第2008/154401号(公開日2008年12月8日)参照)。

【0318】

二環式ヌクレオシドに関するさらなる研究報告については、公開された文献に見ることができる(例えば：Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456；Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630；Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638；Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222；Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039；Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26)8362-8379；Elayadi et al., Curr. Opinion Invest. Drugs, 2001, 2, 558-561；Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8, 1-7；及びOrum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243；米国特許第6,268,490号；6,525,191号；6,670,461号；6,770,748号；6,794,499号；7,034,133号；7,053,207号；7,399,845；7,547,684号；及び7,696,345号；米国特許公開第2008-0039618号；2009-0012281号；米国特許シリアル番号第60/989,574号；61/026,995号；61/026,998号；61/056,564号；61/086,231号；61/097,787号；及び61/099,844号；公開PCT国際出願第1994/014226号；2004/106356号；2005/021570号；2007/134181号；2008/150729号；2008/154401号；及び2009/006478号を参照)。上記の各二環式ヌクレオシドは、1つ以上の立体化学的な糖配置を有して作製することができ、例えばα-L-リボフラノース及びβ-D-リボフラノースなどが含まれる(国際公開第99/14226号として1999年3月25日に公開された、PCT国際出願DK98/00393号を参照)。

【0319】

ある実施形態では、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'位の間に少なくとも一つの架橋を有する化合物であって、該架橋がそれぞれ以下から独立して選択される1つ又は2～4つの連結した基を含む化合物を含むが、これらに限定されない：—[C(R_a)(R_b)]_n—、—C(R_a)=C(R_b)—、—C(R_a)=N—、—C(=O)—、—C(=NR_a)—、—C(=S)—、—O—、—S

$i(R_a)_2$ -、 $-S(=O)_x-$ 、及び $-N(R_a)-$ ；

式中、

x は、0、1、又は2であり；

n は、1、2、3、又は4であり；

R_a 及び R_b は、それぞれ独立して、H、保護基、ヒドロキシル、 C_1-C_{12} アルキル、置換 C_1-C_{12} アルキル、 C_2-C_{12} アルケニル、置換 C_2-C_{12} アルケニル、 C_2-C_{12} アルキニル、置換 C_2-C_{12} アルキニル、 C_5-C_{20} アリール、置換 C_5-C_{20} アリール、ヘテロ環ラジカル、置換ヘテロ環ラジカル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、 C_5-C_7 脂環式ラジカル、置換 C_5-C_7 脂環式ラジカル、ハロゲン、 OJ_1 、 NJ_1J_2 、 SJ_1 、 N_3 、 $COOJ_1$ 、アシル($C(=O)-H$)、置換アシル、CN、スルホニル($S(=O)_2-J_1$)、又はスルホキシル($S(=O)-J_1$)であり；及び、

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

【0320】

ある実施形態では、二環式糖部分の架橋は、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ 、 $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$ 、 $-C(R_aR_b)-N(R)-O-$ 、又は $-C(R_aR_b)-O-N(R)-$ である。ある実施形態では、架橋は、 $4'-CH_2-2'$ 、 $4'-(CH_2)_2-2'$ 、 $4'-(CH_2)_3-2'$ 、 $4'-CH_2-O-2'$ 、 $4'-(CH_2)_2-O-2'$ 、 $4'-CH_2-O-N(R)-2'$ 、及び $4'-CH_2-N(R)-O-2'$ (R は、それぞれ独立して、H、保護基、又は C_1-C_{12} アルキル)である。

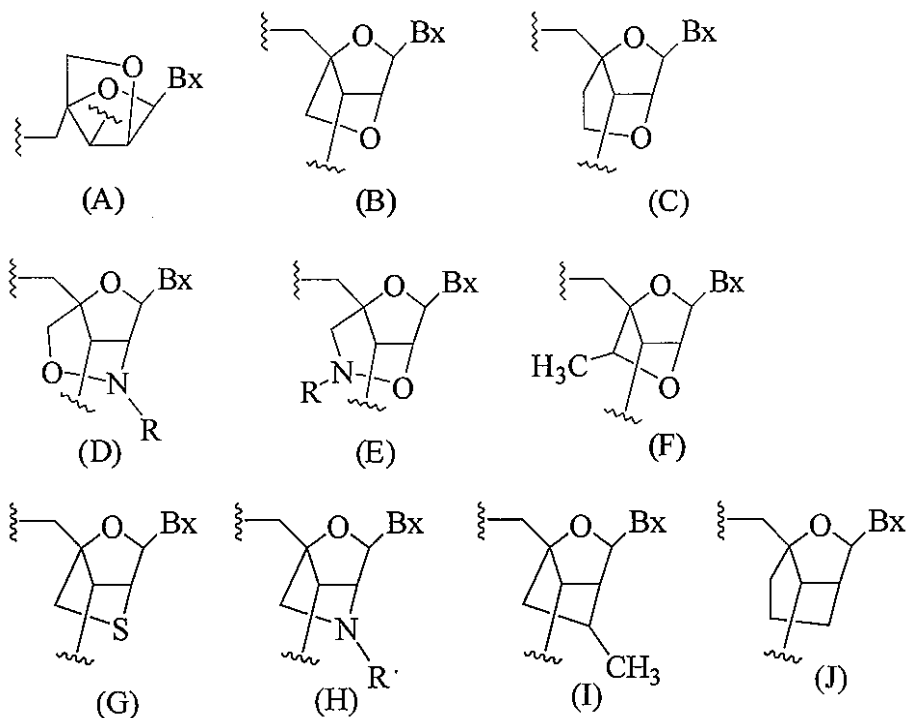
【0321】

ある実施形態では、二環式ヌクレオシドは、さらに異性体配置によって定義される。例えば、 $4'-2'$ メチレンーオキシ架橋を含むヌクレオシドは、 $\alpha-L$ 配置であるか、又は $\beta-D$ 配置である。すでに、 $\alpha-L$ メチレンオキシ($4'-CH_2-O-2'$)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に含まれている(Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372)。

【0322】

ある実施形態では、二環式ヌクレオシドは、以下に示す(A) $\alpha-L$ メチレンオキシ($4'-CH_2-O-2'$)BNA、(B) $\beta-D$ メチレンオキシ($4'-CH_2-O-2'$)BNA、(C)エチレンオキシ($4'-(CH_2)_2-O-2'$)BNA、(D)アミノオキシ($4'-CH_2-O-N(R)-2'$)BNA、(E)オキシアミノ($4'-CH_2-N(R)-O-2'$)BNA、(F)メチル(メチレンオキシ)($4'-CH(CH_3)-O-2'$)BNA、(G)メチレンーチオ($4'-CH_2-S-2'$)BNA、(H)メチレンーアミノ($4'-CH_2-N(R)-2'$)BNA、(I)メチルカルボサイクリック($4'-CH_2-CH(CH_3)-2'$)BNA、及び(J)プロピレンカルボサイクリック($4'-(CH_2)_3-2'$)BNAを含むが、これらに限定されない。

【化 2】

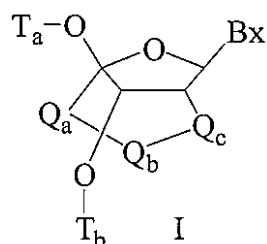


式中、Bxは塩基部分であり、Rは独立してH、保護基、又は $C_1 - C_{12}$ アルキルである。

【0323】

ある実施形態では、二環式ヌクレオシドは、式Iを有する：

【化 3】



式中、

Bxはヘテロ環塩基部分であり；

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

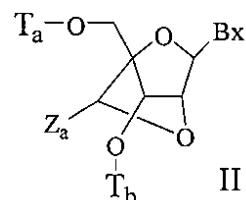
R_c は、 $C_1 - C_{12}$ アルキル又はアミノ保護基であり；そして、

T_a 及び T_b は、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、複合基、反応性リン基、リン部分、又は支持体との共有結合である。

【0324】

ある実施形態では、二環式ヌクレオシドは、式IIを有する：

【化 4】



式中、

B_xはヘテロ環塩基部分であり；

T_a及びT_bは、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、複合基、反応性リン基、リン部分、又は支持体との共有結合であり；

Z_aは、C₁－C₆アルキル、C₂－C₆アルケニル、C₂－C₆アルキニル、置換C₁－C₆アルキル、置換C₂－C₆アルケニル、置換C₂－C₆アルキニル、アシル、置換アシル、置換アミド、チオール、又は置換チオである。

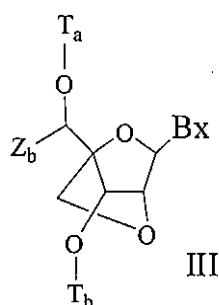
【0325】

一実施形態では、被置換基は、それぞれ独立して、ハロゲン、オキソ、ヒドロキシル、OJ_c、NJ_cJ_d、SJ_c、N₃、OC(=X)J_c、及びNJ_eC(=X)NJ_cJ_dから独立して選択される置換基で単置換又は多置換されている(J_c、J_d、及びJ_eは、それぞれ独立して、H、C₁－C₆アルキル、又は置換C₁－C₆アルキルであり、Xは、O又はNJ_cである)。

【0326】

ある実施形態では、二環式ヌクレオシドは、式IIIを有する：

【化5】



式中、

B_xはヘテロ環塩基部分であり；

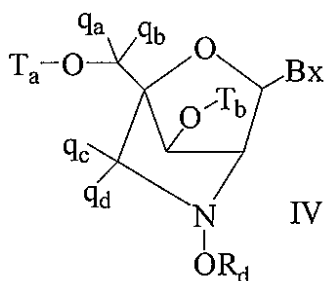
T_a及びT_bは、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、複合基、反応性リン基、リン部分、又は支持体との共有結合であり；

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

【0327】

ある実施形態では、二環式ヌクレオシドは、式IVを有する：

【化6】



式中、

B_xはヘテロ環塩基部分であり；

T_a及びT_bは、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、複合基、反応性リン基、リン部分、又は支持体との共有結合であり；

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、又は置換C₂－C₆アルキニルであり；

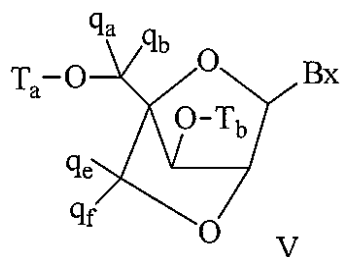
q_a、q_b、q_c及びq_dは、それぞれ独立して、H、ハロゲン、C₁－C₆アルキル、置換C₁－C₆アルキル、C₂－C₆アルケニル、置換C₂－C₆アルケニル、C₂－C₆アルキニル、置換C₂－C₆アルキニル、C₁－C₆アルコキシル、置換C₁－C₆ア

ルコキシル、アシル、置換アシル、 C_1-C_6 アミノアルキル、又は置換 C_1-C_6 アミノアルキルである。

【0328】

ある実施形態では、二環式ヌクレオシドは、式Vを有する：

【化7】



10

式中、

Bxはヘテロ環塩基部分であり；

Ta及びTbは、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、複合基、反応性リン基、リン部分、又は支持体との共有結合であり；

qa、qb、qe及びqfは、それぞれ独立して、水素、ハロゲン、 C_1-C_{12} アルキル、置換 C_1-C_{12} アルキル、 C_2-C_{12} アルケニル、置換 C_2-C_{12} アルケニル、 C_2-C_{12} アルキニル、置換 C_2-C_{12} アルキニル、 C_1-C_{12} アルコキシ、置換 C_1-C_{12} アルコキシ、 OJ_j 、 SJ_j 、 SOJ_j 、 SO_2J_j 、 NJ_jJ_k 、 N_3 、 CN 、 $C(=O)OJ_j$ 、 $C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $C(=O)J_j$ 、 $O-C(=O)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=NH)NJ_jJ_k$ 、 $N(H)C(=O)NJ_jJ_k$ 、又は $N(H)C(=S)NJ_jJ_k$ であり；

20

又は、qe及びqfは、一緒になって、 $=C(q_g)(q_h)$ であり；

qg及びqhは、それぞれ独立して、H、ハロゲン、 C_1-C_{12} アルキル、又は置換 C_1-C_{12} アルキルである。

【0329】

メチレンオキシ ($4'-CH_2-O-2'$) BNAモノマーのアデニン、シトシン、グアニン、5-メチルシトシン、チミン、ウラシルの合成と作製、並びにそれらのオリゴマー化、及び核酸認識能については、すでに説明されている (Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630)。BNA及びその作製についても、国際公開第98/39352号及び99/14226号に記載されている。

30

【0330】

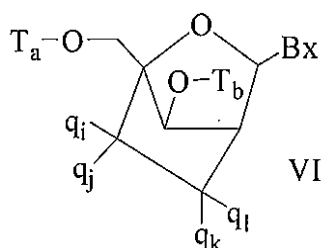
メチレンオキシ ($4'-CH_2-O-2'$) BNA及び2'-チオ-BNAの類似体もすでに作製されている (Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222)。核酸ポリメラーゼの基質としての、オリゴデオキシリボヌクレオチドを含む固定化ヌクレオシド類似体の作製も、すでに説明されている (Wengel et al., 国際公開第99/14226号)。さらに、新規の配座固定された高親和性オリゴヌクレオチド類似体である2'-アミノ-BNAの合成についても、当該技術分野で説明されている (Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039)。また、2'-アミノ-BNA及び2'-メチルアミノ-BNAはすでに作製されており、相補的RNA及びDNA鎖とそれらの二本鎖の熱安定性についてもすでに報告されている。

40

【0331】

ある実施形態では、二環式ヌクレオシドは、式VIを有する：

【化 8】



式中、

Bx はヘテロ環塩基部分であり；

T_a 及び T_b は、それぞれ独立して、H、ヒドロキシル保護基、複合基、反応性リン基、リン部分、又は支持体との共有結合であり；

q_i、q_j、q_k 及び q_l は、それぞれ独立して、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、又は N(H)C(=S)NJ_jJ_k であり；そして、

q_i 及び q_j、又は、q_l 及び q_k は、一緒になって、=C(q_g)(q_h) であって、q_g 及び q_h は、それぞれ独立して、H、ハロゲン、C₁ - C₁₂ アルキル、又は置換 C₁ - C₁₂ アルキルである。

【0332】

4' - (CH₂)₃ - 2' 架橋及びアルケニル類似架橋 4' - CH=CH-CH₂ - 2' を有する炭素環式二環式ヌクレオシドは、すでに説明されている (Freier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443 及び Albaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740)。炭素環式二環式ヌクレオシドの合成と作製、並びにそれらのオリゴマー化、及び生化学的研究についても、すでに説明されている (Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26), 8362-8379)。

【0333】

本明細書において、「4' - 2' 二環式ヌクレオシド」又は「4' ~ 2' 二環式ヌクレオシド」は、フラノース環の 2 つの炭素原子を結合する架橋が糖環の 2' 炭素原子と 4' 炭素原子を結合していることを含むフラノース環を含む、二環式ヌクレオシドを意味する。

【0334】

本明細書において、「単環式ヌクレオシド」は、二環式糖部分ではない修飾糖部分を含むヌクレオシドを意味する。ある実施形態では、ヌクレオシドの糖部分又は糖部分類似体は、任意の位置で修飾又は置換されていてもよい。

【0335】

本明細書において、「2' - 修飾糖」は、2' 位で修飾されたフラノシル糖を意味する。ある実施形態では、そのような修飾は、以下から選択される置換基を含む：置換及び非置換アルコキシ、置換及び非置換チオアルキル、置換及び非置換アミノアルキル、置換及び非置換アルキル、置換及び非置換アリル、並びに置換及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。ある実施形態では、2' 修飾は、以下のものを含む置換基から選択されるが、これらに限定されない：O[(CH₂)_nO]_mCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nF、O(CH₂)_nONH₂、OCH₂C(=O)N(H)CH₃、及び O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂ (n 及び m は、1 から約 10 である)。その他の 2' - 置換基は、以下から選択することができる：C₁ - C₁₂ アルキル、置換アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、O-アルカリル、又は O-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl

10

20

30

40

50

、Br、CN、F、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA開裂基、レポーター基、インターカレーター、薬物動態学的性状の改善のための基、又はアンチセンス化合物の薬学的性状の改善のための基、及び、同様の性質を持つその他の置換基。ある実施形態では、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や、例えば2'-O-メチル、O-プロピル、及びO-アミノプロピルなどの他の修飾ヌクレオシドと比較して、高い結合親和性を有することが報告されている。また、2'-MOE置換基を有するオリゴヌクレオチドは、インビボでの使用に期待が持てる特徴を有する、遺伝子発現のアンチセンス阻害剤となることが報告されている(Martin, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann et al., Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; 及びAltmann et al., Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926)。

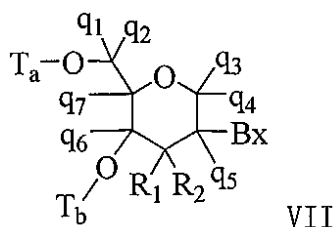
10

【0336】

本明細書において、「修飾テトラヒドロピランヌクレオシド」又は「修飾THPヌクレオシド」は、通常のヌクレオシドにおけるペントフラノシル残基を置換している6員の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(糖代替物)。修飾THPヌクレオシドには、以下のものが含まれるが、これらに限定されない：当該技術分野において、ヘキシトール核酸(HNA)、アニトール(anitol)核酸(ANA)、マニトール(manitol)核酸(MNA)(Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854参照)、フルオロHNA(F-HNA)と呼ばれるもの、又は式VIIを有する化合物：

20

【化9】



30

式中、式VIIの少なくとも一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はヘテロ環塩基部分であり；

T_a及び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とアンチセンス化合物を結合するヌクレオシド間結合基であるか、又は、T_a及びT_bの一方がテトラヒドロピランヌクレオシド類似体とアンチセンス化合物を結合するヌクレオシド間結合基であり、T_a及びT_bのもう一方がH、ヒドロキシル保護基、結合した複合基、又は5'若しくは3'-末端基であり；

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

40

R₁及びR₂は、それぞれ以下から選択される：水素、ヒドロキシル、ハロゲン、置換又は非置換アルコキシ、NJ₁J₂、SJ₁、N₃、OC(=X)J₁、OC(=X)NJ₁J₂、NJ₃C(=X)NJ₁J₂、及びCN(ここで、XはO、S又はNJ₁であり、J₁、J₂及びJ₃は、それぞれ独立して、H又はC₁-C₆アルキルである)。

【0337】

ある実施形態では、式VIIの修飾THPヌクレオシドは、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、及びq₇がいずれもHである。ある実施形態では、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、及びq₇の少なくとも一つは、H以外である。ある実施形態では、q₁、q₂、q₃、q₄、q₅、q₆、及びq₇の少なくとも一つはメチルである。ある実施形

50

態では、式V I IのTHPヌクレオシドは、 R_1 及び R_2 の一つがフルオロである。ある実施形態では、 R_1 はフルオロで R_2 はH； R_1 はメトキシで R_2 はH、及び、 R_1 はHで R_2 はメトキシエトキシである。

【0338】

本明細書において、「2'-修飾」又は「2'-置換」は、2'位にH又はOH以外の置換基を含む糖を含むヌクレオシドを意味する。2'-修飾ヌクレオシドには以下のものが含まれるが、これらに限定されない：糖環の2つの炭素原子を結合する架橋が、糖環の2'炭素と他の炭素を結合している二環式ヌクレオシド；及び、アリル、アミノ、アジド、チオ、 O -アリル、 $O-C_1-C_{10}$ アルキル、 $-OCF_3$ 、 $O-(CH_2)_2-O-CH_3$ 、 $2'-O-(CH_2)_2SCH_3$ 、 $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$ 、又は $O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)$ などの、非架橋2'置換基を有するヌクレオシド（ R_m 及び R_n は、それぞれ独立して、H、又は、置換若しくは非置換 C_1-C_{10} 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、及び／又は核酸塩基にそのほかの修飾を含んでいてもよい。

10

【0339】

本明細書において、「2'-F」は、2'位にフルオロ基を含む糖を含むヌクレオシドを意味する。

【0340】

本明細書において、「2'-OMe」、「2'-OCH₃」又は「2'-O-メチル」は、それぞれ、糖環の2'位に $-OCH_3$ 基を含む糖を含むヌクレオシドを意味する。

20

【0341】

本明細書において、「MOE」、「2'-MOE」、「2'-OCH₂CH₂OCH₃」又は「2'-O-オ-メトキシエチル」は、それぞれ、糖環の2'位に $-OCH_2CH_2OCH_3$ 基を含む糖を含むヌクレオシドを意味する。

【0342】

本明細書において、「オリゴヌクレオチド」は、複数の連結したヌクレオシドを含む化合物を意味する。ある実施形態では、複数のヌクレオシドの1つ以上が修飾されている。ある実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つ以上のリボヌクレオシド（RNA）及び／又はデオキシリボヌクレオシド（DNA）を含む。

【0343】

ヌクレオシドを修飾してアンチセンス化合物に組み込むために使用することができるビシクロ及びトリシクロ糖代替環系は、当該技術分野で他にも多く知られている（例えば、総説：Leumann, Bioorg. Med. Chem., 2002, 10, 841-854を参照）。それらの環系は、活性を向上させるために種々のさらなる置換を行うことができる。

30

【0344】

修飾糖の作製方法は、当業者において公知である。

【0345】

修飾糖部分を有するヌクレオチドでは、核酸塩基部分（天然、修飾又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ている。

【0346】

ある実施形態では、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。ある実施形態では、修飾糖部分は2'-MOEである。ある実施形態では、2'-MOE修飾ヌクレオシドは、ギャップマーモチーフ内に配置されている。ある実施形態では、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イングの全体にわたって配置されている。

40

【0347】

修飾核酸塩基

核酸塩基（又は塩基）修飾又は置換は、天然又は合成された非修飾核酸塩基とは構造的に識別可能であるが、機能的には交換可能である。天然及び修飾核酸塩基は、どちらも水

50

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、又はその他の何らかの有益な生物学的性質を、アンチセンス化合物に付与することができる。修飾核酸塩基には、例えば5-メチルシトシン(5-me-C)などの、合成及び天然核酸塩基が含まれる。5-メチルシトシン置換を含むある種の核酸塩基置換は、標的核酸に対するアンチセンス化合物の結合親和性を増強す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、核酸二本鎖安定性を0.6~1.2℃増加させることが示されている(Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)。

【0348】

その他の非修飾核酸塩基としては、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及びその他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及びその他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニル($-C\equiv C-CH_3$)ウラシル及びシトシン、及びピリミジン塩基のその他のアルキニル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(シュドウラシル(pseudouracil))、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及びその他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル及びその他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノアデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンなどがある。

【0349】

ヘテロ環塩基部分は、プリン又はピリミジン塩基が他の複素環、例えば7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、2-アミノピリジン及び2-ピリドンで置き換えられているものも含む。アンチセンス化合物の結合親和性を増強するために特に有用な核酸塩基としては、5-置換ピリミジン類、6-アザピリミジン類、及びN-2、N-6及びO-6置換プリン類、例えば2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル及び5-プロピニルシトシンが含まれる。

【0350】

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とす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。ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするギャップ拡大型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。ある実施形態では、各シトシンは5-メチルシトシンである。

【0351】

医薬組成物を製剤化するための組成物及び方法

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、医薬組成物又は製剤を作製するために、薬学的に許容される活性又は不活性物質と混合することができる。医薬組成物を製剤化するための組成物及び方法は、これらに限定されないが、投与経路、疾患の程度、又は投与用量などの複数の基準に従って決定される。

【0352】

トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物は、それを適切な薬学的に許容される希釈剤又は担体と組み合わせることにより、医薬組成物に利用することができる。薬学的に許容される希釈剤には、リン酸緩衝食塩水(PBS)が含まれる。PBSは、非経口的に送達される組成物における使用に適した希釈剤である。したがって、一実施形態において、本明細書に記載する方法では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物と薬学的に許容される希釈剤を含む医薬組成物が用いられる。ある実施形態では、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。

【0353】

アンチセンス化合物を含む医薬組成物は、薬学的に許容される塩、エステル若しくはその塩、又は、ヒトを含む動物に投与された時に生物学的に活性な代謝産物若しくはその残基を（直接又は間接的に）与えることができる他のオリゴヌクレオチドを包含する。したがって、例えば、本開示は、アンチセンス化合物の薬学的に許容される塩、プロドラッグ、プロドラッグの薬学的に許容される塩、及び他の生物学的同等物にも引用される。適切な薬学的に許容される塩には、ナトリウム塩及びカリウム塩が含まれるが、これらに限定されない。

【0354】

プロドラッグには、体内で内因性ヌクレアーゼによって開裂されて活性アンチセンス化合物を形成させるアンチセンス化合物の一端又は両端に、付加的なヌクレオシドを組み込むことが含まれる。

10

【0355】

複合化アンチセンス化合物

アンチセンス化合物は、得られるアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、又は細胞取込みを増強する1つ以上の部分又は複合体と共有結合してもよい。代表的な複合基には、コレステロール部分及び脂質部分が含まれる。別の複合基としては、糖質、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、フルオレセイン類、ローダミン類、クマリン類、及び色素が含まれる。

【0356】

アンチセンス化合物は、例えばヌクレアーゼ安定性などの性質を向上するために、通常アンチセンス化合物の一端又は両端に取付けられる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。安定化基にはキャップ構造が含まれる。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、エキソヌクレアーゼ分解から保護し、細胞内での送達及び／又は局在化を補助することができる。キャップは、5'末端（5'キャップ）若しくは3'末端（3'キャップ）に存在するか、又は両末端に存在することができる。キャップ構造は当該技術分野において公知であり、例えば、逆位デオキシ脱塩基キャップが含まれる。アンチセンス化合物の一端又は両端をキャップしてヌクレアーゼ安定性を付与するために使用することができる別の3'及び5'安定化基としては、国際公開第03/004602号（公開日2003年1月16日）に開示されているものが含まれる。

20

30

【0357】

細胞培養及びアンチセンス化合物の処理

トランスサイレチン核酸のレベル、活性又は発現に対するアンチセンス化合物の効果は、種々の細胞タイプにおいて、インビトロで試験することができる。分析に使用される細胞タイプは、商業販売業者（例えば、American Type Culture Collection、バージニア州マナッサス；Zen-Bio, Inc.、ノースカロライナ州リサーチ・トライアングル・パーク；Clonetics Corporation、メリーランド州ウォークーズビル）から入手することができ、細胞は、その指示に従って市販の試薬（例えば、Invitrogen Life Technologies、カリフォルニア州カルズバッド）を用いて培養される。細胞タイプの例としては、HepG2細胞、Hep3B細胞、初期肝細胞、A549細胞、GM04281線維芽細胞、及びLLC-MK2細胞が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0358】

アンチセンスオリゴヌクレオチドのインビトロ試験

ここでは、細胞をアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理するための方法を説明するが、該方法は、他のアンチセンス化合物による処理のために適宜変更することができる。

【0359】

通常、細胞は、培養が約60～80%コンフルエンスに達した時点で、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理する。

【0360】

50

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞中に導入するために一般的に用いられる試薬の1つに、カチオン性脂質トランスフェクション試薬LIPOFECTIN（登録商標）（Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド）がある。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、OPTI-MEM（登録商標）1（Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド）中で、LIPOFECTIN（登録商標）と混合し、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の最終濃度、及び、通常100nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドあたり2～12μg/mLの範囲であるLIPOFECTIN（登録商標）濃度にする。

【0361】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞中に導入するために用いられる別の試薬として、LIPOFECTAMINE2000（登録商標）（Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド）がある。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、OPTI-MEM（登録商標）1低血清培地（Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド）中で、LIPOFECTAMINE2000（登録商標）と混合し、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の濃度、及び、通常100nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドあたり2～12μg/mLの範囲であるLIPOFECTAMINE（登録商標）濃度にする。

【0362】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞中に導入するために用いられる別の試薬として、Cytofectin（登録商標）（Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド）がある。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、OPTI-MEM（登録商標）1低血清培地（Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド）中で、Cytofectin（登録商標）と混合し、アンチセンスオリゴヌクレオチドの所望の濃度、及び、通常100nMのアンチセンスオリゴヌクレオチドあたり2～12μg/mLの範囲であるCytofectin（登録商標）濃度にする。

【0363】

アンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞中に導入するために用いられる別の技術として、エレクトロポレーションがある。

【0364】

細胞は、常法によりアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理する。細胞は、通常、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理の16～24時間後に収集し、その時点で、標的核酸のRNA又はタンパク質レベルを、当該技術分野において公知であって本明細書に説明する方法によって測定する。一般的に、処理が複数回反復して行なわれる場合は、データは反復した処理の平均で表す。

【0365】

使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドの濃度は、細胞株ごとに異なる。特定の細胞株についての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、当該技術分野において公知である。LIPOFECTAMINE2000（登録商標）、Lipofectin、又はCytofectinを用いてトランスフェクトする場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、通常、1nM～300nMの範囲の濃度で使用する。エレクトロポレーションを用いてトランスフェクトする場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、それよりも高い625～20,000nMの範囲の濃度で使用する。

【0366】

RNAの単離

RNA分析は、全細胞RNA又はポリ(A)+mRNAに対して行うことができる。RNAの単離方法は、当該技術分野において公知である。RNAは、当該技術分野において公知の方法で調製され、例えば、TRIzol（登録商標）試薬（Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド）を使用して、製造者の推奨するプロトコールに従って調製する。

【0367】

標的レベル又は標的発現の阻害の分析

トランスサイレチン核酸のレベル又は発現は、当該技術分野において公知の種々の方法で測定することができる。例えば、標的核酸レベルは、ノーザンブロット分析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、定量リアルタイムPCRなどによって定量することができる。RNA分析は、全細胞RNA又はポリ（A）+mRNAに対して行うことができる。RNAの単離方法は、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。定量リアルタイムPCRは、PE-Applied Biosystems（カリフォルニア州フォスターシティ）から入手可能な市販のABI PRISM（登録商標）7600、7700又は7900 Sequence Detection Systemを、製造者の指示に従って使用することにより、簡便に行うことができる。

10

【0368】

標的RNAレベルの定量リアルタイムPCR分析

標的RNAレベルの定量は、ABI PRISM（登録商標）7600、7700又は7900 Sequence Detection System（PE-Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ）を使用し、製造者の指示に従い、定量リアルタイムPCRによって行うことができる。定量リアルタイムPCRの方法は、当該技術分野において公知である。

【0369】

リアルタイムPCRの前に、単離されたRNAに逆転写酵素（RT）反応を行い、それにより相補的DNA（cDNA）が生成され、それをリアルタイムPCRの増幅のための基質として使用する。RT反応及びリアルタイムPCR反応は、同じサンプルウェル内で逐次的に行なわれる。RT及びリアルタイムPCRの試薬は、Invitrogen（カリフォルニア州カールズバッド）から入手する。RT反応及びリアルタイムPCR反応は、当業者において公知の方法によって行う。

20

【0370】

リアルタイムPCRによって得られる遺伝子（又はRNA）標的の量は、シクロフィリンAなどの発現量が一定な遺伝子の発現レベルを使って正規化するか、又はRIBOGREEN（登録商標）（Invitrogen, Inc.、カリフォルニア州カールズバッド）を用いて全RNAを定量することによって正規化する。シクロフィリンAの発現は、標的と同時に、多重に、又は別々に、リアルタイムPCRで定量する。全RNAは、RIBOGREEN（登録商標）RNA定量試薬（Invetrogen, Inc.、オレゴン州ユージーン）を用いて定量する。RIBOGREEN（登録商標）によるRNAの定量方法は、Jones, L.J., et al, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374)に記載されている。RIBOGREEN（登録商標）の蛍光測定には、CYTOFLUOR（登録商標）4000装置（PE Applied Biosystems）が用いられる。

30

【0371】

プローブ及びプライマーは、トランスサイレチン核酸とハイブリダイズするよう設計される。リアルタイムPCRのプローブ及びプライマーの設計方法は、当該技術分野において公知であり、PRIMER EXPRESS（登録商標）Software（Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ）などのソフトウェアの使用が含まれる。

40

【0372】

タンパク質レベルの分析

トランスサイレチン核酸のアンチセンス阻害は、トランスサイレチンタンパク質レベルを測定することで評価することができる。トランスサイレチンのタンパク質レベルは、当該技術分野において公知の各種の方法によって評価又は定量することができ、例えば、免疫沈降、ウェスタンブロット分析（イムノブロット法）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、定量タンパク質アッセイ、タンパク質活性アッセイ（例えばカスパーゼ活性

50

アッセイ)、免疫組織化学、免疫細胞化学又は蛍光活性化細胞選別(FACS)などがある。標的に対する抗体は、MSRS抗体カタログ(Aerie Corporation、ミシガン州バーミンガム)などの各種の供給元から特定して入手するか、又は当該技術分野で公知である従来のモノクローナル又はポリクローナル抗体産生方法によって作製することができる。ヒト及びマウストランスサイレチンの検出に有用な抗体は市販されている。

【0373】

アンチセンス化合物のインビボ試験

アンチセンスオリゴヌクレオチドなどのアンチセンス化合物は、動物において、トランスサイレチン発現の阻害や表現型変化をもたらす能力を評価するために試験される。試験は、正常な動物、又は実験的病態モデルで行われる。動物への投与のためには、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、リン酸緩衝食塩水などの薬学的に許容される希釈剤中で製剤される。投与には、非経口投与経路が含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドによる処置期間の後、RNAを組織から単離し、トランスサイレチン核酸発現の変化を測定する。トランスサイレチンタンパク質レベルの変化についても測定する。

【0374】

特定の化合物

様々な長さ、モチーフ、及び骨格構成を有する、およそ246種類の新たに設計したアンチセンス化合物について、ヒトトランスサイレチンmRNAに対する効果を、いくつかの細胞タイプにおいてインビトロで試験を行った。新たな化合物は、インビトロで最も効果のあるアンチセンス化合物の一部として認められているISIS番号304267、304268、304280、304284、304285、304286、304287、304288、304289、304290、304291、304292、304293、304294、304296、304297、304298、304299、304300、304301、304302、304303、304304、304307、304308、304309、304311、及び304312を含む、およそ79種類のこれまでに設計された化合物と比較を行った(例えば、米国特許公開第2005/0244869号及び2009/0082300号を参照)。新たに設計したもの及びこれまでに設計されたもののおよそ325種類のアンチセンス化合物のうち、インビトロでの有効性に基づき、およそ15種類の化合物を選択して更なる試験を行った。選択した化合物は、インビボでの有効性及び耐容性について、トランスジェニックマウスモデルで試験した(実施例10参照)。試験した15種類の化合物から11種類を選択し、CD1マウスにおいて、全身耐容性(実施例11参照)及び肝臓での半減期測定(実施例12参照)の試験を行い、SDラットにおいて、全身耐容性(実施例13参照)及び肝臓におけるオリゴヌクレオチド濃度の薬物動態学的検討(実施例14参照)の試験を行った。これらの試験から、7種類の化合物について、用量依存的な阻害及び耐容性をトランスジェニックマウスで試験した(実施例15参照)。さらに、表1から15種類の別の化合物を選択し、また、様々なモチーフを有する6種類の別の化合物を、上述の試験で高い有効性及び耐容性を示したISIS420951と重複する配列を有して設計した。これらの別の化合物は、トランスジェニックマウスにおいて、有効性及び耐容性をISIS420951と比較した(実施例16参照)。これらすべての試験(実施例10~16)に基づき、22種類の化合物を選択し、CD1マウスにおいて、全身耐容性を試験した(実施例17参照)。7種類の化合物が該マウスにおいて耐容可能であると考えられ、さらにSDラットにおける全身耐容性(実施例18参照)、並びに肝臓及び腎臓におけるオリゴヌクレオチド濃度の薬物動態学的検討(実施例19参照)の試験を行った。また、該7種類の化合物について、用量依存的な有効性をトランスジェニックマウスで試験した(実施例20参照)。

【0375】

これらの試験(実施例16~20)の最終評価から、配列番号25、78、80、86、87、115、120、122、及び124に記載する配列の核酸配列を有する9種類の化合物が選択された。これらの化合物は、それらの相補的配列から、配列番号1の50

5～524、507～526、508～527、513～532、515～534、516～535、580～599、585～604、587～606、又は589～608の領域に相補的である。ある実施形態では、本明細書にさらに記載するような上記領域を標的とする化合物は、本明細書にさらに記載するように、該配列番号に記載する配列のいくつかの核酸部分を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む。ある実施形態では、上記領域を標的とする化合物、又は上記配列番号に記載する配列のある核酸部分を有する化合物は、本明細書にさらに記載するように様々な長さを有することができ、また、本明細書にさらに記載するように様々なモチーフの1つを有することができる。ある実施形態では、ある領域を標的とする化合物、又は上記配列番号に記載する配列のある核酸部分を有する化合物は、I S I S 3 0 4 2 9 9、I S I S 4 2 0 9 1 3、I S I S 4 2 0 9 1 5、I S I S 4 2 0 9 2 1、I S I S 4 2 0 9 2 2、I S I S 4 2 0 9 5 0、I S I S 4 2 0 9 5 5、I S I S 4 2 0 9 5 7、又はI S I S 4 2 0 9 5 9に示すような、特定の長さ及びモチーフを有する。

10

【0376】

配列番号25、78、80、86、87、115、120、122、及び124に記載する配列の核酸配列を有する9種類の化合物について、さらに、カニクイザルの初期肝細胞における用量依存的な阻害を試験した（実施例21参照）。また、これらの化合物の最適粘度についても試験した（実施例22）。さらに、配列番号78、86、87、115、120、及び124に記載する配列の核酸配列を有する7種類の化合物について、C D 1マウスの肝臓における半減期を評価した（実施例23）。

20

【0377】

これらの試験（実施例1～23）の最終評価から、配列番号25、80、86、87、115、120、122、及び124に記載する配列の核酸配列を有する8種類の化合物が選択された。これらの化合物は、それらの相補的配列から、配列番号1の504～523、505～524、512～531、513～532、577～596、582～601、584～603、及び586～605の領域に相補的である。ある実施形態では、本明細書にさらに記載するような上記領域を標的とする化合物は、本明細書にさらに記載するような、該配列番号に記載する配列のいくつかの核酸部分を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む。ある実施形態では、上記領域を標的とする化合物、又は上記配列番号に記載する配列のある核酸部分を有する化合物は、本明細書にさらに記載するような様々な長さを有することができ、また、本明細書にさらに記載するような様々なモチーフの1つを有することができる。ある実施形態では、ある領域を標的とする化合物、又は上記配列番号に記載する配列のある核酸部分を有する化合物は、I S I S 3 0 4 2 9 9、I S I S 4 2 0 9 1 5、I S I S 4 2 0 9 2 1、I S I S 4 2 0 9 2 2、I S I S 4 2 0 9 5 0、I S I S 4 2 0 9 5 5、I S I S 4 2 0 9 5 7、又はI S I S 4 2 0 9 5 9に示すような、特定の長さ及びモチーフを有する。

30

【0378】

これらの8種類の化合物に対し、カニクイザルにおける効果、薬物動態プロファイル及び耐容性について試験を行った（実施例24）。カニクイザルにおける阻害試験では、これらの化合物のうちのいくつかを用いた処置により、肝臓のT T R mRNAの強い阻害が引き起こされることが示された。具体的には、I S I S 4 2 0 9 5 0、I S I S 4 2 0 9 5 5、及びI S I S 4 2 0 9 1 5を用いた処置により、P B S対照に比べて、それぞれ91%、79%、及び78%の阻害を引き起こした。I S I S 4 2 0 9 1 5のT T R mRNA阻害（78%）は、I S I S 3 0 4 2 9 9（59%）よりも高いが、これら2つのオリゴヌクレオチドは、配列番号1上の標的領域に互いに1つの塩基対シフトの違いがあるだけである。タンパク質分析もRNA分析のデータを補足しており、対照と比べて、I S I S 4 2 0 9 1 5による処置が76%、I S I S 3 0 4 2 9 9による処置が47%のT T Rタンパク質の阻害を引き起こしている。また、トランスサイレチンに関連するタンパク質として、R B P 4タンパク質レベルも、アンチセンス化合物による処置後に減少することが考えられた。I S I S 4 2 0 9 1 5による処置後には、R B P 4タンパク質レベル

40

50

は63%減少した。ISIS304299による処置では、RBP4タンパク質レベルは19%減少している。さらに、サルでの試験に示されるように、ISIS420915は、ISIS304299よりも耐容性が高かった（実施例24）。ISIS304299で処置したサルのトランスアミナーゼレベル（ALT 81 IU/L及びAST 101 IU/L）は、ISIS420915で処置したもの（ALT 68 IU/L及びAST 62 IU/L）よりも高かった。ISIS304299で処置したサルの補体C3レベル（96 mg/dL）は、ISIS420915で処置したもの（104 mg/dL）よりも低かった。

【0379】

したがって、本発明は、改善された特徴のいずれか1つ以上を有するアンチセンス化合物を提供する。ある実施形態では、本発明は、本発明にさらに記載する、配列番号1のヌクレオチドの当該領域を標的とする、又は当該領域と特異的にハイブリダイズ可能な修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

10

【0380】

したがって、本発明は、改善された特徴のいずれか1つ以上を有するアンチセンス化合物を提供する。ある実施形態では、本発明は、本発明にさらに記載する、配列番号2のヌクレオチドの当該領域を標的とする、又は当該領域と特異的にハイブリダイズ可能な修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

【0381】

したがって、本発明は、改善された特徴のいずれか1つ以上を有するアンチセンス化合物を提供する。ある実施形態では、本発明は、本発明にさらに記載する、配列番号4のヌクレオチドの当該領域を標的とする、又は当該領域と特異的にハイブリダイズ可能な修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を提供する。

20

【0382】

ある実施形態では、本明細書に記載する化合物は、実施例67に記載するように、エレクトロポレーションを用いてカニクイザル肝細胞株に送達された際に、2.9 μ M未満、2.2 μ M未満、2.0 μ M未満、1.5 μ M未満、1.4 μ M未満、1.3 μ M未満、1.0 μ M未満、0.7 μ M未満、0.6 μ M未満のインビトロIC₅₀の少なくとも一つを有するので効果的である。ある実施形態では、本明細書に記載する化合物は、食塩水で処置した動物に比べて、ALT値又はAST値が4倍、3倍、又は2倍より多くない増加；又は肝臓、脾臓、又は腎臓の重量が30%、20%、15%、12%、10%、5%、又は2%より多くない増加の少なくとも一つを示すため、耐容性が高い。

30

【0383】

特定の適応症

ある実施形態では、本明細書に記載する1つ以上の医薬組成物を投与することを含む、個体の治療方法を提供する。ある実施形態では、個体は、中枢神経系関連疾患を有する。

【0384】

下記の実施例に示すように、本明細書に記載するトランスサイレチンを標的とする化合物は、中枢神経系関連疾患の生理的症状の重症度を軽減することが示されている。いくつかの実験では、化合物はアミロイド斑の形成速度を低減しており、例えば、動物の症状は継続するが、非処置の動物に比べて症状の重症度は軽度である。一方、他の実験では、化合物は、時間とともに機能の再生が見られている；例えば、処置をより長い期間行った動物では、化合物を短い期間投与したものに比べて症状が軽度であった。そのため、以下に例示する化合物の機能回復能は、本明細書に記載する化合物を用いた治療により、疾患の症状を後退させ得ることを示している。

40

【0385】

したがって、本明細書では、必要とする対象における、中枢神経系関連疾患、心疾患、神経病理学的疾患、又は消化器疾患に関連する症状の改善方法を提供する。ある実施形態では、中枢神経系関連疾患、心疾患、神経病理学的疾患、又は消化器疾患に関連する症状の発症率を低減する方法を提供する。ある実施形態では、中枢神経系関連疾患、心疾患、

50

神経病理学的疾患、又は消化器疾患に関連する症状の重症度を低減する方法を提供する。これらの実施形態では、該方法は、治療上有効量のトランスサイレチン核酸を標的とする化合物を、それを必要とする個体に投与することを含む。

【0386】

トランスサイレチンアミロイドーシスは、多数の身体症状、神経症状、精神症状、及び／又は周辺症状によって特徴づけられる。上述の方法では、トランスサイレチンアミロイドーシスに関連することが当業者に知られているいかなる症状も、上記に示すように改善するか又は調節することができる。ある実施形態では、症状は、身体症状、認知症状、精神症状、又は周辺症状である。ある実施形態では、症状は、以下からなる群から選択される身体症状である：不穏、協調運動障害、眼振、痙性対麻痺、筋協調障害、視覚障害、不眠症、異常感覚、ミオクロヌス、失明、失語症、手根管症候群、発作、くも膜下出血、脳卒中及び脳内出血、水頭症、運動失調、痙性麻痺、昏睡、感覚性ニューロパチー、知覚異常、感覚鈍麻、運動ニューロパチー、自律神経ニューロパチー、起立性低血圧、反復性便秘、反復性下痢、嘔気、嘔吐、発汗減少、性交不能、胃排出遅延、尿閉、尿失禁、進行性心疾患、疲労、息切れ、体重減少、食欲不振、知覚麻痺、刺痛、脱力、舌肥大、ネフローゼ症候群、鬱血性心不全、労作性呼吸困難、末梢性浮腫、不整脈、動悸、朦朧状態、失神、体位性低血圧、末梢神経疾患、感覚運動障害、下肢ニューロパチー、上肢ニューロパチー、痛覚過敏、温度感覚異常、下肢脱力、悪液質、末梢性浮腫、肝腫大、紫斑、拡張機能障害、心室性期外収縮、脳ニューロパチー、深部腱反射減弱、硝子体のアミロイド沈着、硝子体混濁、ドライアイ、緑内障、瞳孔における波状の外見、水分貯留による足の浮腫。ある実施形態では、症状は、以下からなる群から選択される認知症状である：記憶障害、判断力障害、思考障害、計画力障害、柔軟性障害、抽象的思考障害、ルール獲得力障害、適切な行動を取る能力の障害、不適切な行動を抑制する能力の障害、短期記憶障害、長期記憶障害、偏執病、見当識障害、錯乱、幻覚、及び痴呆。ある実施形態では、症状は、以下からなる群から選択される精神症状である：痴呆；不安、抑鬱、情動鈍麻、自己中心性、攻撃性、強迫行動、被刺激性、人格変化（記憶障害、判断力障害及び思考障害を含む）、及び自殺念慮。

【0387】

ある実施形態では、症状は不穏である。ある実施形態では、症状は協調運動障害である。ある実施形態では、症状は眼振である。ある実施形態では、症状は痙性対麻痺である。ある実施形態では、症状は筋協調障害である。ある実施形態では、症状は視覚障害である。ある実施形態では、症状は不眠症である。ある実施形態では、症状は異常感覚である。ある実施形態では、症状はミオクロヌスである。ある実施形態では、症状は失明である。ある実施形態では、症状は失語症である。ある実施形態では、症状は手根管症候群である。ある実施形態では、症状は発作である。ある実施形態では、症状はくも膜下出血である。ある実施形態では、症状は脳卒中である。ある実施形態では、症状は脳内出血である。ある実施形態では、症状は水頭症である。ある実施形態では、症状は運動失調である。ある実施形態では、症状は痙性麻痺である。ある実施形態では、症状は昏睡である。ある実施形態では、症状は感覚性ニューロパチーである。ある実施形態では、症状は知覚異常である。ある実施形態では、症状は感覚鈍麻である。ある実施形態では、症状は運動ニューロパチーである。ある実施形態では、症状は自律神経ニューロパチーである。ある実施形態では、症状は起立性低血圧である。ある実施形態では、症状は反復性便秘である。ある実施形態では、症状は反復性下痢である。ある実施形態では、症状は嘔気である。ある実施形態では、症状は嘔吐である。ある実施形態では、症状は発汗減少である。ある実施形態では、症状は性交不能症である。ある実施形態では、症状は胃排出遅延である。ある実施形態では、症状は尿閉である。ある実施形態では、症状は尿失禁である。ある実施形態では、症状は進行性心疾患である。ある実施形態では、症状は疲労である。ある実施形態では、症状は息切れである。ある実施形態では、症状は体重減少である。ある実施形態では、症状は知覚麻痺である。ある実施形態では、症状は刺痛である。ある実施形態では、症状は脱力である。ある実施形態では、症状は舌肥大である。ある実施形態では、症状

10

20

30

40

50

はネフローゼ症候群である。ある実施形態では、症状は鬱血性心不全である。ある実施形態では、症状は労作性呼吸困難である。ある実施形態では、症状は末梢性浮腫である。ある実施形態では、症状は不整脈である。ある実施形態では、症状は動悸である。ある実施形態では、症状は朦朧状態である。ある実施形態では、症状は失神である。ある実施形態では、症状は体位性低血圧である。ある実施形態では、症状は末梢神経疾患である。ある実施形態では、症状は感覚運動障害である。ある実施形態では、症状は下肢ニューロパチーである。ある実施形態では、症状は上肢ニューロパチーである。ある実施形態では、症状は痛覚過敏である。ある実施形態では、症状は温度感覚異常である。ある実施形態では、症状は下肢脱力である。ある実施形態では、症状は悪液質である。ある実施形態では、症状は浮腫である。ある実施形態では、症状は肝腫大である。ある実施形態では、症状は紫斑である。ある実施形態では、症状は拡張機能障害である。ある実施形態では、症状は心室性期外収縮である。ある実施形態では、症状は脳ニューロパチーである。ある実施形態では、症状は深部腱反射減弱である。ある実施形態では、症状は硝子体のアミロイド沈着である。ある実施形態では、症状は硝子体混濁である。ある実施形態では、症状はドライアイである。ある実施形態では、症状は緑内障である。ある実施形態では、症状は瞳孔における波状の外見である。ある実施形態では、症状は水分貯留による足の浮腫である。

10

【0388】

ある実施形態では、症状は記憶障害である。ある実施形態では、症状は判断力障害及び思考障害である。ある実施形態では、症状は計画力障害である。ある実施形態では、症状は柔軟性障害である。ある実施形態では、症状は抽象的思考障害である。ある実施形態では、症状はルール獲得力障害である。ある実施形態では、症状は適切な行動を取る能力の障害である。ある実施形態では、症状は不適切な行動を抑制する能力の障害である。ある実施形態では、症状は短期記憶障害である。ある実施形態では、症状は長期記憶障害である。ある実施形態では、症状は偏執病である。ある実施形態では、症状は見当識障害である。ある実施形態では、症状は錯乱である。ある実施形態では、症状は幻覚である。ある実施形態では、症状は痴呆である。

20

【0389】

ある実施形態では、症状は痴呆である。ある実施形態では、症状は不安である。ある実施形態では、症状は抑鬱である。ある実施形態では、症状は情動鈍麻である。ある実施形態では、症状は自己中心性である。ある実施形態では、症状は攻撃性である。ある実施形態では、症状は強迫行動である。ある実施形態では、症状は被刺激性である。ある実施形態では、症状は人格変化である。ある実施形態では、症状は自殺念慮である。

30

【0390】

ある実施形態では、本明細書に記載する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を提供する。ある実施形態では、個体は中枢神経系関連疾患を有する。

【0391】

ある実施形態では、トランスサイレチン核酸を標的とするアンチセンス化合物の投与が、少なくとも約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、若しくは99%、又はこれらの数値のいずれか2つにより定められる範囲で、トランスサイレチン発現を低減する。

40

【0392】

ある実施形態では、トランスサイレチンを標的とするアンチセンス化合物を含む医薬組成物は、中枢神経系関連疾患を患っている、又はそれを引き起こしやすい患者を治療する薬剤の調製に用いられる。

【0393】

ある実施形態では、本明細書に記載する方法は、本明細書に記載する、配列番号25、78、80、86、87、115、120、122及び124に記載する配列の連続する核酸塩基部分を有する修飾オリゴヌクレオチドを含む化合物を投与することを含む。

【0394】

50

投与

ある実施形態では、本明細書に記載の化合物および組成物は、局所療法または全身療法のどちらが望ましいかに依存して、且つ、治療される領域に依存して、いくつかの方法で投与され得る。投与は、例えば、噴霧器によるものを含む、散剤またはエアロゾルの吸入またはガス注入による局所的経肺投与であり得；気管内投与、鼻腔内投与、表皮投与および経皮投与、経口投与、または非経口投与であり得る。本明細書に記載の化合物および組成物は、肝臓または脳等の特定の組織を標的とする方法で送達され得る。

【0395】

ある実施形態では、本明細書に記載の化合物および組成物は、非経口的に投与される。「非経口投与」とは、注射または点滴による投与を意味する。非経口投与には、皮下投与、静脈内投与、筋内投与、動脈内投与、腹腔内投与、または頭蓋内投与、例えば脳内投与、脊髄内投与、脳室内投与（intraventricular administration）、脳室投与（ventricular administration）、側脳室内投与（intracerebroventricular administration）、大脳脳室内投与（cerebral intraventricular administration）または大脳脳室投与（cerebral ventricular administration）が含まれる。投与は継続投与、または慢性投与、または短期投与あるいは間欠投与であり得る。

10

【0396】

ある実施形態では、非経口投与は点滴により行われる。点滴は慢性投与または継続投与または短期投与あるいは間欠的投与であり得る。ある実施形態では、注入された医薬品はポンプにより送達される。ある実施形態では、非経口投与は注射により行われる。

20

【0397】

ある実施形態では、非経口投与は皮下的に行われる。

【0398】

さらなる実施形態では、投与のための製剤は、本明細書に記載の化合物および食塩水である。

【0399】

ある実施形態では、化合物および組成物は、中枢神経系（CNS）に送達される。ある実施形態では、化合物および組成物は、脳脊髄液に送達される。ある実施形態では、化合物および組成物は、脳実質に投与される。ある実施形態では、化合物および組成物は、動物に対し、中枢神経系の複数の領域に（例えば、脳の複数の領域に、および／または脊髄に）、脊髄内投与、または脳室内投与によって送達される。本明細書に記載の化合物および組成物の、中枢神経系における広域分布は、実質内投与、脊髄内投与、または脳室内投与により達成され得る。

30

【0400】

ある実施形態では、本発明には脳内への直接注射により送達され得る医薬組成物が含まれる。該注射は、脳の特定領域（例えば、黒質、脈絡叢、皮質、海馬、線条、脈絡叢または淡蒼球）への定位的注射によるものであり得る。本化合物はまた、脳の広域（例えば、脳皮質への広範な送達）に送達され得る。

【0401】

ある実施形態では、非経口投与は注射により行われる。注射剤は、注射器またはポンプにより送達され得る。ある実施形態では、注射はボーラス投与である。ある実施形態では、注射は組織、例えば線条、尾状核、皮質、海馬および小脳に直接投与される。

40

【0402】

ある実施形態では、本明細書に記載の化合物または組成物の送達は、該化合物または該組成物の薬物動態プロファイルに影響し得る。ある実施形態では、本明細書に記載の化合物または組成物を標的組織へ注射することにより、該化合物または該組成物の点滴と比較して、その薬物動態プロファイルが向上する。ある実施形態では、該化合物または該組成物を注射することにより、広範な拡散と比較して効力が向上し、同様の薬効薬理を達成するのに必要な該化合物または該組成物が少なくなる。ある実施形態では、同様の薬効薬理とは、標的mRNAおよび／または標的タンパク質の発現量が減少する時間（例えば作用

50

持続時間)を意味する。ある実施形態では、ボーラス投与による方法等の、医薬品を特異的に局在させる方法は、半有効濃度 (EC50) を約50倍に減少させる (例えば、組織中50倍少ない濃度で、同一または同様の薬理学的効果を達成できる)。ある実施形態では、ボーラス投与による方法等の、医薬品を特異的に局在させる方法は、半有効濃度 (EC50) を20、25、30、35、40、45または50分の1に減少させる。ある実施形態では、本明細書にさらに記載されるようなアンチセンス化合物における本医薬品。ある実施形態では、標的組織は脳組織である。ある実施形態では、標的組織は線条体組織である。ある実施形態では、薬理学的効果を、それを必要とする患者で達成するのに必要な用量を減らすので、EC50を減少させることが望ましい。

【0403】

CD1マウス肝臓組織中のMOEギャップマーオリゴヌクレオチドの半減期は、約21日間である (実施例12参照)。

【0404】

ある実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、注射または点滴により、月1回、2ヶ月に1回、90日に1回、3ヶ月に1回、6ヶ月に1回、1年に2回または1年に1回、送達される。

【0405】

ある併用療法

ある実施形態では、一つまたは複数の本発明の医薬組成物は、一つまたは複数の他の医薬品と同時に投与される。ある実施形態では、そのような一つまたは複数の他の医薬品は、本明細書に記載の一つまたは複数の医薬組成物と同一の疾患、障害、状態を治療できるように設計される。ある実施形態では、そのような一つまたは複数の他の医薬品は、本明細書に記載の一つまたは複数の医薬組成物とは異なる疾患、障害、状態を治療するために設計される。ある実施形態では、そのような一つまたは複数の他の医薬品は、本明細書に記載の一つまたは複数の医薬組成物の望ましくない副作用を治療するために設計される。ある実施形態では、一つまたは複数の医薬組成物は、別の医薬品と同時に投与され、その他の医薬品の望ましくない効果を治療する。ある実施形態では、一つまたは複数の医薬組成物は、別の医薬品と同時に投与され、併用効果を生み出す。ある実施形態では、一つまたは複数の医薬組成物は他の医薬品と同時に投与され、相乗効果を生み出す。

【0406】

ある実施形態では、一つまたは複数の医薬組成物および一つまたは複数の他の医薬品は、同時に投与される。ある実施形態では、一つまたは複数の医薬組成物および一つまたは複数の他の医薬品は、それぞれ別の時間に投与される。ある実施形態では、一つまたは複数の医薬組成物および一つまたは複数の他の医薬品は、単一製剤中に一緒に調製される。ある実施形態では、一つまたは複数の医薬組成物および一つまたは複数の他の医薬品は、別々に調製される。

【0407】

ある実施形態では、第二の化合物は、本発明の医薬組成物の投与前に投与される。ある実施形態では、第二の化合物は、本発明の医薬組成物の投与後に投与される。ある実施形態では、第二の化合物は、本発明の医薬組成物と同時に投与される。ある実施形態では、同時に投与される第二の化合物の用量は、第二の化合物が単独で投与される場合に投与されるであろう用量と同じである。ある実施形態では、同時に投与される第二の化合物の用量は、第二の化合物が単独で投与される場合に投与されるであろう用量より少ない。ある実施形態では、同時に投与される第二の化合物の用量は、第二の化合物が単独で投与される場合に投与されるであろう用量より多い。

【0408】

ある実施形態では、第二の化合物を同時に投与することにより、第一の化合物の効果が増強され、該化合物の同時投与により、第一の化合物の単独投与の効果よりも高い効果が得られる。ある実施形態では、同時投与により、単独で投与された場合の化合物の相加効果が得られる。ある実施形態では、同時投与により、単独で投与された場合の化合物の相

10

20

30

40

50

乗効果が得られる。ある実施形態では、第一の化合物はアンチセンス化合物である。ある実施形態では、第二の化合物がアンチセンス化合物である。

【0409】

ある実施形態では、本発明の医薬組成物と同時投与され得る医薬品には、例えば、ハロペリドール、クロルプロマジン、クロザピン、クエチアピン (quetapine)、およびオランザピン等の抗精神病薬；例えば、フルオキセチン、塩酸セルトラリン、ベンラファキシンおよびノルトリプチリン等の抗鬱剤；例えば、ベンゾジアゼピン、クロナゼパム、パロキセチン、ベンラファキシン (venlafaxin)、およびβ遮断薬等の精神安定剤；例えば、リチウム、バルプロ酸、ラモトリジン、およびカルバマゼピン等の抗躁鬱病薬；例えば、ボツリヌス毒素等のまひ薬；ならびに／またはその他の実験的薬剤、例えば、これらに限定されないが、テトラベナジン (Xenazine)、クレアチン、補酵素Q10 (coenzyme Q10)、トレハロース、ドコサヘキサエン酸 (docosahexanoic acid)、ACR16、エチル-EPA、アトモキセチン、シタロプラム、ディメボン、メマンチン、フェニル酪酸ナトリウム、ラメルテオン、ウルソジオール、ジブレキサ、キセナジン (xenasine)、チアプリド、リルゾール、アマンタジン、[123I] MNI-420、アトモキセチン、テトラベナジン、ジゴキシン、デキストロメトルファン (detromethorphan)、ワルファリン、アルプラゾラム (alprozam)、ケトコナゾール、オメプラゾール、およびミノサイクリンが含まれる。

10

【0410】

ある実施形態では、本発明の医薬組成物と同時投与される医薬品には、パラセタモール (アセトアミノフェン) 等の鎮痛剤；サリチレート等の非ステロイド性抗炎症剤 (NSAID)；モルヒネ等の麻薬、並びにトラマドール等の麻薬性特性を有する合成薬剤が含まれる。ある実施形態では、本発明の医薬組成物と同時投与される医薬品には、ベンゾジアゼピン (benzodiazepine) およびメトカルバモール等の筋弛緩薬が含まれる。

20

【0411】

製剤

また、本発明の化合物は、例えば、リポソーム、受容体標的分子、または他の製剤等の、取り込み、分布および／または吸収を促進する他の分子、分子構造または化合物の混合物と、混合、複合あるいは会合し得る。そのような取り込み、分布および／または吸収促進製剤の調製を教示している米国特許の代表例としては、限定されないが、米国特許第5, 108, 921号；同第5, 354, 844号；同第5, 416, 016号；同第5, 459, 127号；同第5, 521, 291号；同第5, 543, 158号；同第5, 547, 932号；同第5, 583, 020号；同第5, 591, 721号；同第4, 426, 330号；同第4, 534, 899号；同第5, 013, 556号；同第5, 108, 921号；同第5, 213, 804号；同第5, 227, 170号；同第5, 264, 221号；同第5, 356, 633号；同第5, 395, 619号；同第5, 416, 016号；同第5, 417, 978号；同第5, 462, 854号；同第5, 469, 854号；同第5, 512, 295号；同第5, 527, 528号；同第5, 534, 259号；同第5, 543, 152号；同第5, 556, 948号；同第5, 580, 575号；および同第5, 595, 756号が挙げられ、そのそれぞれは参照により本明細書に取り込まれる。

30

40

【0412】

本発明のアンチセンス化合物は、任意の薬剤的に許容できる塩、エステル、またはそのようなエステルの塩、あるいは、動物（ヒトを含む）への投与時に、生物活性のあるその代謝物または残留物を（直接的または間接的に）与えることができるその他の任意の化合物を包含する。

【0413】

「薬剤的に許容できる塩」という用語は、本発明の化合物の生理学的且つ薬剤的に許容できる塩、すなわち、親化合物の所望の生物活性を保持し、望ましくない毒性効果を与えない塩を意味する。オリゴヌクレオチドについて、薬剤的に許容できる塩およびそれらの

50

使用の好ましい例は、米国特許第6,287,860号にさらに記載があり、その全体が本明細書に取り込まれるナトリウム塩が、オリゴヌクレオチド薬剤の好適な形態であることが示されている。

【0414】

また、本発明には、本発明のアンチセンス化合物を含む医薬組成物および製剤が含まれる。本発明の医薬組成物は、局所療法または全身療法のどちらが望ましいかに依存して、且つ、治療される領域に依存して、いくつかの方法で投与され得る。投与は非経口投与であり得る。非経口投与には、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注射または点滴；あるいは頭蓋内投与、例えば、脳内投与、脊髄内投与、脳室内投与（intraventricular administration）、脳室投与（ventricular administration）、側脳室内投与（intracerebroventricular administration）、大脳脳室内投与（cerebral intraventricular administration）または大脳脳室投与（cerebral ventricular administration）が含まれる。

10

【0415】

脈絡叢におけるトランスサイレチン発現を標的とするには、脳室内へ投与することが好ましい。少なくとも1つの2'-O-メトキシエチル修飾を有するオリゴヌクレオチドは、経口投与に特に有用であると考えられている。局所投与のための医薬組成物および製剤には、経皮貼付剤、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、滴剤、坐剤、噴霧剤、液剤および散剤が含まれ得る。従来の医薬担体、水溶性、粉末または油性基剤、増粘剤等が、必要であるかまたは望ましい場合がある。コートされたコンドーム、手袋等も有用であり得る。

20

【0416】

本発明の医薬製剤は、単位剤形で好都合に提供され得、医薬産業において周知の従来技術により調製され得る。そのような技術には、活性成分と医薬担体または賦形剤とを会合させるステップが含まれる。一般的に、製剤は、活性成分と液体担体または微細固体担体あるいはその両方とを均一且つ密に会合させ、その後、必要ならば産物を成形することにより調製される。

【0417】

本発明の組成物は、多くの可能な剤形、例えば、これらに限定されないが、錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル、液体シロップ剤、ソフトゲル、坐剤、および浣腸剤のいずれにも製剤され得る。本発明の組成物はまた、水溶性、非水溶性または混合媒体中の懸濁剤として製剤され得る。水溶性懸濁剤は、懸濁剤の粘度を増加させる物質、例えば、カルボキシルメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび／またはデキストランをさらに含有し得る。懸濁剤は安定剤も含有し得る。

30

【0418】

本発明の医薬組成物には、これらに限定されないが、水剤、乳剤、消泡剤およびリポソーム含有製剤が含まれる。本発明の医薬組成物および製剤は、一つまたは複数の浸透促進剤、担体、賦形剤または他の活性もしくは非活性成分が含まれる。

【0419】

乳剤は、典型的には、ある液体が別の液体に、通常は直径0.1 μm超の小滴の形態で、分散している不均一系である。乳剤は、分散相、および活性薬剤に加えて、さらなる成分を含むことができ、該活性薬剤は水相、油相中に溶液としてまたはそれ自体が分離相として存在し得る。マイクロエマルジョンは、本発明の実施形態として含まれる。乳剤およびそれらの使用は、当該技術分野において周知であり、米国特許第6,287,860号でさらに説明がなされており、その全体が本明細書に組み込まれる

40

【0420】

本発明の製剤には、リポソーム製剤が含まれる。本発明で使用される場合、「リポソーム」という用語は、球状の二分子層に配列した両親媒性脂質を含むベシクルを意味する。リポソームは一枚膜または多重膜のベシクルであり、親油性物質から形成される膜、および送達される組成物を含む親水性の内側を有する。カチオン性リポソームは正に帯電して

50

いるリポソームであり、負に帯電しているDNA分子と相互作用して安定な複合体を形成すると考えられている。pH感受性のまたは負に帯電したリポソームは、DNAと複合体を形成するよりむしろ、DNAを封入すると考えられている。陽イオン性リポソームおよび非陽イオン性リポソームは共に、細胞にDNAを送達するのに用いられている。

【0421】

また、リポソームには、「立体的に安定な」リポソームが含まれ、その用語は、本明細書で使用される場合、一つまたは複数の特殊な脂質を含むリポソームを意味し、その特殊な脂質とは、リポソームに組み込まれた場合に、そのような特殊な脂質を欠くリポソームと比較して循環寿命が延長される脂質である。リポソームおよびそれらの使用については、米国特許第6,287,860でさらに説明がなされており、その全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0422】

本発明の別の実施形態では、本発明の製剤には食塩水製剤が含まれる。本発明のある実施形態では、製剤は本明細書に記載の化合物および食塩水から成る。ある実施形態では、製剤は本明細書に記載の化合物および食塩水から実質的に成る。ある実施形態では、食塩水は薬剤的に許容されるグレードの食塩水である。ある実施形態では、食塩水は緩衝食塩水である。ある実施形態では、食塩水はリン酸緩衝食塩水(PBS)である。

【0423】

ある実施形態では、製剤にリポソームが含まれない。ある実施形態では、製剤に立体的に安定なリポソームが含まれない。ある実施形態では、製剤にリン脂質が含まれない。ある実施形態では、製剤は本明細書に記載の化合物および食塩水から実質的に成り、リポソームを含まない。

20

【0424】

本発明の医薬製剤および組成物には、界面活性剤も含まれ得る。界面活性剤およびそれらの使用については米国特許第6,287,860号でさらに説明がなされており、その全体が本明細書に組み込まれる。

【0425】

一実施形態において、本発明には種々の浸透促進剤が使用され、核酸、特にオリゴヌクレオチドの効率的な送達に影響する。浸透促進剤およびそれらの使用については、米国特許第6,287,860号でさらに説明がなされており、その全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0426】

製剤がそれらの用途に応じて、すなわち投与経路に応じて、規定通りに設計されることは、当業者が認識するところであろう。

【0427】

局所投与に好ましい製剤には、本発明のオリゴヌクレオチドが脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド類、キレート化剤および界面活性剤等の局所的送達媒剤と混合状態である製剤が含まれる。好ましい脂質およびリポソームには、中性の脂質およびリポソーム(例えば、ジオレオイルホスファチジル(DOPE)エタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(distearolyphosphatidyl choline))、陰性の脂質およびリポソーム(例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG))並びに陽イオン性の脂質およびリポソーム(例えばジオレオイルテトラメチルアミノプロピル(DOTAP)およびジオレオイルファチジルエタノールアミン(DOTMA))が含まれる。

40

【0428】

非経口投与、例えば、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、筋肉内注射または点滴、あるいは頭蓋内投与のための組成物および製剤には、緩衝液、希釈液および他の好適な添加剤、例えば、限定されないが、浸透促進剤、担体化合物および他の薬剤的に許容される担体または賦形剤等も含有し得る無菌水溶液が含まれ得る。

【0429】

50

本発明のある実施形態では、一つまたは複数のオリゴマー化合物、および非アンチセンス機構により機能する一つまたは複数の他の化学療法剤を含有する医薬組成物が提供される。そのような化学療法剤の例としては、これらに限定されないが、ダウノルビシン、ダウノマイシン、ダクチノマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、エソルビシン、ブレオマイシン、マホスファミド、イホスファミド、シトシンアラビノシド、ビスクロロエチルニトロソ尿素、ブスルファン、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、ミトラマイシン、プレドニゾン、ヒドロキシprogesterone、テストステロン、タモキシフェン、ダカルバジン、プロカルバジン、ヘキサメチル-メラミン、ペンタメチルメラミン、ミトキサントロン、アムサクリン、クロラムブシル、メチルシクロヘキシルニトロソウレア (methylcyclohexylnitrosurea)、ナイトロジェンマスタードS、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-アザシチジン、ヒドロキシ尿素、デオキシコホルマイシン、4-ヒドロキシペルオキシシクロホスホロアミド、5-フルオロウラシル (5-FU)、5-フルオロデオキシウリジン (5-FUdR)、メトトレキサート (MTX)、コルヒチン、タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド (VP-16)、トリメトトレキサート、イリノテカン、トポテカン、ゲムシタビン、テニポシド、シスプラチンおよびジエチルスチルベストロール (DES) 等のがん化学療法剤が挙げられる。本発明の化合物と一緒に使用された場合、そのような化学療法剤は、別々に (例えば、5-FUおよびオリゴヌクレオチド)、順次に (例えば、5-FUおよびオリゴヌクレオチドから一定時間後にMTXおよびオリゴヌクレオチド)、あるいは一つまたは複数の他のそのような化学療法剤と組み合わせて (例えば、5-FU、MTXおよびオリゴヌクレオチド、または5-FU、放射線療法およびオリゴヌクレオチド)、使用され得る。抗炎症剤、例えば、限定されないが、非ステロイド系の抗炎症剤および副腎皮質ステロイド、並びに抗ウイルス剤、例えば、これらに限定されないが、リバビリン (ribavirin)、ビダラビン、アシクロビルおよびガンシクロビルも、本発明の化合物と組み合わされ得る。アンチセンス化合物と他の非アンチセンス薬剤の組み合わせも本発明の範囲内である。2つ以上の組み合わせられた化合物は、一緒にまたは順次に使用され得る。

【0430】

別の関連実施形態では、本発明の組成物は、第一の核酸を標的とする一つまたは複数のアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチド、および第二の核酸標的を標的とする一つまたは複数のさらなるアンチセンス化合物を含有し得る。あるいは、本発明の組成物は、同一の核酸標的の異なる領域を標的とする2つ以上のアンチセンス化合物を含有し得る。アンチセンス化合物の多くの例が該技術分野において周知である。2つ以上の組み合わせられた化合物は、一緒にまたは順次に使用され得る。

【0431】

投薬

治療用組成物の製剤およびそれに続くそれらの投与 (投薬) は、当業者の技術範囲内であると考えられる。投薬は、治療対象の疾患状態の重症度および応答性に依存し、一連の治療が、数日から数ヶ月継続されるか、あるいは治療に効果があるまでまたは疾患状態の減退が達成されるまで継続される。最適な用量スケジュールは、患者の身体における薬物蓄積を測定することにより計算できる。最適用量は、個々のオリゴヌクレオチドの相対的な効力に非常に依存する場合があります。一般的には、*in vitro* および *in vivo* の動物モデルにおいて効果があると判明した EC_{50} に基づいて推定できる。一般的に、投薬量は体重 1 kg 当たり $0.01\text{ }\mu\text{g} \sim 100\text{ g}$ であり、1回または複数回、毎日、毎週、毎月または毎年、あるいは所望の間隔において、投与され得る。成功的治療に続き、疾患状態の再発を防ぐために、患者が維持療法を施されることが望ましい場合があります。該維持療法では、前記オリゴヌクレオチドが、体重 1 kg 当たり $0.01\text{ }\mu\text{g} \sim 100\text{ g}$ の範囲の維持量を、毎日1回または複数回投与される。

【0432】

本発明は、ある好ましい実施形態に関して具体性をもって記載されたが、以下の実施例

は本発明の例示のみを目的としており、本発明を限定することを意図するものではない。本出願に記載される各参考文献、GenBank受託番号等は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0433】

非制限的開示および参照による組み込み

本明細書に記載のある化合物、組成物および方法は、ある実施形態に関して具体性をもって記載されたが、下記の実施例は本明細書に記載の化合物の例示のみを目的としており、該化合物を限定すること意図するものではない。本明細書に記載の各参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0434】

実施例1：HepG2細胞における、ヒトトランスサイレチンのアンチセンス阻害

アンチセンスオリゴヌクレオチドはトランスサイレチン核酸を標的とするよう設計され、*in vitro*におけるトランスサイレチンmRNAに対するそれらの効果が試験された。1ウェル当たり10,000細胞の密度で培養されたHepG2細胞を、リボフェクティン試薬を用いて50nM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。およそ24時間の処理期間後、RNAを細胞から単離し、トランスサイレチンのmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRで測定した。ヒトプライマープローブセットRTS1396（順方向配列CCCTGCTGAGCCCCCTACTC、本明細書では配列番号5と指定；逆方向配列TCCCTCATTCCTTGGGATTG、本明細書では配列番号6と指定；プローブ配列ATTCCACCAACGGCTGTCTGTCAX、本明細書では配列番号7と指定）。トランスサイレチンのmRNAレベルは、RIBOGREEN（登録商標）により測定した全RNA含量に従って補正した。結果は、無処理対照群細胞に対する、トランスサイレチンの阻害率（%）として表わされる。

20

【0435】

表1および2の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20ヌクレオチドの長さを持ち、その中で中央ギャップセグメント（central gap segment）は10個の2'-デオキシヌクレオチドから成っており、それぞれが5個のヌクレオチドから成るウイング（wing）によって、（5'および3'方向の）両端に隣接する。5'ウイングセグメントにおける各ヌクレオチドおよび3'ウイングセグメントにおける各ヌクレオチドは、2'-MOE修飾を有する。各ギャップマー全体のヌクレオチド間結合は、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シチジン残基は全て、5-メチルシチジンである。「ヒト標的開始部位（Human Target start site）」とは、ギャップマーがヒト遺伝子配列において標的とする5'末端のヌクレオチドを意味する。「ヒト標的終結部位（Human Target stop site）」とは、ギャップマーがヒト遺伝子配列において標的とする3'末端のヌクレオチドを意味する。表1に列挙する各ギャップマーはヒトトランスサイレチンのmRNAを標的としており、本明細書では配列番号1と指定される（GENBANK受託番号NM_000371.2）。また、ヒトトランスサイレチンのゲノム配列のイントロン配列またはイントロンエキソン移行部を標的とする特定のギャップマーが設計され、本明細書では配列番号2と指定され（GENBANK受託番号NT_010966.10、ヌクレオチド2009236～2017289から切断）、表2に列挙する。

30

40

【0436】

また、表1および2のヒトオリゴヌクレオチドは、アカゲザル遺伝子配列と交差反応性がある。ヒトオリゴヌクレオチド「ミスマッチ」とは、ヒトオリゴヌクレオチドがアカゲザル遺伝子配列とミスマッチしている核酸塩基の数を示す。ヒトオリゴヌクレオチドとアカゲザル配列間の相補性が大きい程、ヒトオリゴヌクレオチドはアカゲザル配列と交差し易い。表1のヒトオリゴヌクレオチドを、アカゲザルのゲノム配列（GENBANK受託番号NW_001105671.1）から抽出されたエキソン1～4と、ヒトエキソンとの類似性に基づいて、比較した。表2のヒトオリゴヌクレオチドを、本明細書では配列番号

50

4 (GENBANK受託番号NW_001105671.1、ヌクレオチド628000～638000から切断)と指定されるアカゲザルのゲノム配列と比較した。「アカゲザル標的開始部位 (Rhesus monkey Target start site)」とは、ギャップマーがアカゲザル遺伝子配列において標的とする5'末端のヌクレオチドを意味する。「アカゲザル標的終結部位 (Rhesus monkey Target stop site)」とは、ギャップマーがアカゲザル遺伝子配列において標的とする3'末端のヌクレオチドを意味する。

【0437】

【表1】

表1

配列番号1および配列番号4を標的とし、5-10-5MOEウイングおよびデオキシギャップを有するキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドによる、ヒトトランスサイレチンのmRNAレベルの阻害

ISIS 番号	ヒト開始部位	ヒト終結部位	領域	配列	阻害パーセント	アカゲザル開始部位	アカゲザル終結部位	ミスマッチ	配列番号
304267	217	236	コード領域	ACTGGTTTTC CAGAGGCAA	53	217	236	0	8
304268	222	241	コード領域	GACTCACTGGT TTTCCAGA	16	222	241	0	9
304280	353	372	コード領域	TGAATACCACC TCTGCATGC	51	353	372	0	10
304284	425	444	コード領域	CCGTGGTGGAA TAGGAGTAG	82	425	444	0	11
304285	427	446	コード領域	AGCCGTGGTGG AATAGGAGT	89	427	446	0	12
304286	431	450	コード領域	CGACAGCCGTG GTGGAATAG	63	431	450	0	13
304287	438	457	コード領域	TTGGTGACGAC AGCCGTGGT	88	438	457	0	14
304288	440	459	コード領域	GATTGGTGACG ACAGCCGTG	82	440	459	0	15
304289	442	461	コード領域	GGGATTGGTGA CGACAGCCG	78	442	461	0	16
304290	443	462	コード領域	TGGGATTGGTG ACGACAGCC	85	443	462	0	17
304291	449	468	コード領域- 終止コドン	ATTCCTGGGA TTGGTGACG	52	449	468	0	18
304292	450	469	コード領域- 終止コドン	CATTCCTGGG ATTGGTGAC	34	450	469	0	19
304293	451	470	コード領域- 終止コドン	TCATTCCTGG GATTGGTGA	29	451	470	0	20

304294	460	479	コード領域- 終止コドン- 3' UTR	AGAAGTCCCTC ATTCCTTGG	32	460	479	0	21
304296	481	500	3' -UTR	GTCCTTCAGGT CCACTGGAG	84	478	497	2	22
304297	489	508	3' -UTR	CATCCCTCGTC CTTCAGGTC	0	486	505	1	23
304298	501	520	3' -UTR	TACATGAAATC CCATCCCTC	26	498	517	0	24
304299	507	526	3' -UTR	CTTGGTTACAT GAAATCCCA	85	504	523	0	25
304300	513	532	3' -UTR	AATACTCTTGG TTACATGAA	49	510	529	0	26
304301	526	545	3' UTR	TTAGTAAAAAT GGAATACTC	0	523	542	0	27
304302	532	551	3' UTR	ACTGCTTTAGT AAAAATGGA	42	529	548	0	28
304303	539	558	3' UTR	TGAAAACACTG CTTTAGTAA	41	536	555	0	29
304304	546	565	3' UTR	TATGAGGTGAA AACACTGCT	49	543	562	0	30
304307	564	583	3' UTR	TGGACTTCTAA CATAGCATA	73	561	580	2	31
304308	572	591	3' UTR	TCTCTGCCTGG ACTTCTAAC	55	569	588	1	32
304309	578	597	3' -UTR	TTATTGTCTCTG CCTGGACT	77	575	594	0	33
304311	597	616	3' -UTR	TGCCTTTCACA GGAATGTTT	80	594	613	0	34
304312	598	617	3' -UTR	GTGCCTTTCAC AGGAATGTT	71	595	614	0	35
420871	36	55	コード領域	CAGAGGAGGA GCAGACGATG	48	36	55	0	36
420872	120	139	コード領域	TCTAGAACTTT GACCATCAG	55	120	139	0	37
420873	212	231	コード領域	TTTTCCCAGAG GCAAATGGC	54	212	231	0	38
420874	226	245	コード領域	TCCAGACTCAC TGGTTTTCC	63	226	245	0	39
420875	271	290	コード領域	TATCCCTTCTAC AAATTCCT	40	271	290	0	40
420876	285	304	コード領域	ATTTCCACTTT GTATATCCC	42	285	304	0	41
420877	293	312	コード領域	TGGTGTCTATTT CCACTTTG	76	293	312	0	42
420878	303	322	コード領域	CAGTAAGATTT GGTGTCTAT	80	303	322	0	43

10

20

30

40

420879	307	326	コード領域	CTTCCAGTAAG ATTGGTGT	73	307	326	0	44
420880	347	366	コード領域	CCACCTCTGCA TGCTCATGG	76	347	366	0	45
420881	355	374	コード領域	TGTGAATACCA CCTCTGCAT	58	355	374	0	46
420882	357	376	コード領域	GCTGTGAATAC CACCTCTGC	69	357	376	0	47
420883	362	381	コード領域	CGTTGGCTGTG AATACCACC	64	362	381	0	48
420884	428	447	コード領域	CAGCCGTGGTG GAATAGGAG	93	428	447	0	49
420885	430	449	コード領域	GACAGCCGTG GTGGAATAGG	93	430	449	0	50
420886	432	451	コード領域	ACGACAGCCGT GGTGAATA	92	432	451	0	51
420887	433	452	コード領域	GACGACAGCC GTGGTGAAT	93	433	452	0	52
420888	434	453	コード領域	TGACGACAGCC GTGGTGAA	95	434	453	0	53
420889	435	454	コード領域	GTGACGACAG CCGTGGTGGA	93	435	454	0	54
420890	436	455	コード領域	GGTGACGACA GCCGTGGTGG	97	436	455	0	55
420891	437	456	コード領域	TGGTGACGACA GCCGTGGTG	97	437	456	0	56
420892	439	458	コード領域	ATTGGTGACGA CAGCCGTGG	93	439	458	0	57
420893	441	460	コード領域	GGATTGGTGAC GACAGCCGT	96	441	460	0	58
420894	444	463	コード領域	TTGGGATTGGT GACGACAGC	88	444	463	0	59
420895	445	464	コード領域	CTTGGGATTGG TGACGACAG	95	445	464	0	60
420896	446	465	コード領域	CCTTGGGATTG GTGACGACA	95	446	465	0	61
420897	447	466	コード領域	TCCTTGGGATT GGTGACGAC	94	447	466	0	62
420898	448	467	コード領域- 終止コドン	TTCCTTGGGAT TGGTGACGA	86	448	467	0	63
420899	452	471	コード領域- 終止コドン- 3' UTR	CTCATTCCTTG GGATTGGTG	94	452	471	0	64
420900	453	472	コード領域- 終止コドン- 3' UTR	CCTCATTCCTT GGGATTGGT	92	453	472	0	65
420901	454	473	コード領域- 終止コドン- 3' UTR	CCCTCATTCCT TGGGATTGG	93	454	473	0	66

10

20

30

40

420902	455	474	コード領域- 終止コドン- 3' UTR	TCCCTCATTC TTGGGATTG	75	455	474	0	67
420903	456	475	コード領域- 終止コドン- 3' UTR	GTCCCTCATTC CTTGGGATT	57	456	475	0	68
420904	457	476	コード領域- 終止コドン- 3' UTR	AGTCCCTCATT CCTTGGGAT	62	457	476	0	69
420905	458	477	コード領域- 終止コドン- 3' UTR	AAGTCCCTCAT TCCTTGGGA	58	458	477	0	70
420906	459	478	コード領域- 終止コドン- 3' UTR	GAAGTCCCTCA TTCTTGGG	79	459	478	0	71
420907	461	480	コード領域- 終止コドン- 3' UTR	GAGAAGTCCCT CATTCCTTG	59	461	480	0	72
420908	462	481	コード領域- 終止コドン- 3' UTR	GGAGAAGTCC CTCATTCCTT	75	462	481	0	73
420909	500	519	3' UTR	ACATGAAATCC CATCCCTCG	82	497	516	0	74
420910	502	521	3' UTR	TTACATGAAAT CCCATCCCT	74	499	518	0	75
420911	503	522	3' UTR	GTTACATGAAA TCCCATCCC	81	500	519	0	76
420912	504	523	3' UTR	GGTTACATGAA ATCCCATCC	92	501	520	0	77
420913	505	524	3' UTR	TGGTTACATGA AATCCCATC	95	502	521	0	78
420914	506	525	3' UTR	TTGGTTACATG AAATCCCAT	93	503	522	0	79
420915	508	527	3' UTR	TCTTGGTTACA TGAAATCCC	92	505	524	0	80
420916	509	528	3' UTR	CTCTTGGTTAC ATGAAATCC	88	506	525	0	81
420917	510	529	3' UTR	ACTCTTGGTTA CATGAAATC	92	507	526	0	82
420918	511	530	3' UTR	TACTCTTGGTT ACATGAAAT	88	508	527	0	83
420919	512	531	3' UTR	ATACTCTTGGTT ACATGAAA	89	509	528	0	84
420920	514	533	3' UTR	GAATACTCTTG GTTACATGA	87	511	530	0	85
420921	515	534	3' UTR	GGAATACTCTT GGTTACATG	92	512	531	0	86

10

20

30

40

420922	516	535	3' UTR	TGGAATACTCT TGGTTACAT	95	513	532	0	87
420923	517	536	3' UTR	ATGGAATACTC TTGGTTACA	90	514	533	0	88
420924	518	537	3' UTR	AATGGAATACT CTTGGTTAC	75	515	534	0	89
420925	519	538	3' UTR	AAATGGAATAC TCTTGGTTA	87	516	535	0	90
420926	520	539	3' UTR	AAAATGGAATA CTCTTGGTT	88	517	536	0	91
420927	521	540	3' UTR	AAAAATGGAAT ACTCTTGGT	50	518	537	0	92
420928	522	541	3' UTR	TAAAAATGGAA TACTCTTGG	26	519	538	0	93
420929	523	542	3' UTR	GTAAAAATGGA ATACTCTTG	56	520	539	0	94
420930	524	543	3' UTR	AGTAAAAATGG AATACTCTT	18	521	540	0	95
420931	525	544	3' UTR	TAGTAAAAATG GAATACTCT	12	522	541	0	96
420932	527	546	3' UTR	TTTAGTAAAA TGGAATACT	1	524	543	0	97
420933	528	547	3' UTR	CTTTAGTAAAA ATGGAATAC	0	525	544	0	98
420934	529	548	3' UTR	GCTTTAGTAAA AATGGAATA	6	526	545	0	99
420935	530	549	3' UTR	TGCTTTAGTAA AAATGGAAT	0	527	546	0	100
420936	531	550	3' UTR	CTGCTTTAGTA AAAATGGAA	40	528	547	0	101
420937	533	552	3' UTR	CACTGCTTTAG TAAAAATGG	47	530	549	0	102
420938	534	553	3' UTR	ACACTGCTTTA GTAAAAATG	30	531	550	0	103
420939	535	554	3' UTR	AACACTGCTTT AGTAAAAAT	0	532	551	0	104
420940	536	555	3' UTR	AAACACTGCTT TAGTAAAAA	0	533	552	0	105
420941	537	556	3' UTR	AAAACACTGCT TTAGTAAAA	0	534	553	0	106
420942	538	557	3' UTR	GAAAACACTG CTTTAGTAAA	0	535	554	0	107
420943	540	559	3' UTR	GTGAAAACACT GCTTTAGTA	14	537	556	0	108
420944	541	560	3' UTR	GGTGAAAACA CTGCTTTAGT	43	538	557	0	109
420945	542	561	3' UTR	AGGTGAAAAC ACTGCTTTAG	41	539	558	0	110
420946	543	562	3' UTR	GAGGTGAAAA CACTGCTTTA	20	540	559	0	111

10

20

30

40

420947	544	563	3' UTR	TGAGGTGAAA ACACTGCTTT	69	541	560	0	112
420948	545	564	3' UTR	ATGAGGTGAAA ACACTGCTT	63	542	561	0	113
420949	579	598	3' UTR	TTTATTGTCTCT GCCTGGAC	84	576	595	0	114
420950	580	599	3' UTR	TTTTATTGTCTC TGCCTGGA	69	577	596	0	115
420951	581	600	3' UTR	GTTTTATTGTCT CTGCCTGG	87	578	597	0	116
420952	582	601	3' UTR	TGTTTTATTGTC TCTGCCTG	67	579	598	0	117
420953	583	602	3' UTR	ATGTTTTATTGT CTCTGCCT	51	580	599	0	118
420954	584	603	3' UTR	AATGTTTTATTG TCTCTGCC	60	581	600	0	119
420955	585	604	3' UTR	GAATGTTTTATT GTCTCTGC	65	582	601	0	120
420956	586	605	3' UTR	GGAATGTTTTA TTGTCTCTG	67	583	602	0	121
420957	587	606	3' UTR	AGGAATGTTTT ATTGTCTCT	68	584	603	0	122
420958	588	607	3' UTR	CAGGAATGTTT TATTGTCTC	45	585	604	0	123
420959	589	608	3' UTR	ACAGGAATGTT TTATTGTCT	28	586	605	0	124

【 0 4 3 8 】

10

20

【表 2】

表 2

配列番号 2 および配列番号 4 を標的とし、5-10-5MOE ウィングおよびデオキシギャップを有するキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドによる、ヒトトランスサイレチンの mRNA レベルの阻害

ISIS 番号	ヒト開始部位	ヒト終結部位	領域	配列	阻害率 (%)	アカゲザル開始部位	アカゲザル終結部位	ミスマッチ	配列番号
420960	606	625	エキソン 1-イントロン 1	GATGTCACAGAA AACTCTCAC	13	1755	1774	0	125
420961	665	684	イントロン 1	GCAAAGCTGG AAGGAGTCAC	7	1814	1833	0	126
420962	748	767	イントロン 1	GAAGCTTCATTC TTTTGAAG	0	1897	1916	0	127
420963	882	901	イントロン 1	AGCTTCCTTAA TATCATATC	0	2031	2050	0	128
420964	966	985	イントロン 1	TATAGGGCCAG AATATAATC	10	2115	2134	0	129
420965	1010	1029	イントロン 1	ACTAAGCCTTT TAAAGATTA	17	2159	2178	0	130
420966	1208	1227	イントロン 1	TGGAATTACTG AAAAGATGT	35	2356	2375	0	131
420967	1289	1308	イントロン 1	ACCAGGGATGT GTATAATGA	43	2437	2456	0	132
420968	1364	1383	イントロン 1	TCCCTACTCAG TATAACACA	0	2512	2531	0	133
420969	1472	1491	イントロン 1	GATCAGAGTGA AAAGGATTTA	0	2620	2639	0	134
420970	1687	1706	イントロン 2	GGGAAGATAA AACCAAGTCC	46	2826	2845	0	135
420971	1739	1758	イントロン 2	TAAATTCCTTA GCAGATGAT	0	2878	2897	0	136
420972	1842	1861	イントロン 2	AATGATGCTCA GGTTCCTGG	23	2980	2999	0	137
420973	2051	2070	イントロン 2	TTGGTGTTACC CAGGGACAC	0	3187	3206	0	138
420974	2207	2226	イントロン 2	AAAGTGTTTCAT TAGGCAAAA	29	3344	3363	0	139
420975	2655	2674	イントロン 2	GGCATTCTTATAT AAACATAA	0	3798	3817	0	140
420976	2733	2752	イントロン 2	AAGAACATTG GAATATTTTT	0	3876	3895	0	141
420977	2874	2893	イントロン 2	GTTGGAAATTG CTTCCCAT	9	4017	4036	0	142

10

20

30

40

420978	3015	3034	イントロン2	AGTGGAAAAC CTAAAGTAGG	0	4156	4175	0	143
420979	3618	3637	イントロン2	TCCCCCTCAAC TAAGTCAGA	0	4795	4814	0	144
420980	3735	3754	イントロン2-エキ ソン3	CCTATAAGGTG TGAAAGTCT	0	4930	4949	0	145
420981	4096	4115	イントロン3	TGTAAGTTCAA GTCATGTTA	0	5291	5310	0	146
420982	4306	4325	イントロン3	GTGTTGCCAAG AATCACTTG	0	5502	5521	0	147
420983	4404	4423	イントロン3	AAAACACTTAT AATTGTGTC	0	5600	5619	0	148
420984	4518	4537	イントロン3	CTTTGACAAGT TAITTGACT	0	5714	5733	0	149
420985	4880	4899	イントロン3	ATCCATGACTA AGCCAGAGA	0	6073	6092	0	150
420986	5185	5204	イントロン3	ATGTTTCCCAT CAGGCTGAG	0	6379	6398	0	151
420987	5542	5561	イントロン3	GCATTATCAG AAGAAGCTG	0	6732	6751	0	152
420988	6030	6049	イントロン3	TTGACCTTCAG CCCCTTGA	0	7226	7245	0	153
420989	6133	6152	イントロン3	AGGAAGTGAG AATCACCTAA	0	7641	7660	0	154
420990	6320	6339	イントロン3	AGAAGACAGT AAAGATGTGT	0	7828	7847	0	155
420991	6457	6476	イントロン3	AAATTGTGGAT CAAAATGCT	0	7966	7985	0	156
420992	6736	6755	イントロン3	AACCAGACTT GAATTATTGT	0	8246	8265	0	157
420993	6811	6830	イントロン3	AGTGGCTGCC AACCACAGAC	0	8321	8340	0	158
420994	7106	7125	イントロン3	GGAAGTCCAG TGCCAACCTTA	0	8615	8634	0	159
420995	7162	7181	イントロン3	ATCCATTCCA CCAGAGCCC	0	8670	8689	0	160

【0439】

ヒトトランスサイレチンのmRNAは長さが短いため、第二のプライマープロブセットを第一のプライマープロブセットRTS1396から離れて設計し、単位複製配列オリゴヌクレオチドを避けた。アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、新しいヒトプライマープロブセットRTS3029（本明細書では配列番号161と指定される順方向配列CTTGCTGGACTGGTATTTGTGTCT、本明細書では配列番号162と指定される逆方向配列AGAACTTTGACCATCAGAGGACACT；本明細書では配列番号163と指定されるプロブ配列CCCTACGGGCACCGGTGAATCCX）を用いて、*in vitro*におけるトランスサイレチンmRNAに対するそれらの効果について試験された。1ウェル当たり10,000細胞の密度で培養したHe p G 2細胞を、リポフェクチン試薬を用いて、50 nM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。およそ24時間の処理期間の後、RNAを細胞から単離し、トランスサイレチンのmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRによって測定した。トランスサイレチンのmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定される全RNA含量に従って補正した。結果を、未処理対照群細胞と比較したトランスサイレチ

10

20

30

40

50

ンの阻害率として示す。結果を、PBS対照細胞セットの阻害率(%)として表3に示す。

【0440】

【表3】

表3

5-10-5MOEウイングおよびデオキシギャップを有するキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドによる、プライマープローブセットRTS3029を用いたヒトトランスサイレチンのmRNAレベルの阻害

ISIS 番号	領域	阻害率 (%)
304267	コード領域	13
304268	コード領域	10
304280	コード領域	23
304284	コード領域	10
304285	コード領域	34
304286	コード領域	0
304287	コード領域	34
304288	コード領域	45
304289	コード領域	3
304290	コード領域	16
304291	コード領域-終止コドン	4
304292	コード領域-終止コドン	10
304293	コード領域-終止コドン	14
304294	終止コドン-3' UTR	30
304296	エキソン4	78
304297	エキソン4	29
304298	エキソン4	19
304299	エキソン4	85
304300	エキソン4	52
304301	エキソン4	15
304302	エキソン4	45
304303	エキソン4	51
304304	エキソン4	62
304307	エキソン4	76
304308	エキソン4	63
304309	エキソン4	75
304311	エキソン4	81
304312	エキソン4	68
420871	コード領域	0
420872	コード領域	5
420873	コード領域	19
420874	コード領域	0
420875	コード領域	6

420876	コード領域	20
420877	コード領域	28
420878	コード領域	37
420879	コード領域	34
420880	コード領域	36
420881	コード領域	10
420882	コード領域	27
420883	コード領域	13
420884	コード領域	28
420885	コード領域	4
420886	コード領域	21
420887	コード領域	39
420888	コード領域	37
420889	コード領域	9
420890	コード領域	27
420891	コード領域	39
420892	コード領域	43
420893	コード領域	39
420894	コード領域	0
420895	コード領域	0
420896	コード領域	24
420897	コード領域	31
420898	コード領域-	0
420899	終止コドン-3' UTR	41
420900	終止コドン-3' UTR	26
420901	終止コドン-3' UTR	28
420902	終止コドン-3' UTR	20
420903	終止コドン-3' UTR	20
420904	終止コドン-3' UTR	22
420905	終止コドン-3' UTR	32
420906	終止コドン-3' UTR	13
420907	-終止コドン-3' UTR	0
420908	終止コドン-3' UTR	45
420909	3' UTR	41
420910	3' UTR	14
420911	3' UTR	45
420912	3' UTR	62
420913	3' UTR	81
420914	3' UTR	68
420915	3' UTR	71
420916	3' UTR	54

10

20

30

40

420917	3' UTR	50
420918	3' UTR	43
420919	3' UTR	65
420920	3' UTR	61
420921	3' UTR	65
420922	3' UTR	68
420923	3' UTR	62
420924	3' UTR	9
420925	3' UTR	17
420926	3' UTR	47
420927	3' UTR	57
420928	3' UTR	51
420929	3' UTR	46
420930	3' UTR	39
420931	3' UTR	14
420932	3' UTR	6
420933	3' UTR	1
420934	3' UTR	48
420935	3' UTR	13
420936	3' UTR	62
420937	3' UTR	65
420938	3' UTR	48
420939	3' UTR	7
420940	3' UTR	3
420941	3' UTR	31
420942	3' UTR	0
420943	3' UTR	40
420944	3' UTR	78
420945	3' UTR	58
420946	3' UTR	52
420947	3' UTR	71
420948	3' UTR	73
420949	3' UTR	88
420950	3' UTR	82
420951	3' UTR	90
420952	3' UTR	82
420953	3' UTR	71
420954	3' UTR	67
420955	3' UTR	73
420956	3' UTR	65
420957	3' UTR	74

10

20

30

40

420958	3' UTR	69
420959	3' UTR	63
420960	エキソン1-イントロン1	14
420961	イントロン1	16
420962	イントロン1	0
420963	イントロン1	0
420964	イントロン1	14
420965	イントロン1	23
420966	イントロン1	25
420967	イントロン1	12
420968	イントロン1	0
420969	イントロン1	0
420970	イントロン2	25
420971	イントロン2	0
420972	イントロン2	25
420973	イントロン2	7
420974	イントロン2	28
420975	イントロン2	9
420976	イントロン2	21
420977	イントロン2	14
420978	イントロン2	37
420979	イントロン2	37
420980	イントロン2-エキソン3	16
420981	イントロン3	0
420982	イントロン3	28
420983	イントロン3	0
420984	イントロン3	0
420985	イントロン3	0
420986	イントロン3	7
420987	イントロン3	0
420988	イントロン3	0
420989	イントロン3	0
420990	イントロン3	6
420991	イントロン3	15
420992	イントロン3	0
420993	イントロン3	0
420994	イントロン3	0
420995	イントロン3	10

10

20

30

40

【0441】

新しいプライマープローブセットRTS3029を用いた阻害の結果に基づき、トランスサイレチンmRNAを50%以上阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドをさらなる試験のために選択した。

【0442】

実施例2：HepG2細胞における、マイクロウォーク (microwalk) により設計されるオリゴヌクレオチドによるヒトトランスサイレチンのアンチセンス阻害

さらなるギャップマーが、少なくとも50%の阻害を示す表3に表わされるギャップマ

50

ーに基づいて設計された。これらのギャップマーは、表3から得られる元のギャップマーを上流および下流にわずかに移動させて（すなわち、「マイクロウォーク (microwalk)」）ギャップマーを生成することにより設計された。ギャップマーはまた、種々のモチーフ、例えば、5-10-5 MOE、3-14-3 MOE、2-13-5 MOE、および4-11-5 MOE モチーフと共に生成された。これらのギャップマーは *in vitro* で試験された。1 ウェル当たり 10, 000 細胞の密度で培養した Hep G2 細胞は、リポフェクチン試薬を用いて、50 nM 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。およそ 24 時間の処理期間の後、RNA を細胞から単離し、トランスサイレチンの mRNA レベルを定量的リアルタイム PCR によって測定した。ヒトプライマープローブセット RTS3029 を、トランスサイレチンの mRNA レベルを測定するために使用した。トランスサイレチンの mRNA レベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定される全 RNA 含量に従って補正した。結果を、未処理対照群細胞と比較したトランスサイレチンの阻害率 (%) として示す。結果を表4に示す。

【0443】

表4のキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5-10-5 MOE、3-14-3 MOE、2-13-5 MOE または 4-11-5 MOE ギャップマーとして設計された。表4でアステリスク (*) と一緒に名付けられているギャップマーは、それから ISS 425650 ~ 425763 のギャップマーが、マイクロウォーク (microwalk) により設計される、元となるギャップマーである。5-10-5 ギャップマーは 20 ヌクレオチドの長さを持ち、その中で中央ギャップセグメントは 10 個の 2'-デオキシヌクレオチドから成っており、それぞれが 5 個のヌクレオチドから成るウイングによって、(5' および 3' 方向の) 両端に隣接する。3-14-3 ギャップマーは 20 ヌクレオチドの長さを持ち、その中で中央ギャップセグメントは 14 個の 2'-デオキシヌクレオチドから成っており、それぞれが 3 個のヌクレオチドから成るウイングによって、(5' および 3' 方向の) 両端に隣接する。2-13-5 ギャップマーは 20 ヌクレオチドの長さを持ち、その中で中央ギャップセグメントは 13 個の 2'-デオキシヌクレオチドから成っており、それぞれが 2 個および 5 個のヌクレオチドから成るウイングで、5' および 3' 方向に隣接する。4-11-5 ギャップマーは 20 ヌクレオチドの長さを持ち、その中で中央ギャップセグメントは 11 個の 2'-デオキシヌクレオチドから成っており、それぞれが 4 個および 5 個のヌクレオチドから成るウイングで、5' および 3' 方向に隣接する。4つの各モチーフ (5-10-5、3-14-3、2-13-5、および 4-11-5)、5' ウイングセグメントにおける各ヌクレオチドおよび 3' ウイングセグメントにおける各ヌクレオチドは、2'-MOE 修飾を有する。各ギャップマー全体のヌクレオチド間結合は、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シチジン残基は全て、5-メチルシチジンである。「標的開始部位 (Target start site)」とは、ギャップマーが標的とする 5' 末端のヌクレオチドを意味する。「標的終結部位 (Target stop site)」とは、ギャップマーが標的とする 3' 末端のヌクレオチドを意味する。表4に列挙した各ギャップマーは、配列番号 1 (GENBANK 受託番号 NM_000371.2) の核酸塩基 481 ~ 619 にまたがる標的領域を標的とする。

【0444】

表4に示されるように、いくつかのギャップマーは少なくとも 50% の阻害を示し、例えば以下の ISS 番号のものが挙げられる: 304296、425655、425695、425735、425649、425656、425696、425736、420912、425657、425697、425737、420913、425658、425698、425738、420914、425659、425699、425739、304299、425660、425700、425740、420915、420916、425662、425702、420919、425703、420920、425664、425704、425742、420921、425665、425705、425743、420922、425666、425706、420923、420937、420944、425669、425709、425746、425710、425

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

10

【0 4 4 5】

いくつかのギャップマーは少なくとも60%の阻害を示し、例えば、以下のI S I S番
号のものが挙げられる：3 0 4 2 9 6、4 2 5 6 5 5、4 2 5 6 9 5、4 2 5 7 3 5、4
2 5 6 4 9、4 2 5 6 5 6、4 2 5 6 9 6、4 2 5 7 3 6、4 2 0 9 1 2、4 2 5 6 5 7
、4 2 5 6 9 7、4 2 5 7 3 7、4 2 0 9 1 3、4 2 5 6 5 8、4 2 5 6 9 8、4 2 5 7
3 8、4 2 0 9 1 4、4 2 5 6 5 9、4 2 5 7 3 9、3 0 4 2 9 9、4 2 5 7 4 0、4 2
0 9 1 5、4 2 5 7 0 2、4 2 0 9 1 9、4 2 0 9 2 0、4 2 5 7 4 2、4 2 0 9 2 1、
4 2 5 6 6 5、4 2 5 7 0 5、4 2 5 7 0 6、4 2 0 9 2 3、4 2 5 7 4 6、4 2 5 7 1
1、4 2 5 7 4 7、4 2 0 9 4 8、4 2 5 7 1 2、4 2 5 7 4 8、4 2 5 6 5 1、4 2 5
7 1 5、4 2 5 7 5 1、3 0 4 3 0 9、4 2 5 7 1 6、4 2 5 7 5 2、4 2 5 6 7 7、4
2 5 7 1 7、4 2 5 7 5 3、4 2 0 9 5 0、4 2 5 7 1 8、4 2 5 7 5 4、4 2 0 9 5 1
、4 2 5 6 7 9、4 2 5 7 1 9、4 2 5 7 5 5、4 2 0 9 5 2、4 2 5 6 8 0、4 2 5 7
2 0、4 2 0 9 5 3、4 2 5 6 8 1、4 2 5 7 2 1、4 2 5 7 5 7、4 2 0 9 5 4、4 2
5 7 2 2、4 2 5 7 5 8、4 2 0 9 5 5、4 2 5 7 2 4、4 2 5 7 6 0、4 2 5 7 6 4、
4 2 5 6 5 3、4 2 5 6 9 0、4 2 5 7 3 0、4 2 5 7 6 5、3 0 4 3 1 1、4 2 5 6 9
1、4 2 5 7 3 1、4 2 5 7 6 6、3 0 4 3 1 2、4 2 5 6 9 2、4 2 5 7 3 2、4 2 5
7 6 7、4 2 5 6 5 4、4 2 5 6 9 3、4 2 5 7 3 3、3 0 4 3 1 3、および4 2 5 7 6
9。

20

30

【0 4 4 6】

いくつかのギャップマーは少なくとも70%の阻害を示し、例えば、以下のI S I S番
号のものが挙げられる：3 0 4 2 9 6、4 2 5 6 5 5、4 2 5 6 9 5、4 2 5 7 3 5、4
2 5 6 4 9、4 2 5 6 5 6、4 2 5 6 9 6、4 2 5 7 3 6、4 2 0 9 1 2、4 2 5 6 5 7
、4 2 5 7 3 7、4 2 0 9 1 3、4 2 5 7 3 8、4 2 0 9 1 4、4 2 5 6 5 9、3 0 4 2
9 9、4 2 0 9 1 5、4 2 0 9 2 0、4 2 5 7 4 2、4 2 5 7 1 2、4 2 5 7 4 8、4 2
5 7 1 6、4 2 5 7 5 4、4 2 0 9 5 1、4 2 5 6 7 9、4 2 5 7 1 9、4 2 5 7 5 5、
4 2 5 6 8 0、4 2 5 7 2 1、4 2 5 7 5 7、4 2 5 7 6 0、4 2 5 6 5 3、4 2 5 6 9
0、4 2 5 7 3 0、4 2 5 7 6 5、3 0 4 3 1 1、4 2 5 6 9 1、4 2 5 7 3 1、4 2 5
7 6 6、3 0 4 3 1 2、4 2 5 7 6 7、4 2 5 6 9 3、および3 0 4 3 1 3。

40

【0 4 4 7】

いくつかのギャップマーは少なくとも80%の阻害を示し、例えば、以下のI S I S番
号のものが挙げられる：3 0 4 2 9 6、4 2 5 6 5 5、4 2 5 6 9 5、4 2 5 7 3 6、4
2 0 9 1 3、4 2 5 6 5 9、3 0 4 2 9 9、4 2 0 9 1 5、4 2 5 7 1 6、4 2 5 7 5 4
、4 2 5 7 1 9、4 2 5 7 5 7、4 2 5 7 6 5、および4 2 5 7 6 7。

【0 4 4 8】

いくつかのギャップマーは少なくとも85%の阻害を示し、例えば、以下のI S I S番
号のものが挙げられる：4 2 0 9 1 3、4 2 5 7 1 6、4 2 5 7 5 4、および4 2 5 7 1
9。

【0 4 4 9】

50

1つのギャップマー、I S I S 4 2 5 7 1 9は、90%の阻害を示した。
【0450】

【表4】

表4

配列番号1 (GENBANK受入番号NM_000371.2)を標的とするキメラアンチセンスオリゴヌクレオチドによるヒトトランスサイレチンのmRNAレベルの阻害

オリゴID	開始部位	終結部位	配列	モチーフ	阻害率 (%)	配列番号
*304296	481	500	GTCCTTCAGGTCCACTGGAG	5-10-5	83	22
425655	481	500	GTCCTTCAGGTCCACTGGAG	3-14-3	80	22
425695	481	500	GTCCTTCAGGTCCACTGGAG	2-13-5	80	22
425735	481	500	GTCCTTCAGGTCCACTGGAG	4-11-5	72	22
425649	482	501	CGTCCTTCAGGTCCACTGGA	5-10-5	75	170
425656	482	501	CGTCCTTCAGGTCCACTGGA	3-14-3	78	170
425696	482	501	CGTCCTTCAGGTCCACTGGA	2-13-5	74	170
425736	482	501	CGTCCTTCAGGTCCACTGGA	4-11-5	83	170
*420912	504	523	GGTTACATGAAATCCCATCC	5-10-5	73	77
425657	504	523	GGTTACATGAAATCCCATCC	3-14-3	76	77
425697	504	523	GGTTACATGAAATCCCATCC	2-13-5	69	77
425737	504	523	GGTTACATGAAATCCCATCC	4-11-5	78	77
*420913	505	524	TGGTTACATGAAATCCCATC	5-10-5	89	78
425658	505	524	TGGTTACATGAAATCCCATC	3-14-3	69	78
425698	505	524	TGGTTACATGAAATCCCATC	2-13-5	61	78
425738	505	524	TGGTTACATGAAATCCCATC	4-11-5	78	78
*420914	506	525	TTGGTTACATGAAATCCCAT	5-10-5	70	79
425659	506	525	TTGGTTACATGAAATCCCAT	3-14-3	83	79
425699	506	525	TTGGTTACATGAAATCCCAT	2-13-5	56	79
425739	506	525	TTGGTTACATGAAATCCCAT	4-11-5	69	79
*304299	507	526	CTTGGTTACATGAAATCCCA	5-10-5	83	25
425660	507	526	CTTGGTTACATGAAATCCCA	3-14-3	59	25
425700	507	526	CTTGGTTACATGAAATCCCA	2-13-5	52	25
425740	507	526	CTTGGTTACATGAAATCCCA	4-11-5	69	25
*420915	508	527	TCTTGGTTACATGAAATCCC	5-10-5	81	80
425661	508	527	TCTTGGTTACATGAAATCCC	3-14-3	48	80
425701	508	527	TCTTGGTTACATGAAATCCC	2-13-5	41	80
425741	508	527	TCTTGGTTACATGAAATCCC	4-11-5	37	80
*420916	509	528	CTCTTGGTTACATGAAATCC	5-10-5	52	81
425662	509	528	CTCTTGGTTACATGAAATCC	3-14-3	57	81
425702	509	528	CTCTTGGTTACATGAAATCC	2-13-5	63	81
*420919	512	531	ATACTCTTGGTTACATGAAA	5-10-5	69	84
425663	512	531	ATACTCTTGGTTACATGAAA	3-14-3	46	84
425703	512	531	ATACTCTTGGTTACATGAAA	2-13-5	52	84
*420920	514	533	GAATACTCTTGGTTACATGA	5-10-5	71	85
425664	514	533	GAATACTCTTGGTTACATGA	3-14-3	57	85
425704	514	533	GAATACTCTTGGTTACATGA	2-13-5	58	85
425742	514	533	GAATACTCTTGGTTACATGA	4-11-5	71	85
*420921	515	534	GGAATACTCTTGGTTACATG	5-10-5	68	86

10

20

30

40

425665	515	534	GGAATACTCTGGTTACATG	3-14-3	65	86
425705	515	534	GGAATACTCTGGTTACATG	2-13-5	60	86
425743	515	534	GGAATACTCTGGTTACATG	4-11-5	56	86
*420922	516	535	TGGAATACTCTGGTTACAT	5-10-5	54	87
425666	516	535	TGGAATACTCTGGTTACAT	3-14-3	56	87
425706	516	535	TGGAATACTCTGGTTACAT	2-13-5	64	87
425744	516	535	TGGAATACTCTGGTTACAT	4-11-5	39	87
*420923	517	536	ATGGAATACTCTGGTTACA	5-10-5	62	88
425667	517	536	ATGGAATACTCTGGTTACA	3-14-3	44	88
425707	517	536	ATGGAATACTCTGGTTACA	2-13-5	30	88
*420937	533	552	CACTGCTTTAGTAAAAATGG	5-10-5	59	102
425668	533	552	CACTGCTTTAGTAAAAATGG	3-14-3	37	102
425708	533	552	CACTGCTTTAGTAAAAATGG	2-13-5	32	102
425745	533	552	CACTGCTTTAGTAAAAATGG	4-11-5	43	102
*420944	541	560	GGTGAAAACACTGCTTTAGT	5-10-5	52	109
425669	541	560	GGTGAAAACACTGCTTTAGT	3-14-3	54	109
425709	541	560	GGTGAAAACACTGCTTTAGT	2-13-5	54	109
425746	541	560	GGTGAAAACACTGCTTTAGT	4-11-5	60	109
*420945	542	561	AGGTGAAAACACTGCTTTAG	5-10-5	38	110
425670	542	561	AGGTGAAAACACTGCTTTAG	3-14-3	38	110
425710	542	561	AGGTGAAAACACTGCTTTAG	2-13-5	52	110
*420947	544	563	TGAGGTGAAAACACTGCTTT	5-10-5	34	112
425671	544	563	TGAGGTGAAAACACTGCTTT	3-14-3	27	112
425711	544	563	TGAGGTGAAAACACTGCTTT	2-13-5	68	112
425747	544	563	TGAGGTGAAAACACTGCTTT	4-11-5	61	112
*420948	545	564	ATGAGGTGAAAACACTGCTT	5-10-5	66	113
425672	545	564	ATGAGGTGAAAACACTGCTT	3-14-3	47	113
425712	545	564	ATGAGGTGAAAACACTGCTT	2-13-5	70	113
425748	545	564	ATGAGGTGAAAACACTGCTT	4-11-5	71	113
*304304	546	565	TATGAGGTGAAAACACTGCT	5-10-5	46	30
425673	546	565	TATGAGGTGAAAACACTGCT	3-14-3	51	30
425713	546	565	TATGAGGTGAAAACACTGCT	2-13-5	50	30
425749	546	565	TATGAGGTGAAAACACTGCT	4-11-5	58	30
425650	547	566	ATATGAGGTGAAAACACTGC	5-10-5	28	171
425674	547	566	ATATGAGGTGAAAACACTGC	3-14-3	40	171
425714	547	566	ATATGAGGTGAAAACACTGC	2-13-5	44	171
425750	547	566	ATATGAGGTGAAAACACTGC	4-11-5	47	171
425651	577	596	TATTGTCTCTGCCTGGACTT	5-10-5	65	172
425675	577	596	TATTGTCTCTGCCTGGACTT	3-14-3	55	172
425715	577	596	TATTGTCTCTGCCTGGACTT	2-13-5	65	172
425751	577	596	TATTGTCTCTGCCTGGACTT	4-11-5	62	172
*304309	578	597	TTATTGTCTCTGCCTGGACT	5-10-5	66	33
425676	578	597	TTATTGTCTCTGCCTGGACT	3-14-3	59	33
425716	578	597	TTATTGTCTCTGCCTGGACT	2-13-5	87	33
425752	578	597	TTATTGTCTCTGCCTGGACT	4-11-5	67	33
*420949	579	598	TTTATTGTCTCTGCCTGGAC	5-10-5	57	114

10

20

30

40

425677	579	598	TTTATTGTCTCTGCCTGGAC	3-14-3	67	114
425717	579	598	TTTATTGTCTCTGCCTGGAC	2-13-5	68	114
425753	579	598	TTTATTGTCTCTGCCTGGAC	4-11-5	69	114
*420950	580	599	TTTATTGTCTCTGCCTGGA	5-10-5	61	115
425678	580	599	TTTATTGTCTCTGCCTGGA	3-14-3	59	115
425718	580	599	TTTATTGTCTCTGCCTGGA	2-13-5	69	115
425754	580	599	TTTATTGTCTCTGCCTGGA	4-11-5	86	115
*420951	581	600	GTTTATTGTCTCTGCCTGG	5-10-5	78	116
425679	581	600	GTTTATTGTCTCTGCCTGG	3-14-3	73	116
425719	581	600	GTTTATTGTCTCTGCCTGG	2-13-5	90	116
425755	581	600	GTTTATTGTCTCTGCCTGG	4-11-5	73	116
*420952	582	601	TGTTTATTGTCTCTGCCTG	5-10-5	61	117
425680	582	601	TGTTTATTGTCTCTGCCTG	3-14-3	77	117
425720	582	601	TGTTTATTGTCTCTGCCTG	2-13-5	67	117
425756	582	601	TGTTTATTGTCTCTGCCTG	4-11-5	57	117
*420953	583	602	ATGTTTATTGTCTCTGCCT	5-10-5	65	118
425681	583	602	ATGTTTATTGTCTCTGCCT	3-14-3	61	118
425721	583	602	ATGTTTATTGTCTCTGCCT	2-13-5	77	118
425757	583	602	ATGTTTATTGTCTCTGCCT	4-11-5	83	118
*420954	584	603	AATGTTTATTGTCTCTGCC	5-10-5	63	119
425682	584	603	AATGTTTATTGTCTCTGCC	3-14-3	42	119
425722	584	603	AATGTTTATTGTCTCTGCC	2-13-5	69	119
425758	584	603	AATGTTTATTGTCTCTGCC	4-11-5	61	119
*420955	585	604	GAATGTTTATTGTCTCTGC	5-10-5	65	120
425683	585	604	GAATGTTTATTGTCTCTGC	3-14-3	30	120
425723	585	604	GAATGTTTATTGTCTCTGC	2-13-5	44	120
425759	585	604	GAATGTTTATTGTCTCTGC	4-11-5	50	120
*420956	586	605	GGAATGTTTATTGTCTCTG	5-10-5	47	121
425684	586	605	GGAATGTTTATTGTCTCTG	3-14-3	44	121
425724	586	605	GGAATGTTTATTGTCTCTG	2-13-5	65	121
*420957	587	606	AGGAATGTTTATTGTCTCT	5-10-5	37	122
425685	587	606	AGGAATGTTTATTGTCTCT	3-14-3	46	122
425725	587	606	AGGAATGTTTATTGTCTCT	2-13-5	43	122
425760	587	606	AGGAATGTTTATTGTCTCT	4-11-5	78	122
*420958	588	607	CAGGAATGTTTATTGTCTC	5-10-5	41	123
425686	588	607	CAGGAATGTTTATTGTCTC	3-14-3	6	123
425726	588	607	CAGGAATGTTTATTGTCTC	2-13-5	41	123
425761	588	607	CAGGAATGTTTATTGTCTC	4-11-5	39	123
*420959	589	608	ACAGGAATGTTTATTGTCT	5-10-5	43	124
425687	589	608	ACAGGAATGTTTATTGTCT	3-14-3	22	124
425727	589	608	ACAGGAATGTTTATTGTCT	2-13-5	25	124
425762	589	608	ACAGGAATGTTTATTGTCT	4-11-5	57	124
425652	590	609	CACAGGAATGTTTATTGTC	5-10-5	23	173
425688	590	609	CACAGGAATGTTTATTGTC	3-14-3	11	173
425728	590	609	CACAGGAATGTTTATTGTC	2-13-5	37	173
425763	590	609	CACAGGAATGTTTATTGTC	4-11-5	38	173

10

20

30

40

304310	595	614	CCTTTCACAGGAATGTTTA	5-10-5	57	174
425689	595	614	CCTTTCACAGGAATGTTTA	3-14-3	38	174
425729	595	614	CCTTTCACAGGAATGTTTA	2-13-5	58	174
425764	595	614	CCTTTCACAGGAATGTTTA	4-11-5	60	174
425653	596	615	GCCTTTCACAGGAATGTTT	5-10-5	79	175
425690	596	615	GCCTTTCACAGGAATGTTT	3-14-3	73	175
425730	596	615	GCCTTTCACAGGAATGTTT	2-13-5	76	175
425765	596	615	GCCTTTCACAGGAATGTTT	4-11-5	83	175
*304311	597	616	TGCCTTTCACAGGAATGTTT	5-10-5	71	34
425691	597	616	TGCCTTTCACAGGAATGTTT	3-14-3	74	34
425731	597	616	TGCCTTTCACAGGAATGTTT	2-13-5	73	34
425766	597	616	TGCCTTTCACAGGAATGTTT	4-11-5	79	34
*304312	598	617	GTGCCTTTCACAGGAATGTT	5-10-5	71	35
425692	598	617	GTGCCTTTCACAGGAATGTT	3-14-3	69	35
425732	598	617	GTGCCTTTCACAGGAATGTT	2-13-5	67	35
425767	598	617	GTGCCTTTCACAGGAATGTT	4-11-5	83	35
425654	599	618	AGTGCCTTTCACAGGAATGT	5-10-5	64	176
425693	599	618	AGTGCCTTTCACAGGAATGT	3-14-3	79	176
425733	599	618	AGTGCCTTTCACAGGAATGT	2-13-5	68	176
425768	599	618	AGTGCCTTTCACAGGAATGT	4-11-5	50	176
304313	600	619	AAGTGCCTTTCACAGGAATG	5-10-5	73	177
425694	600	619	AAGTGCCTTTCACAGGAATG	3-14-3	45	177
425734	600	619	AAGTGCCTTTCACAGGAATG	2-13-5	55	177
425769	600	619	AAGTGCCTTTCACAGGAATG	4-11-5	62	177

【0451】

実施例3：Hep G2細胞における、ヒトトランスサイレチンの用量依存的なアンチセンス阻害

実施例2から得られた、ヒトトランスサイレチンを *in vitro* で有意に阻害するギャップマーを、Hep G2細胞において種々の用量で試験した。細胞を1ウェル当たり20,000細胞の密度で播種し、表5で規定されるように、エレクトロポレーションを用いて625nM、1250nM、2500nM、5000nMおよび10000nMの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。およそ16時間の処理期間の後、RNAを細胞から単離し、トランスサイレチンのmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRによって測定した。ヒトトランスサイレチンのプライマープローブセットRTS3029を使用してmRNAレベルを測定した。トランスサイレチンのmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定される全RNA含量に従って補正した。結果を、未処理対照群細胞と比較したトランスサイレチンの阻害率（％）として示す。

【0452】

また、表5に各オリゴヌクレオチドの50％阻害濃度（ IC_{50} ）が示されるが、これは、各濃度で達成されるトランスサイレチンmRNA発現の阻害率に対して、使用されたオリゴヌクレオチドの濃度をプロットすることにより計算され、対照と比較してトランスサイレチンmRNA発現の50％阻害が達成されるオリゴヌクレオチド濃度を示している。表5に例示されるように、トランスサイレチンのmRNAレベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理された細胞において用量依存的に有意に減少した。

【0453】

【表 5】

表 5

エレクトロポレーションを用いた、HepG2細胞におけるヒトトランスサイレチンの用量依存的なアンチセンス阻害

ISIS 番号	625 nM	1250nM	2500nM	5000nM	10000nM	IC ₅₀ (μM)
304296	57	74	83	91	96	<0.625
304299	43	76	82	95	94	0.627
420913	59	75	90	88	98	<0.625
420915	60	85	91	95	99	<0.625
420951	64	77	90	97	99	<0.625
425653	70	86	86	88	82	<0.625
425655	48	80	85	97	96	<0.625
425656	70	89	92	92	96	<0.625
425659	46	56	68	82	93	0.8
425679	63	77	72	94	97	<0.625
425680	28	79	85	93	98	0.8
425693	2	64	74	76	81	1.7
425695	74	87	91	97	98	<0.625
425716	69	84	95	97	98	<0.625
425719	58	84	92	96	98	<0.625
425721	40	75	89	95	98	0.7
425736	64	71	86	93	93	<0.625
425737	78	93	95	97	98	<0.625
425738	40	77	88	94	95	0.7
425754	56	75	87	96	99	<0.625
425755	58	84	88	94	97	<0.625
425757	62	82	94	97	99	<0.625
425760	58	42	74	85	93	<0.625
425765	81	86	87	83	88	<0.625
425766	83	89	81	75	74	<0.625
425767	56	75	83	81	80	<0.625

【0454】

また、実施例2から得られたギャップマーを、トランスフェクション試薬であるリポフェクティンを用いて、HepG2細胞において種々の用量で試験した。細胞を1ウェル当たり10,000細胞の密度で播種し、表6で規定されるように、6.25nM、12.5nM、25nM、50nMおよび100nMの濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドと一緒に、エレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。およそ16時間の処理期間の後、RNAを細胞から単離し、トランスサイレチンのmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRによって測定した。ヒトトランスサイレチンのプライマープロブセットRTS3029を使用してmRNAレベルを測定した。トランスサイレチンのmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定される全RNA含量に従って補正した。結果を、未処理対照群細胞と比較したトランスサイレチンの阻害率(%)として示す。表6に例示されるように、トランスサイレチンのmRNAレベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理された細胞において用量依存的に有意に減少した。

【0455】

【表 6】

表 6

リポフェクチン試薬を用いた、HepG2細胞におけるヒトトランスサイレチンの用量依存的なアンチセンス阻害

ISIS 番号	6.25nM	12.5nM	25nM	50nM	100nM	IC ₅₀ (nM)
304296	26	41	43	52	65	39
304299	22	70	43	74	83	20
420913	4	60	60	68	82	30
420915	36	31	46	64	67	28
420951	10	37	56	85	84	19
425653	25	38	60	74	77	18
425655	27	15	62	79	81	16
425656	37	62	47	69	82	15
425659	17	35	33	79	73	30
425679	32	6	63	79	77	14
425680	16	48	41	84	84	28
425693	10	19	51	66	61	26
425695	36	23	54	76	84	28
425716	57	52	36	85	81	38
425719	25	39	28	60	76	45
425721	0	22	38	73	75	32
425736	25	60	30	77	80	22
425737	36	52	50	60	76	14
425738	13	15	19	65	70	27
425754	8	18	38	75	71	42
425755	26	46	54	77	86	20
425757	0	37	81	83	71	19
425760	28	46	72	70	80	18
425765	0	52	48	66	69	29
425766	24	19	48	69	71	29
425767	41	49	48	65	75	14

【0456】

実施例 4：HepG2細胞における、ヒトトランスサイレチンの用量依存的なアンチセンス阻害

実施例 3 から選択されたギャップマーが、HepG2細胞において種々の濃度で試験された。細胞を 1 ウェル当たり 20,000 細胞の密度で播種し、表 7 で規定されるように、0.0617 μM、0.1852 μM、0.5556 μM、1.6667 μM および 5 μM の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドと一緒に、エレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。およそ 16 時間の処理期間の後、RNA を細胞から単離し、トランスサイレチンの mRNA レベルを定量的リアルタイム PCR によって測定した。ヒトトランスサイレチンのプライマープローブセット RTS3029 を使用して mRNA レベルを測定した。トランスサイレチンの mRNA レベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定される全 RNA 含量に従って補正した。結果を、未処理対照群細胞と比較したトランスサイレチンの阻害率（％）として示す。表 7 に例示されるように、トランスサイレチンの mRNA レベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理した細胞において、用量依存的に減少した。

【0457】

【表 7】

表 7

エレクトロポレーションを用いた、HepG2細胞におけるヒトトランスサイレチンの用量依存的なアンチセンス阻害

ISIS 番号	0.0617 μ M	0.1852 μ M	0.5556 μ M	1.6667 μ M	5 μ M	IC ₅₀ (μ M)
304296	0	6	44	58	83	1.2
304299	38	10	57	83	92	0.6
420913	51	51	54	73	93	0.2
420915	33	35	62	65	93	0.2
420951	40	33	36	82	96	0.4
425653	55	58	74	72	84	<0.06
425655	8	35	54	57	90	0.5
425656	12	43	43	78	94	0.4
425659	14	35	19	46	82	0.6
425679	30	13	23	69	91	0.8
425680	0	35	45	74	84	0.7
425693	0	6	14	32	59	3.4
425695	15	47	61	81	91	0.3
425716	20	17	53	77	91	0.6
425719	0	14	45	78	94	0.8
425721	0	0	22	74	84	0.9
425736	42	43	56	76	91	0.3
425737	21	29	61	81	97	0.3
425738	14	39	57	74	93	0.4
425754	29	34	45	78	94	0.4
425755	8	21	57	78	95	0.5
425757	29	28	62	83	95	0.4
425760	3	6	9	56	77	1.4
425765	24	51	75	77	88	0.3
425766	7	41	59	73	77	0.3
425767	1	18	49	66	79	1.0

【0458】

実施例 5：Hep3B細胞における、ヒトトランスサイレチンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの用量反応確認

ヒトトランスサイレチンの有意な *in vitro* 阻害を示す実施例 4 から得られたギャップマーを、Hep3B細胞において種々の濃度で試験した。細胞を1ウェル当たり20,000細胞の密度で播種し、表8で規定されるように、0.0206 μ M、0.062 μ M、0.185 μ M、0.556 μ M、1.667 μ Mおよび5 μ Mの濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドと一緒に、エレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。およそ16時間の処理期間の後、RNAを細胞から単離し、トランスサイレチンのmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRによって測定した。ヒトトランスサイレチンのプライマープローブセットRTS1396を使用してmRNAレベルを測定した。トランスサイレチンのmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定される全RNA含量に従って補正した。結果を、未処理対照群細胞と比較したトランスサイレチンの阻害率（％）として示す。表8に例示されるように、トランスサイレチンのmRNAレベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理した細胞において、用量依存的に減少した。また、各オリゴヌクレオチドのIC₅₀も表8に示される。

【0459】

【表 8】

表 8

エレクトロポレーションを用いた、He p 3 B細胞におけるヒトトランスサイレチンの用量依存的なアンチセンス阻害

ISIS 番号	0.0206 μ M	0.062 μ M	0.185 μ M	0.556 μ M	1.667 μ M	5 μ M	IC ₅₀ (μ M)
304299	27	2	25	52	76	96	0.5
420915	0	12	27	30	69	93	0.8
425653	23	13	55	86	88	91	0.1
425655	3	30	32	62	84	94	0.3
425656	0	0	29	66	82	95	0.5
425679	0	21	36	71	92	97	0.3
425695	37	23	63	79	94	98	0.1
425736	31	43	40	64	82	95	0.1
425737	0	13	62	82	95	98	0.2
425755	17	8	18	69	86	98	0.4
425757	22	47	53	79	96	98	0.2

10

【0460】

20

実施例 6：ヒトトランスサイレチン-トランスジェニックマウスの初期肝細胞における、ヒトトランスサイレチンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの用量反応確認

また、ヒトトランスサイレチン-トランスジェニックマウスの初期肝細胞においても、実施例 5 から得られたギャップマーを種々の用量で試験した。ISIS 304309、ISIS 304311、ISIS 304312 および ISIS 420951（実施例 2 参照）はまた、同一の培養条件下で、これらのギャップマーと一緒に再試験された。細胞を 1 ウェル当たり 10,000 細胞の密度で播種し、表 9 で規定されるように、18.75 nM、37.5 nM、75 nM、150 nM および 300 nM の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドと一緒に、サイトフェクチンを用いてトランスフェクトした。およそ 16 時間の処理期間の後、RNA を細胞から単離し、トランスサイレチンの mRNA レベルを定量的リアルタイム PCR によって測定した。ヒトトランスサイレチンのプライマープロブセット RTS1396 を使用して mRNA レベルを測定した。トランスサイレチンの mRNA レベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定される全 RNA 含量に従って補正した。結果を、未処理対照群細胞と比較したトランスサイレチンの阻害率（%）として示す。表 9 に例示されるように、トランスサイレチンの mRNA レベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理した細胞において、用量依存的に減少した。

30

【0461】

【表 9】

表 9

サイトフェクチンを用いた、マウス初期肝細胞におけるヒトトランスサイレチンの用量依存的なアンチセンス阻害

ISIS 番号	18.75nM	37.5nM	75nM	150nM	300nM	モチーフ
304299	54	79	97	98	99	5-10-5
304309	48	77	94	99	99	5-10-5
304311	45	79	92	96	98	5-10-5
304312	33	71	89	96	98	5-10-5
420915	40	70	92	98	99	5-10-5
420951	41	86	96	98	99	5-10-5
425653	44	81	93	96	99	5-10-5
425655	61	88	96	99	99	3-14-3
425656	61	84	94	98	99	3-14-3
425679	74	78	97	98	99	3-14-3
425695	66	84	96	98	99	2-13-5
425736	58	84	95	98	99	4-11-5
425737	57	77	95	98	99	4-11-5
425755	61	82	96	99	99	4-11-5
425757	37	77	93	98	98	4-11-5

【0462】

実施例 7：Hep G 2 細胞における、ヒトトランスサイレチンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの用量反応確認

実施例 6 から得られたギャップマーを、Hep G 2 細胞において種々の濃度で試験した。細胞を 1 ウェル当たり 10,000 細胞の密度で播種し、表 10 で規定されるように、0.062 μ M、0.185 μ M、0.556 μ M、1.66 μ M および 5.000 μ M の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドと一緒に、エレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。およそ 16 時間の処理期間の後、RNA を細胞から単離し、トランスサイレチンの mRNA レベルを定量的リアルタイム PCR によって測定した。ヒトトランスサイレチンのプライマープロブセット RTS1396 を使用して mRNA レベルを測定した。トランスサイレチンの mRNA レベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定される全 RNA 含量に従って補正した。結果を、未処理対照群細胞と比較したトランスサイレチンの阻害率（％）として示す。表 10 に例示されるように、トランスサイレチンの mRNA レベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理した細胞において、用量依存的に減少した。

【0463】

【表 10】

表 10

エレクトロポレーションを用いた、HepG2細胞におけるヒトトランスサイレチンの用量依存的なアンチセンス阻害

ISIS 番号	0.062 μ M	0.185 μ M	0.556 μ M	1.667 μ M	5.000 μ M	IC ₅₀ (μ M)	モチーフ
304299	55	66	72	87	96	0.037	5-10-5
304309	41	65	72	91	96	0.087	5-10-5
304311	57	83	88	89	83	0.001	5-10-5
304312	46	69	74	84	81	0.038	5-10-5
420915	38	62	80	90	98	0.096	5-10-5
420951	45	71	84	93	97	0.049	5-10-5
425653	48	73	87	88	82	0.017	5-10-5
425655	40	57	77	85	95	0.105	3-14-3
425656	28	54	70	94	97	0.177	3-14-3
425679	43	51	81	95	99	0.106	3-14-3
425695	49	67	90	96	99	0.043	2-13-5
425736	32	63	85	95	98	0.108	4-11-5
425737	42	71	90	98	99	0.053	4-11-5
425755	24	63	85	95	99	0.137	4-11-5
425757	21	62	86	96	99	0.148	4-11-5

【0464】

実施例 8：ヒトトランスサイレチン-トランスジェニックマウスの初期肝細胞における、ヒトトランスサイレチンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの用量反応確認
 また、実施例 6 から得られたギャップマーを、ヒトトランスサイレチン-トランスジェニックマウスの初期肝細胞においても種々の用量で試験した。細胞を 1 ウェル当たり 100,000 細胞の密度で播種し、表 11 で規定されるように、5 nM、10 nM、20 nM、40 nM および 80 nM の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドと一緒に、サイトフェクチンを用いてトランスフェクトした。およそ 16 時間の処理期間の後、RNA を細胞から単離し、トランスサイレチンの mRNA レベルを定量的リアルタイム PCR によって測定した。ヒトトランスサイレチンのプライマープロブセット RTS3029 を使用して mRNA レベルを測定した。トランスサイレチンの mRNA レベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定される全 RNA 含量に従って補正した。結果を、未処理対照群細胞と比較したトランスサイレチンの阻害率（％）として示す。表 11 に例示されるように、トランスサイレチンの mRNA レベルは、アンチセンスオリゴヌクレオチド処理した細胞において、用量依存的に減少した。

【0465】

【表 1 1】

表 1 1

サイトフェクチンを用いた、マウス初期肝細胞におけるヒトトランスサイレチンの用量依存的なアンチセンス阻害

ISIS 番号	5nM	10nM	20nM	40nM	80nM	モチーフ
304299	0	8	37	69	90	5-10-5
304309	0	9	39	75	93	5-10-5
304311	1	13	43	70	81	5-10-5
304312	0	3	32	64	76	5-10-5
420915	0	0	34	59	87	5-10-5
420951	0	12	57	84	92	5-10-5
425653	0	9	44	72	84	5-10-5
425655	0	19	45	80	91	3-14-3
425656	0	2	33	70	93	3-14-3
425679	0	13	42	72	90	3-14-3
425695	3	12	33	70	90	2-13-5
425736	2	7	37	70	89	4-11-5
425737	0	4	36	65	89	4-11-5
425755	0	25	50	75	94	4-11-5
425757	0	5	43	72	92	4-11-5

【0 4 6 6】

ギャップマーはまた、エレクトロポレーションを用いて、トランスフェクション試薬として試験された。細胞を1ウェル当たり35,000細胞の密度で播種し、表12で規定されるように、148.148nM、444.444nM、1,333.333nM、4,000nMおよび12,000nMの濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドと一緒に、エレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。およそ16時間の処理期間の後、RNAを細胞から単離し、トランスサイレチンのmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRによって測定した。ヒトトランスサイレチンのプライマープローブセットRTS3029を使用してmRNAレベルを測定した。トランスサイレチンのmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定される全RNA含量に従って補正した。結果を、未処理対照群細胞と比較したトランスサイレチンの阻害率（％）として示す。

【0 4 6 7】

【表 1 2】

表 1 2

エレクトロポレーションを用いた、マウス初期肝細胞におけるヒトトランスサイレチンの用量依存的なアンチセンス阻害

ISIS 番号	148.148nM	444.444nM	1333.333nM	4000nM	12000nM	モチーフ
304299	75	96	98	98	99	5-10-5
304309	72	96	98	98	98	5-10-5
304311	68	92	93	94	97	5-10-5
304312	50	84	92	93	97	5-10-5
420915	55	89	96	96	97	5-10-5
420951	65	92	95	96	98	5-10-5
425653	68	89	91	93	95	5-10-5
425655	63	94	96	96	96	3-14-3
425656	69	93	98	98	98	3-14-3
425679	63	92	97	98	98	3-14-3
425695	69	92	96	96	95	2-13-5
425736	75	93	96	96	96	4-11-5
425737	71	94	96	96	95	4-11-5
425755	70	93	95	95	95	4-11-5
425757	61	91	95	95	95	4-11-5

【0 4 6 8】

実施例 9：カニクイザル初期肝細胞における、ヒトトランスサイレチンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの用量反応確認

また、実施例 6 から得られたギャップマーを、カニクイザルの初期肝細胞においても種々の用量で試験した。細胞を 1 ウェル当たり 35, 000 細胞の密度で播種し、表 1 3 で規定されるように、1, 250 nM、2, 500 nM、5, 000 nM、10, 000 nM および 20, 000 nM の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドと一緒に、エレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。およそ 16 時間の処理期間の後、RNA を細胞から単離し、トランスサイレチンの mRNA レベルを定量的リアルタイム PCR によって測定した。ヒトトランスサイレチンのプライマープローブセット RTS1396 を使用して mRNA レベルを測定した。トランスサイレチンの mRNA レベルを、RIBO GREEN (登録商標) により測定される全 RNA 含量に従って補正した。結果を、未処理対照群細胞と比較したトランスサイレチンの阻害率 (%) として示す。表 1 3 に例示されるように、トランスサイレチンの mRNA レベルは、ISIS オリゴヌクレオチドで処理された肝細胞において用量依存的に有意に減少した。

【0 4 6 9】

NCBI データベース中にカニクイザルの完全遺伝子配列が存在せず、2 つの種は同じ属、「マカク属」に由来するため、オリゴヌクレオチドはアカゲザル遺伝子配列に対する交差反応について試験された。ヒトオリゴヌクレオチドは、本明細書で配列番号 4 (GENBANK 受託番号 NW_001105671. 1 から抽出されたエキソン 1 ~ 4) と指定されるアカゲザルトランスサイレチン遺伝子と交差反応性である。「ミスマッチ」とは、ヒトオリゴヌクレオチドとアカゲザルトランスサイレチン遺伝子間のミスマッチの数を意味する。「n/a」とは、ヒトオリゴヌクレオチドが、アカゲザルトランスサイレチン遺伝子とのミスマッチを 4 個以上有しており、それ故アカゲザルトランスサイレチン遺伝子と交差反応しないことを意味する。

【0 4 7 0】

【表 1 3】

表 1 3

エレクトロポレーションを用いた、アカゲザル初期肝細胞におけるヒトトランスサイレチンの用量依存的なアンチセンス阻害

ISIS 番号	1,250nM	2,500nM	5,000nM	10,000nM	20,000nM	IC ₅₀ (μ M)	アカゲザル標的 開始部位	アカゲザル標的 終結部位	ミスマッチ
304299	21	45	69	80	95	3.1	504	523	0
304309	53	66	79	85	93	<1.25	575	594	0
304311	75	78	82	86	90	<1.25	594	613	0
304312	37	53	65	75	80	2.3	595	614	0
420915	59	54	77	87	94	<1.25	505	524	0
420951	67	77	91	93	96	<1.25	578	597	0
425653	56	72	84	83	85	<1.25	593	612	0
425655	0	7	0	21	45	>20	478	497	2
425656	41	20	38	53	51	8.7	479	498	2
425679	68	74	88	94	98	<1.25	578	597	0
425695	42	29	41	49	65	25.8	478	497	2
425736	36	27	37	49	74	8.2	479	498	2
425737	76	78	89	95	97	<1.25	501	520	0
425755	79	80	92	94	97	<1.25	578	597	0
425757	68	74	88	95	96	<1.25	580	599	0

【0 4 7 1】

実施例 10：ヒトトランスサイレチントランスジェニックマウスにおける、ヒトトランスサイレチンの *in vivo* での阻害

トランスサイレチン mRNA の有意な阻害を示す実施例 6 から得られたギャップマーを、ヒトトランスサイレチン遺伝子を含むトランスジェニックマウスにおいて試験し、該ギャップマーの有効性を評価した。

【0 4 7 2】

処置

4 匹の hTTR トランスジェニック雌マウスを 15 群用意し、それぞれに、25 mg/kg の ISIS 304299、ISIS 304309、ISIS 304311、ISIS 304312、ISIS 420915、ISIS 420951、ISIS 425653、ISIS 425655、ISIS 425656、ISIS 425679、ISIS 425695、ISIS 425736、ISIS 425737、ISIS 425755、または ISIS 425757 を、週 2 回、4 週間、皮下に投与した。別の群の 4 匹の hTTR トランスジェニック雌マウスには、25 mg/kg の対照オリゴヌクレオチド ISIS 141923 (CCTTCCCTGAAGGTTCCTCC、本明細書では配列番号 165 と指定される) を、週に 2 回、4 週間、注射した。別の群の 4 匹の hTTR トランスジェニック雌マウスには、PBS を週 2 回 4 週間、皮下に注射した。PBS を注射されたマウスは対照群として利用された。血漿トランスサイレチンレベル分析のために、0、1、2、3、および 4 週目に、血液試料を全ての群から採取した。最終投与から 2 日後にマウスを屠殺し、標的 mRNA 分析のために肝臓を採取した。

【0 4 7 3】

RNA 分析

プライマープローブセット RTS 3029 を用いてトランスサイレチンのリアルタイム P

C R分析を行うために、R N Aを肝臓組織から抽出した。結果を、P B S対照と比較したヒトトランスサイレチンの阻害率（％）として示す。表 1 4で示されるように、I S I Sアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理することにより、P B S対照と比較してヒトトランスサイレチンのm R N Aが有意に減少した。対照オリゴヌクレオチドI S I S 1 4 1 9 2 3での処理では、予想通り、トランスサイレチンは有意に減少しなかった。

【 0 4 7 4 】

【表 1 4】

表 1 4

P B S対照と比較したh T T Rトランスジェニックマウスの肝臓におけるヒトトランスサイレチンm R N Aの阻害

ISIS 番号	阻害率（％）
304299	79
304309	83
304311	63
304312	64
420915	82
420951	92
425653	66
425655	76
425656	76
425679	93
425695	82
425736	63
425737	76
425755	91
425757	91
141923	28

【 0 4 7 5 】

タンパク質分析

トランスジェニックマウスの血漿中におけるヒトトランスサイレチンのタンパク質レベルを、抗トランスサイレチンポリクローナル抗体（A b c a m社製A b 3 7 7 7 4）およびヒッジ抗T T Rホースラディッシュペルオキシダーゼ検出抗体（A b c a m社カタログ番号3 5 2 1 7）を用いてE L I S Aにより測定した。I m m u n o P u r e（登録商標）T M B基質キットにより呈色反応を起こし、吸光度をマイクロプレート分光光度計を用いて4 5 0 n mで測定した。血漿試料を、投与前並びに7日目、1 4日目および2 8日目に採取した。表 1 5に示される結果は投与前レベルと比較した阻害率（％）を表わしており、I S I Sオリゴヌクレオチド処理でのタンパク質レベルにおける時間依存的な減少を示している。

【 0 4 7 6 】

【表 1 5】

表 1 5

投与前のレベルと比較した、h T T Rトランスジェニックマウスの血漿におけるヒトトランスサイレチンタンパク質の阻害

	PBS	ISIS30429 9	ISIS30430 9	ISIS42091 5	ISIS42095 1	ISIS42567 9	ISIS42569 5	ISIS42575 5	ISIS14192 3
7 日目	0	50	63	71	92	99	69	57	3
14 日目	3	76	78	90	98	100	80	72	3
21 日目	20	88	81	95	100	99	88	78	13
28 日目	13	89	83	98	100	100	91	79	8

10

【 0 4 7 7 】

体重および臓器重量

マウスの体重を投与前と処置期間の最後に測定した。体重は表 1 6 に示され、処置開始前に測定した P B S 対照の体重を超えた分の増加率 (%) を表わしている。肝臓、脾臓および腎臓の重量を検査の最後に測定し、またそれらも P B S 対照の各臓器体重を超えた分の増加率として表 1 6 に示す。表 1 6 で示されるように、体重または臓器重量に、アンチセンスオリゴヌクレオチド処置の結果としての有意な変化はなかった。

【 0 4 7 8 】

20

【表 1 6】

表 1 6

アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後のトランスジェニックマウスの体重および臓器重量における割合 (%) 変化

	体重	肝臓	脾臓	腎臓
PBS	1.1	1.0	1.0	1.0
ISIS304299	1.1	1.1	1.0	0.8
ISIS304309	1.1	1.1	1.0	1.0
ISIS304311	1.1	1.2	1.0	1.2
ISIS304312	1.1	1.3	1.0	0.8
ISIS420915	1.1	1.1	1.0	1.1
ISIS420951	1.1	1.2	1.0	1.5
ISIS425653	1.1	1.1	0.9	1.0
ISIS425655	1.1	1.3	1.0	1.2
ISIS425656	1.2	1.3	1.0	1.3
ISIS425679	1.2	1.2	1.0	1.6
ISIS425695	1.1	1.3	1.0	1.0
ISIS425736	1.2	1.2	1.0	1.0
ISIS425737	1.1	1.2	1.1	1.2
ISIS425755	1.2	1.3	1.1	1.3
ISIS425757	1.1	1.9	1.0	1.5
ISIS141923	1.1	1.1	1.0	0.8

30

40

【 0 4 7 9 】

肝機能

肝機能に対する I S I S オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、トランスアミナ

50

ーゼの血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリンパスAU400e、ニューヨーク州メルビル）を用いて測定した。ALT（アラニントランスアミナーゼ）およびAST（アスパラギン酸トランスアミナーゼ）の血漿中濃度を測定し、その結果をIU/L表示で表17に示す。また、ビリルビンの血漿中レベルを同じ臨床化学分析機を用いて測定し、その結果もmg/dL表示で表17に示す。

【0480】

【表17】

表17

トランスジェニックマウスの肝臓における代謝マーカーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ビリルビン (mg/dL)
PBS	31	78	0.23
ISIS304299	40	121	0.19
ISIS304309	38	119	0.20
ISIS304311	34	60	0.16
ISIS304312	43	67	0.17
ISIS420915	34	75	0.26
ISIS420951	75	124	0.17
ISIS425653	35	78	0.20
ISIS425655	131	109	0.16
ISIS425656	68	110	0.19
ISIS425679	119	180	0.20
ISIS425695	43	69	0.15
ISIS425736	23	58	0.16
ISIS425737	35	64	0.19
ISIS425755	109	162	0.16
ISIS425757	1904	937	0.24
ISIS141923	31	76	0.19

【0481】

腎機能

腎機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、血中尿素窒素（BUN）の血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリンパスAU400e、ニューヨーク州メルビル）を用いて測定した。結果をmg/dL表示で表18に示す。そのデータにより、トランスサイレチンのアンチセンス阻害は、これらのトランスジェニックマウスにおけるBUNレベルに対して効果がないことが示される。

【0482】

【表 18】

表 18

トランスジェニックマウスの腎臓におけるBUN (mg/dL)
に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果

	BUN (mg/dL)
PBS	26
ISIS304299	24
ISIS304309	29
ISIS304311	28
ISIS304312	26
ISIS420915	25
ISIS420951	25
ISIS425653	24
ISIS425655	28
ISIS425656	25
ISIS425679	26
ISIS425695	28
ISIS425736	25
ISIS425737	23
ISIS425755	24
ISIS425757	25
ISIS141923	23

10

20

【0483】

実施例 11：CD1 マウスにおける、ヒトトランスサイレチンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの忍容性

CD1（登録商標）マウス（チャールス・リバー社、マサチューセッツ州）は多目的なマウスモデルであり、しばしば安全性および効力試験に利用される。マウスを実施例 10 に記載された検査から選択される ISIS アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、種々の代謝マーカーのレベル変化について評価した。

30

【0484】

処置

CD1 マウス 8 匹からなる群のそれぞれに、50 mg/kg の ISIS304299、ISIS304309、ISIS420915、ISIS420951、ISIS425655、ISIS425656、ISIS425679、ISIS425695、ISIS425736、ISIS425737、および ISIS425755 を、週 2 回皮下に注射した。各グループのマウス 4 匹を、処理期間の 2 週目および 6 週目に評価した。各時点での最終投与から 3 日後に、体重を測定し、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

【0485】

体重および臓器重量

投与前および各処理期間（2 週目および 6 週目）の最後に、マウスの体重を測定した。体重は表 19 および 20 に示され、処置開始前に測定した PBS 対照の体重を超えた分の増加率（%）として表記される。肝臓、脾臓および腎臓の重量を検査の最後に測定し、また、PBS 対照の各臓器体重を超えた分の変化率（%）として表 19 および 20 に示す。

【0486】

【表 19】

表 19

アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後のCD1マウスの体重および臓器重量における第2週目での変化 (%)

	体重	肝臓	脾臓	腎臓
PBS	1.1	1.0	1.0	1.0
ISIS304299	1.1	1.1	1.1	1.1
ISIS304309	1.1	1.1	1.1	1.0
ISIS420915	1.1	1.1	1.1	1.0
ISIS420951	1.1	1.3	1.7	1.2
ISIS425655	1.1	1.2	1.2	0.9
ISIS425656	1.1	1.1	1.1	1.0
ISIS425679	1.1	1.1	1.4	1.1
ISIS425695	1.1	1.1	0.9	1.1
ISIS425736	1.1	1.1	1.0	1.1
ISIS425737	1.2	1.1	1.1	1.1
ISIS425755	1.2	1.2	1.3	1.2

【0487】

【表 20】

表 20

アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後のCD1マウスの体重および臓器重量における第6週目での変化 (%)

	体重	肝臓	脾臓	腎臓
PBS	1.2	1.0	1.0	1.0
ISIS304299	1.3	1.2	1.4	1.0
ISIS304309	1.3	1.3	2.0	1.0
ISIS420915	1.3	1.1	1.5	0.9
ISIS420951	1.3	1.3	2.0	1.1
ISIS425655	1.4	1.3	1.7	0.9
ISIS425656	1.3	1.3	1.1	1.0
ISIS425679	1.3	1.4	2.3	1.2
ISIS425695	1.3	1.4	1.5	1.0
ISIS425736	1.3	1.1	1.2	0.9
ISIS425737	1.2	1.1	1.3	1.0
ISIS425755	1.3	1.3	2.1	1.0

【0488】

肝機能

肝機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、トランスアミナーゼの血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリンパスAU400e、ニューヨーク州メルビル）を用いて測定した。ALT（アラニントランスアミナーゼ）およびAST（アスパラギン酸トランスアミナーゼ）の血漿中濃度を測定し、結果を表21および表22にIU/L表示で示す。また、ビリルビンおよびアルブミンの血漿中レベルも同じ臨床化

10

20

30

40

50

学分析機を用いて測定し、その結果も表 2 1 および 2 2 に示す。

【 0 4 8 9 】

【表 2 1】

表 2 1

CD 1 マウスの肝臓における代謝マーカーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療
の第 2 週目での効果

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ビリルビン (mg/dL)	アルブミン (g/dL)
PBS	38	66	0.19	5.0
ISIS304299	42	79	0.33	3.8
ISIS304309	52	77	0.22	3.2
ISIS420915	32	61	0.28	3.5
ISIS420951	1184	804	0.17	3.7
ISIS425655	60	70	0.20	3.9
ISIS425656	37	53	0.31	3.5
ISIS425679	88	147	0.23	3.7
ISIS425695	25	50	0.23	3.6
ISIS425736	31	79	0.23	3.2
ISIS425737	39	43	0.23	3.1
ISIS425755	104	85	0.29	3.6

【 0 4 9 0 】

【表 2 2】

表 2 2

CD 1 マウスの肝臓における代謝マーカーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療
の第 6 週目での効果

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ビリルビン (mg/dL)	アルブミン (g/dL)
PBS	31	67	0.20	5.6
ISIS304299	54	71	0.20	5.2
ISIS304309	1211	504	0.30	5.2
ISIS420915	89	91	0.17	5.0
ISIS420951	872	319	0.20	3.6
ISIS425655	730	247	0.13	4.3
ISIS425656	502	261	0.17	4.3
ISIS425679	935	475	0.29	4.5
ISIS425695	1627	563	0.16	4.0
ISIS425736	41	47	0.15	4.1
ISIS425737	32	55	0.16	4.1
ISIS425755	233	176	0.16	4.3

【 0 4 9 1 】

腎機能

腎機能に対する I S I S オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、血中尿素窒素 (BUN) およびクレアチニンの血漿中濃度を、自動臨床化学分析機 (日立オリンパス AU 400 e、ニューヨーク州メルビル) を用いて測定した。結果を mg / d L 表示で表 2 3 および 2 4 に示す。

【 0 4 9 2 】

【表 2 3】

表 2 3

CD 1 マウスの腎臓における代謝マーカーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の第 2 週目での効果 (mg / d L)

	BUN	クレアチニン
PBS	32	0.23
ISIS304299	26	0.21
ISIS304309	30	0.19
ISIS420915	30	0.22
ISIS420951	24	0.17
ISIS425655	29	0.22
ISIS425656	25	0.19
ISIS425679	28	0.19
ISIS425695	29	0.19
ISIS425736	24	0.19
ISIS425737	24	0.16
ISIS425755	27	0.17

【 0 4 9 3 】

【表 2 4】

表 2 4

CD 1 マウスの腎臓における代謝マーカーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の第 6 週目での効果 (mg / d L)

	BUN	クレアチニン
PBS	24	0.15
ISIS304299	19	0.11
ISIS304309	20	0.14
ISIS420915	24	0.18
ISIS420951	19	0.08
ISIS425655	22	0.11
ISIS425656	21	0.10
ISIS425679	20	0.06
ISIS425695	21	0.08
ISIS425736	22	0.07
ISIS425737	18	0.07
ISIS425755	22	0.09

【 0 4 9 4 】

血液学的分析

全マウス群より得た血液を、ヘマトクリット (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、および平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) の測定および分析、加えて WBC (好中球、リンパ球、および単球)、RBC、および血小板等の血液細胞百分率数並びに総ヘモグロビン量の測定のために、アンテック・ダイアグノスティクス社 (Antech Diagnostics) へ送った。結果を表 2 5 ~ 2 8 に示す。表中のパーセンテージは、PBS 対照と比較した総血液細胞数における増減率を表わす。PBS

10

20

30

40

50

対照の70%未満に血小板数を減少させなかった、または単球数を2倍より多くに増加させなかったアンチセンスオリゴヌクレオチドを、さらなる試験のために選択した。

【0495】

【表25】

表25

PBS対照と比較したCD1マウスにおける全血球計算値に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の第2週目での効果(%)

ISIS 番号.	WBC	RBC	ヘモグロビン	HCT	MCV	MCH	MCHC
304299	-15	-3	-2	0	+3	+1	-1
304309	-13	-4	-7	-6	-2	-4	-2
420915	+7	-7	-7	-5	+2	+1	-2
420951	+79	-6	-5	-5	+1	+1	0
425655	+56	-3	-5	-4	-1	-2	-1
425656	+69	-5	-6	-5	0	-1	-2
425679	+30	-6	-7	-7	-1	-1	0
425695	+49	-3	-4	-4	0	0	+1
425736	+15	-6	-6	-4	+1	0	-2
425737	+19	-5	-7	-5	-1	-3	-2
425755	+85	-3	-6	-6	-4	-3	0

【0496】

【表26】

表26

PBS対照と比較したCD1マウスにおける全血球計算値に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の第6週目での効果(%)

ISIS 番号.	WBC	RBC	ヘモグロビン	HCT	MCV	MCH	MCHC
304299	-7	-9	-10	-13	-5	0	+4
304309	+10	-12	-11	-15	-5	+1	+6
420915	+11	-7	-8	-10	-4	-2	+2
420951	+81	-12	-20	-19	-9	-9	-1
425655	+29	-3	-11	-10	-8	-9	-2
425656	+72	-1	-5	-6	-4	-5	-1
425679	+154	-11	-20	-21	-10	-9	+2
425695	+118	+3	-9	-9	-2	-12	+3
425736	+51	+4	-5	-7	0	-10	+1
425737	+30	+8	-1	-2	0	-8	+1
425755	+54	-1	-11	-12	-8	-10	0

【0497】

【表 2 7】

表 2 7

PBS対照と比較したCD1マウスにおける血液細胞百分率数に対する
アンチセンスオリゴヌクレオチド治療の第2週目での効果 (%)

ISIS 番号.	好中球	単球	リンパ球	血小板
304299	11	-3	20	17
304309	-11	5	8	14
420915	1	4	-24	41
420951	18	-7	32	-9
425655	18	-5	20	18
425656	31	-7	-4	24
425679	2	-1	24	-19
425695	-50	15	20	29
425736	8	-1	0	10
425737	-29	10	-8	24
425755	-13	7	-4	9

10

20

【0 4 9 8】

【表 2 8】

表 2 8

PBS対照と比較したCD1マウスにおける血液細胞百分率数に対するア
ンチセンスオリゴヌクレオチド治療の第6週目での効果 (%)

ISIS 番号.	好中球	リンパ球	単球	血小板
304299	-60	+26	+10	-16
304309	-28	+12	+30	+2
420915	-29	+6	+50	-30
420951	-26	+11	0	-40
425655	-16	+8	-10	-19
425656	-22	+16	-50	-25
425679	-36	+19	-20	-27
425695	-25	+9	-15	-49
425736	-41	+16	-5	-46
425737	-53	+23	-20	-65
425755	-20	+4	+25	-41

30

40

【0 4 9 9】

実施例 1 2 : CD1マウス肝臓における、アンチセンスオリゴヌクレオチドの半減期測定

マウスを、実施例 1 1 に記載される試験から得られた ISIS アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、オリゴヌクレオチド半減期並びに肝臓からオリゴヌクレオチドが分解および除去されるのに要する経過時間を評価した。

【0 5 0 0】

処置

CD1マウス 1 2 匹からなる群にそれぞれ、50 mg / k g の ISIS 3 0 4 2 9 9、

50

ISIS304309、ISIS420915、ISIS420951、ISIS425655、ISIS425656、ISIS425679、ISIS425695、ISIS425736、ISIS425737、およびISIS425755を、週2回を2週間、皮下に注射した。各群から4匹のマウスを、最終投与後の3日目、28日目および56日目に屠殺した。肝臓を分析のために採取した。

【0501】

オリゴヌクレオチド濃度の測定

完全長オリゴヌクレオチドの濃度および総オリゴヌクレオチド濃度（分解された形態も含む）を測定した。使用された方法は既刊の方法を改変したものであり（Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999）、フェノールクロロホルム（液-液）抽出とそれに続く固相抽出から成る。内部標準（ISIS355868、27塩基長の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、GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTTTT、本明細書では配列番号166と指定される）を抽出前に加えた。組織試料濃度を、定量下限（LLOQ）がおよそ1.14 μg/gである検量線を用いて計算した。続いて、半減期をWinNonlinソフトウェア（ファースイト社（PHARSLIGHT））を用いて計算した。

【0502】

結果をμg/肝臓組織のg表示で表29および30に示す。各オリゴヌクレオチドの半減期を表31に示す。11～34日以内の半減期を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを、さらなる試験のために選択した。

【0503】

【表29】

表29

CD1マウスの肝臓における完全長オリゴヌクレオチド濃度（μg/g）

ISIS 番号.	3 日目	28 日目	56 日目
304299	180	56	8
304309	317	254	106
420915	248	126	34
420951	173	109	49
425655	191	113	33
425656	256	73	29
425679	201	73	27
425695	315	194	65
425736	219	110	47
425737	190	40	9
425755	211	120	47

【0504】

【表 3 0】

表 3 0

CD 1 マウスの肝臓における総
オリゴヌクレオチド濃度 (µg /
g)

ISIS 番号.	3 日目	28 日目	56 日目
304299	268	168	38
304309	389	354	152
420915	314	229	83
420951	262	196	131
425655	298	217	87
425656	328	135	85
425679	333	161	103
425695	364	263	143
425736	298	211	140
425737	266	117	31
425755	337	227	140

10

20

【 0 5 0 5】

【表 3 1】

表 3 1

CD 1 マウスの肝臓におけるオリゴヌクレオチ
ド半減期 (日)

ISIS 番号.	半減期 (日)
304299	12
304309	33
420915	19
420951	29
425655	21
425656	17
425679	18
425695	23
425736	24
425737	12
425755	24

30

40

【 0 5 0 6】

実施例 1 3 : スプラッグドローラットにおける、ヒトトランスサイレチンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの忍容性

スプラッグドローラットを、実施例 1 1 および 1 2 に記載された検査から選択された ISIS アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、種々の代謝マーカーのレベル変化について評価した。

【 0 5 0 7】

処置

50

ラットの体重、全血球計算値および差分血球数 (different blood count)、並びに尿蛋白／クレアチニン比を投与前に評価した。スプラグドローリーラット4匹からなる群にそれぞれ、50 mg/kgのISIS304299、ISIS304309、ISIS420915、ISIS420951、ISIS425655、ISIS425656、ISIS425679、ISIS425695、ISIS425736、ISIS425737、およびISIS425755を、週2回皮下に注射した。各時点での最終投与から3日後に、体重を測定し、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。

【0508】

体重および臓器重量

10

ラットの体重を投与前および処理期間の最後に測定した。体重は表32に示され、処置開始前に測定したPBS対照の体重を超えた分の増加率として表記した。肝臓、脾臓および腎臓の重量を検査の最後に測定し、またこれもPBS対照の各臓器体重を超えた分の変化率として表32に示す。

【0509】

【表32】

表32

アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後のスプラグドローリー
ラットの体重および臓器重量における変化 (%)

20

	体重	肝臓	脾臓	腎臓
PBS	1.6	1.0	1.0	1.0
ISIS304299	1.2	1.7	4.9	1.6
ISIS304309	1.1	1.6	4.3	1.4
ISIS420915	1.4	1.4	3.3	1.3
ISIS420951	1.1	1.4	5.0	1.5
ISIS425655	1.2	1.5	3.4	1.3
ISIS425656	1.2	1.5	2.9	1.2
ISIS425679	1.0	1.9	6.4	1.7
ISIS425695	1.2	1.6	3.3	1.3
ISIS425736	1.3	1.5	2.9	1.2
ISIS425737	1.2	1.7	4.0	1.5
ISIS425755	1.0	1.5	5.4	1.5

30

【0510】

表32で示されるように、ある化合物は脾臓重量において4倍未満の増加を示した。

【0511】

肝機能

40

肝機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、トランスアミナーゼの血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリパスAU400e、ニューヨーク州メルビル）を用いて測定した。ALT（アラニントランスアミナーゼ）およびAST（アスパラギン酸トランスアミナーゼ）の血漿中濃度を測定し、その結果をIU/L表示で表33に示す。また、ビリルビンおよびアルブミンの血漿中レベルを同じ臨床化学分析機を用いて測定し、その結果も表33に示す。

【0512】

【表 3 3】

表 3 3

スプラッグドローリーラットの肝臓における代謝マーカーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ビリルビン (mg/dL)	アルブミン (g/dL)
PBS	55	138	0.15	3.3
ISIS304299	69	154	0.15	2.7
ISIS304309	80	138	0.11	2.9
ISIS420915	43	95	0.11	3.0
ISIS420951	353	511	0.32	2.6
ISIS425655	312	497	0.47	2.6
ISIS425656	277	335	0.20	3.0
ISIS425679	537	659	0.38	2.7
ISIS425695	228	445	0.23	2.3
ISIS425736	362	553	0.32	2.9
ISIS425737	55	79	0.09	1.9
ISIS425755	271	303	0.41	2.8

10

【0 5 1 3】

腎機能

腎機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、血中尿素窒素（BUN）およびクレアチニンの血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリンパスAU400e、ニューヨーク州メルビル）を用いて測定した。結果をmg/dL表示で表34に示す。また、クレアチニンに対する全尿蛋白の割合を評価し、表35に示す。

20

【0 5 1 4】

【表 3 4】

表 3 4

スプラッグドローリーラットの腎臓における代謝マーカーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果 (mg/dL)

	BUN	クレアチニン
PBS	20	0.26
ISIS304299	30	0.40
ISIS304309	24	0.33
ISIS420915	20	0.26
ISIS420951	37	0.47
ISIS425655	28	0.40
ISIS425656	25	0.34
ISIS425679	46	0.42
ISIS425695	30	0.37
ISIS425736	26	0.37
ISIS425737	30	0.36
ISIS425755	29	0.36

30

40

【0 5 1 5】

【表 3 5】

表 3 5

スプラッグドローリーラットの腎臓における全尿蛋白／クレアチニンに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果

	投与前	第 6 週
PBS	0.82	0.95
ISIS304299	0.95	7.57
ISIS304309	1.10	5.20
ISIS420915	0.91	5.30
ISIS420951	0.90	5.02
ISIS425655	0.78	6.03
ISIS425656	0.86	9.37
ISIS425679	0.91	7.80
ISIS425695	0.89	5.71
ISIS425736	1.00	5.85
ISIS425737	0.86	43.76
ISIS425755	0.78	3.70

10

20

【0 5 1 6】

表 3 4 および 3 5 に示されるように、ある化合物は、これらラットの腎臓における全尿蛋白／クレアチニンにおいて 7 倍未満の増加を示した。さらに、ある化合物は、これらラットの腎臓における全尿蛋白／クレアチニンにおいて 6 倍未満の増加を示した。

【0 5 1 7】

血液学的分析

全マウス群より得た血液を、ヘマトクリット (H C T)、平均赤血球容積 (M C V)、平均赤血球ヘモグロビン量 (M C H)、および平均赤血球ヘモグロビン濃度 (M C H C) の測定および分析、加えて W B C (好中球、リンパ球、および単球)、R B C、および血小板等の血液細胞百分率数並びに総ヘモグロビン量の測定のために、アンテック・ダイアグノスティクス社 (Antech Diagnostics) へ送った。結果を表 3 6 ～ 3 7 に示す。表中のパーセンテージは、P B S 対照と比較した総血液細胞数における増減率を表わす。

30

【0 5 1 8】

【表 3 6】

表 3 6

PBS対照と比較したスプラッグドーリーラットにおける全血球計算値
に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果 (%)

ISIS 番号.	WBC	RBC	ヘモグロビン	HCT	MCV	MCH	MCHC
304299	+4	-5	-3	+2	+11	+5	-5
304309	-10	-8	-11	-12	-4	-3	+1
420915	-9	-16	-20	-17	+1	-3	-3
420951	+5	-5	-8	-5	+1	-2	-3
425655	+22	-17	-18	-19	-2	0	+2
425656	-1	-13	-19	-16	-3	-6	-2
425679	+49	-42	-32	-28	+26	+19	-5
425695	-2	-25	-31	-29	-4	-8	-3
425736	+18	+1	-3	+2	0	-4	-4
425737	-15	-20	-18	-20	+2	+3	+1
425755	+35	-31	-27	-23	+14	+8	-4

10

20

【0 5 1 9】

【表 3 7】

表 3 7

PBS対照と比較したスプラッグドーリーラットにおける全血球計算値
に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果 (%)

ISIS 番号.	好中球	リンパ球	単球	血小板
304299	-61	+15	-10	-41
304309	-35	+8	+10	-37
420915	-23	+6	0	-29
420951	-62	+15	+10	-67
425655	+23	-8	+80	-13
425656	-14	0	+70	-15
425679	-4	-1	+60	-75
425695	+68	-20	+80	-5
425736	0	-2	+70	-1
425737	-6	+1	+20	-21
425755	-18	+3	+70	-58

30

40

【0 5 2 0】

実施例 1 4 : スプラッグドーリーラットの肝臓および腎臓における、アンチセンスオリ
ゴヌクレオチド濃度についての薬物動態試験

スプラッグドーリーラットを実施例 1 3 に記載される試験から得られた ISIS アンチ
センスオリゴヌクレオチドで処置し、オリゴヌクレオチドの半減期並びに肝臓および腎臓
からオリゴヌクレオチドが分解および除去されるのに要する経過時間を評価した。

【0 5 2 1】

処置

スプラッグドーリーラット 4 匹からなる群にそれぞれ、20 mg / kg の ISIS 30

50

4299、ISIS304309、ISIS420915、ISIS420951、ISIS425655、ISIS425656、ISIS425679、ISIS425695、ISIS425736、ISIS425737、およびISIS425755を、週2回を2週間、皮下に注射した。最終投与から3日後、ラットを屠殺し、肝臓および腎臓を分析のために採取した。

【0522】

オリゴヌクレオチド濃度の測定

完全長オリゴヌクレオチドの濃度および総オリゴヌクレオチド濃度（分解された形態も含む）を測定した。使用された方法は既刊の方法を改変したものであり（Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999）、フェノールクロロホルム（液-液）抽出とそれに続く固相抽出から成る。内部標準（ISIS355868、27塩基長の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、GCGTTTGCTCTTCTTCTTGTGCGTTTTTTT、本明細書では配列番号166と指定される）を抽出前に加えた。組織試料濃度を、定量下限（LLOQ）がおよそ1.14 μg/gである検量線を用いて計算した。結果を、μg/肝臓または腎臓組織のg表示で表38および39に示す。また、完全長オリゴヌクレオチドに関して腎臓の肝臓に対する割合を計算し、表38に示す。

【0523】

【表38】

表38

スプラッグドローラットの腎臓および肝臓における完全長オリゴヌクレオチド濃度（μg/g）および比

ISIS 番号.	肝臓	腎臓	腎臓/肝臓比
304299	165	487	2.9
304309	344	606	1.8
420915	171	680	4.0
420951	214	389	1.8
425655	242	466	1.9
425656	286	595	2.1
425679	290	334	1.2
425695	266	566	2.1
425736	245	571	2.3
425737	167	477	2.9
425755	218	379	1.7

【0524】

【表 3 9】

表 3 9

スプラッグドローラットの腎臓および肝臓における総オリ
ゴヌクレオチド濃度 (1 g / g)

ISIS 番号	肝臓	腎臓
304299	208	653
304309	409	803
420915	196	844
420951	348	879
425655	340	764
425656	329	703
425679	461	710
425695	369	843
425736	282	738
425737	195	587
425755	351	886

10

20

【0 5 2 5】

実施例 1 5 : トランスジェニックマウスにおける、ヒトトランスサイレチンの *In vivo* での用量依存的阻害

ヒトトランスサイレチン遺伝子を含むトランスジェニックマウスに、実施例 1 4 に記載される検査から選択される ISIS オリゴヌクレオチドを漸増投与法で投与し、これらマウスにおけるヒトトランスサイレチンの用量依存的阻害の効果を評価した。

【0 5 2 6】

処置

4 匹のマウスからなる群 (2 匹の雄および 2 匹の雌) にそれぞれ、4 mg / kg、10 mg / kg または 25 mg / kg の ISIS 304299、ISIS 420915、ISIS 420951、ISIS 425679、ISIS 425736、ISIS 425737、または ISIS 425755 を、週に 2 回、4 週間、皮下に注射した。4 匹のマウスからなる群 (2 匹の雄および 2 匹の雌) の一つに、25 mg / kg の対照オリゴヌクレオチド、ISIS 141923 を、週に 2 回、4 週間、皮下に注射した 4 匹のマウスからなる対照群 (2 匹の雄および 2 匹の雌) の一つに、PBS を、週に 2 回、4 週間、皮下に注射した。0、7、14、21 および 28 日目に各群から血漿試料を採取した。最終投与から 2 日後、マウスを安楽死させ、臓器をさらなる分析のために採取した。

30

【0 5 2 7】

RNA 分析

プライマープローブセット RTS 3029 を用いてトランスサイレチンのリアルタイム PCR 分析を行うために、RNA を肝臓組織から抽出した。結果を、PBS 対照と比較したヒトトランスサイレチンの阻害率として示す。表 40 で示されるように、ISIS アンチセンスオリゴヌクレオチドでの処置により、ヒトトランスサイレチン mRNA が PBS 対照と比較して用量依存的に有意に減少した。対照オリゴヌクレオチド ISIS 141923 での処理では、予想通り、トランスサイレチンは有意に減少しなかった。

40

【0 5 2 8】

【表 4 0】

表 4 0

PBS対照と比較したhTTRトランスジェニックマウスの肝臓
におけるヒトトランスサイレチンmRNAの阻害

ISIS 番号.	用量 (mg/kg)	阻害率
304299	25	73
	10	60
	4	9
420915	25	78
	10	57
	4	43
420951	25	91
	10	85
	4	52
425679	25	94
	10	88
	4	42
425736	25	49
	10	54
	4	15
425737	25	82
	10	59
	4	21
425755	25	91
	10	79
	4	24
141923	25	0

【0 5 2 9】

タンパク質分析

トランスジェニックマウスの血漿におけるヒトトランスサイレチンのタンパク質レベルを、抗トランスサイレチンポリクローナル抗体 (Abcam社 Ab37774) およびヒッジ抗TTRホースラディッシュペルオキシダーゼ検出抗体 (Abcam社カタログ番号35217) を用いて、ELISAにより測定した。ImmunoPure (登録商標) TMB基質キットにより呈色反応を起こし、吸光度をマイクロプレート分光光度計を用いて450nmで測定した。血漿試料を、投与前並びに7、14、21および28日目に採取した。表41に示される結果は投与前レベルと比較した阻害率(%)を表わしており、ISISオリゴヌクレオチドでの処置により、タンパク質レベルにおいて時間依存的且つ用量依存的な減少が起こることを示している。

【0 5 3 0】

【表 4 1】

表 4 1

投与前レベルと比較したトランスジェニックマウスの血漿に
おけるヒトトランスサイレチンタンパク質の阻害

ISIS 番号		0 日目	7 日目	14 日目	21 日目	28 日目
141923	25	0	0	20	77	41
304299	25	0	44	85	100	88
	10	0	0	8	93	78
	4	0	0	0	57	0
420915	25	0	0	67	86	91
	10	0	21	39	70	71
	4	0	25	0	0	0
420951	25	0	83	96	100	100
	10	0	35	66	91	86
	4	0	7	26	0	0
425679	25	0	93	97	96	98
	10	0	38	80	96	95
	4	0	0	0	0	0
425736	25	0	56	76	82	92
	10	0	0	33	37	66
	4	0	0	0	0	0
425737	25	0	90	96	99	98
	10	0	51	80	88	89
	4	0	29	21	37	31
425755	25	0	88	96	98	99
	10	0	52	76	90	88
	4	0	29	22	36	26

【 0 5 3 1】

体重および臓器重量

マウスの体重を、投与前および処理期間の最後に測定した。表 4 2 に体重を示し、体重は処置開始前に測定した P B S 対照の体重を超えた分の増加率として表わしている。肝臓、脾臓および腎臓の重量を検査の最後に測定し、P B S 対照の各臓器体重を超えた分の変化率として表 4 2 に示す。

【 0 5 3 2】

【表 4 2】

表 4 2

アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後のトランスジェニックマウスの体重および臓器重量における変化 (%)

	用量 (mg/kg)	体重	肝臓	脾臓	腎臓
PBS		+13	0	0	0
ISIS304299	25	+17	+16	+3	-2
	10	+14	+10	-13	-4
	4	+17	+2	+17	-2
ISIS420915	25	+18	+12	-6	-6
	10	+16	+6	-4	-5
	4	+15	+4	+8	-2
ISIS420951	25	+22	+23	+32	-2
	10	+16	+11	+10	-3
	4	+24	+7	+19	+5
ISIS425679	25	+24	+33	+40	-1
	10	+14	+5	+9	-2
	4	+19	+7	+10	0
ISIS425736	25	+16	+15	0	-5
	10	+28	+8	-12	-6
	4	+20	+10	-9	-2
ISIS425737	25	+16	+13	0	-2
	10	+19	+6	+18	-3
	4	+19	+5	+4	+1
ISIS425755	25	+21	+25	+34	-5
	10	+17	+10	+13	-4
	4	+22	+3	+27	+4
ISIS141923	25	+20	+8	-3	-4

【0 5 3 3】

肝機能

肝機能に対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、トランスアミナーゼの血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリンパス AU400e、ニューヨーク州メルビル）を用いて測定した。ALT（アラニントランスアミナーゼ）およびAST（アスパラギン酸トランスアミナーゼ）の血漿中濃度を測定し、その結果を IU/L 表示で表 4 3 に示す。また、ビリルビンの血漿中レベルを同じ臨床化学分析機を用いて測定し、その結果も mg/dL 表示で表 4 3 に示す。

【0 5 3 4】

10

20

30

40

【表 4 3】

表 4 3

トランスジェニックマウスの肝臓における代謝マーカーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果

	用量 (mg/kg)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TBIL (mg/dL)
PBS	-	48	112	0.20
ISIS304299	25	42	93	0.14
	10	37	56	0.18
	4	35	71	0.15
ISIS420915	25	63	181	0.22
	10	46	132	0.22
	4	35	114	0.22
ISIS420951	25	63	85	0.17
	10	42	107	0.21
	4	31	74	0.19
ISIS425679	25	156	150	0.13
	10	93	148	0.23
	4	38	119	0.22
ISIS425736	25	37	78	0.21
	10	33	62	0.20
	4	46	228	0.23
ISIS425737	25	55	121	0.20
	10	41	94	0.18
	4	32	73	0.14
ISIS425755	25	74	160	0.17
	10	31	80	0.16
	4	45	122	0.21
ISIS141923	25	66	141	0.17

【0 5 3 5】

腎機能

腎機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、血中尿素窒素（BUN）の血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリンパスAU400e、ニューヨーク州メルビル）を用いて測定した。結果をmg/dL表示で表44に示す。

【0 5 3 6】

【表 4 4】

表 4 4

トランスジェニックマウスの腎臓におけるBUN (mg/dL)
に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果

	用量 (mg/kg)	BUN
PBS		22
ISIS304299	25	22
	10	22
	4	22
ISIS420915	25	24
	10	25
	4	20
ISIS420951	25	24
	10	25
	4	26
ISIS425679	25	26
	10	24
	4	22
ISIS425736	25	20
	10	22
	4	22
ISIS425737	25	21
	10	19
	4	23
ISIS425755	25	23
	10	21
	4	20
ISIS141923	25	21

【0 5 3 7】

実施例 16：ヒトトランスサイレチン-トランスジェニックマウスにおける、ヒトトランスサイレチンの *In vivo*での阻害

表 4 からの、5'-10-5 MOE モチーフを有するアンチセンスオリゴヌクレオチド：ISIS304313、ISIS420913、ISIS420919、ISIS420921、ISIS420922、ISIS420937、ISIS420944、ISIS420947、ISIS420949、ISIS420950、ISIS420951、ISIS420952、ISIS420953、ISIS420955、ISIS420957、および ISIS420959。トランスサイレチン mRNA を 65% 以上阻害するこれらのアンチセンスオリゴヌクレオチドを選択し、ヒトトランスサイレチン遺伝子を含むトランスジェニックマウスにおいて試験した。また、ISIS420951 (GTTTATTGTCCTCTGCCTGG (配列番号 116)) に対する重複配列を有し、種々のモチーフを有するさらなるオリゴヌクレオチドを設計し、トランスジェニックマウスにおいて試験した。これらのさらなるオリゴヌクレオチドは、ISIS450518 (TTTTATTGTCCTCTGCCTGG (配列番号 5-8-5 MOE (配列番号 167)))、ISIS450519 (GTTTTATTGTCCTCTGCCTGG、6-8-6 MOE (配列番号 116))、ISIS450520 (GTTTTATTGTCCTCTGCCTGG、3-10-7 MOE (配列番号 116))、ISIS450521 (GTTT

10

20

30

40

50

T A T T G T C T C T G C C T G G、7-10-3 MOE（配列番号116））、I S I S 4 5 0 5 2 2（G T T T T A T T G T C T C T G C C T G G、2-10-8 MOE（配列番号116））、およびI S I S 4 5 0 5 2 3（G T T T T A T T G T C T C T G C C T G G、8-10-2 MOE（配列番号116））である。

【0538】

処置

4匹のh T T Rトランスジェニックマウス（2匹の雄および2匹の雌）からなる群にそれぞれ、25 mg/kgのI S I S 3 0 4 3 1 3、I S I S 4 2 0 9 1 3、I S I S 4 2 0 9 1 9、I S I S 4 2 0 9 2 1、I S I S 4 2 0 9 2 2、I S I S 4 2 0 9 3 7、I S I S 4 2 0 9 4 4、I S I S 4 2 0 9 4 7、I S I S 4 2 0 9 4 9、I S I S 4 2 0 9 5 0、I S I S 4 2 0 9 5 1、I S I S 4 2 0 9 5 2、I S I S 4 2 0 9 5 3、I S I S 4 2 0 9 5 5、I S I S 4 2 0 9 5 7、I S I S 4 2 0 9 5 9、I S I S 4 2 5 5 1 8、I S I S 4 2 5 5 1 9、I S I S 4 2 5 5 2 0、I S I S 4 2 5 5 2 1、I S I S 4 2 5 5 2 2、またはI S I S 4 2 5 5 2 3を、週に2回、4週間、皮下に投与した。4匹のh T T Rトランスジェニックマウスからなる対照群（2匹の雄および2匹の雌）に、P B Sを、週に2回、4週間、皮下に注射した。0、14および28日目に血液試料を全ての群から採取し、血漿中トランスサイレチンレベルを分析した。最終投与から2日後にマウスを屠殺し、標的m R N A分析のために肝臓を採取した。

10

【0539】

R N A分析

プライマープローブセットR T S 3 0 2 9を用いてトランスサイレチンのリアルタイムP C R分析を行うために、R N Aを肝臓組織から抽出した。結果を、P B S対照と比較したヒトトランスサイレチンの阻害率（%）として示す。表45で示されるように、I S I Sアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置することにより、P B S対照と比較してヒトトランスサイレチンのm R N Aが有意に減少した。

20

【0540】

【表 4 5】

表 4 5

PBS対照と比較したhTTRトランスジェニックマウスの肝臓におけるヒトトランスサイレチンmRNAの阻害

ISIS 番号	阻害率 (%)
304313	68
420913	83
420919	64
420921	70
420922	82
420937	46
420944	58
420947	62
420949	87
420950	94
420952	95
420953	93
420955	93
420957	90
420959	73
450518	80
450519	87
450520	85
450521	94
450522	73
450523	94
420951	94

10

20

30

【0 5 4 1】

タンパク質分析

トランスジェニックマウスの血漿におけるヒトトランスサイレチンのタンパク質レベルを、抗トランスサイレチンポリクローナル抗体 (Abcam社Ab37774) およびヒツジ抗TTRホースラディッシュペルオキシダーゼ検出抗体 (Abcam社カタログ番号35217) を用いて、ELISAにより測定した。ImmunoPure (登録商標) TMB基質キットにより呈色反応を起こし、吸光度をマイクロプレート分光光度計を用いて450nmで測定した。血漿試料を、投与前並びに7日目、14日目および28日目に採取した。表46に示される結果は、投与前レベルと比較した阻害率 (%) を表わし、オリゴヌクレオチドで処置した場合のタンパク質レベルにおける時間依存的な減少を示している。

40

【0 5 4 2】

【表 4 6】

表 4 6

投与前レベルと比較したh T T Rトランスジェニックマウスの血漿におけるヒトトランスサイレチンタンパク質の阻害

	0 日 目	14 日 目	28 日 目
PBS	0	0	0
ISIS304313	0	62	77
ISIS420913	0	91	97
ISIS420919	0	70	82
ISIS420921	0	83	87
ISIS420922	0	95	97
ISIS420937	0	37	59
ISIS420944	0	57	72
ISIS420947	0	57	65
ISIS420949	0	93	99
ISIS420950	0	97	100
ISIS420952	0	98	100
ISIS420953	0	99	100
ISIS420955	0	89	100
ISIS420957	0	92	94
ISIS420959	0	69	87
ISIS450518	0	80	97
ISIS450519	0	94	100
ISIS450520	0	83	100
ISIS450521	0	100	100
ISIS450522	0	93	97
ISIS450523	0	100	100
ISIS420951	0	99	100

【 0 5 4 3】

肝機能

肝機能に対するI S I Sオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、トランスアミナーゼの血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリンパスAU400e、ニューヨーク州メルビル）を用いて測定した。ALT（アラニントランスアミナーゼ）およびAST（アスパラギン酸トランスアミナーゼ）の血漿中濃度を測定し、その結果をIU/L表示で表47に示す。また、ビリルビンの血漿中レベルを同じ臨床化学分析機を用いて測定し、その結果もmg/dL表示で表47に示す。

【 0 5 4 4】

【表 4 7】

表 4 7

トランスジェニックマウスの肝臓における代謝マーカーに
対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ビリルビン (mg/dL)
PBS	34	88	0.20
ISIS304313	42	79	0.16
ISIS420913	35	67	0.17
ISIS420919	63	177	0.20
ISIS420921	47	103	0.15
ISIS420922	42	128	0.16
ISIS420937	33	160	0.15
ISIS420944	38	84	0.15
ISIS420947	42	120	0.17
ISIS420949	46	125	0.15
ISIS420950	73	106	0.15
ISIS420952	151	271	0.19
ISIS420953	982	452	0.16
ISIS420955	47	80	0.15
ISIS420957	53	133	0.18
ISIS420959	31	89	0.11
ISIS450518	103	200	0.20
ISIS450519	64	81	0.12
ISIS450520	350	270	0.12
ISIS450521	104	226	0.13
ISIS450522	109	201	0.14
ISIS450523	80	170	0.19
ISIS420951	67	100	0.09

【0 5 4 5】

腎機能

腎機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、血中尿素窒素（BUN）の血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリンパスAU400e、ニューヨーク州メルビル）を用いて測定した。結果をmg/dL表示で表48に示す。

【0 5 4 6】

【表 4 8】

表 4 8

トランスジェニックマウスの腎臓におけるBUN (mg/dL) に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果

PBS	35
ISIS304313	29
ISIS420913	30
ISIS420919	29
ISIS420921	29
ISIS420922	27
ISIS420937	29
ISIS420944	27
ISIS420947	26
ISIS420949	25
ISIS420950	34
ISIS420952	23
ISIS420953	34
ISIS420955	24
ISIS420957	23
ISIS420959	29
ISIS450518	28
ISIS450519	25
ISIS450520	29
ISIS450521	24
ISIS450522	29
ISIS450523	27
ISIS420951	25

10

20

30

【0 5 4 7】

実施例 17: CD1 マウスにおける、ヒトトランスサイレチンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの忍容性

CD1 マウスを実施例 16 から得られた ISIS アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、種々の代謝マーカーのレベル変化について評価した。

【0 5 4 8】

処置

8 匹の CD1 マウスからなる群にそれぞれ、50 mg/kg の ISIS304313、ISIS420913、ISIS420919、ISIS420921、ISIS420922、ISIS420937、ISIS420944、ISIS420947、ISIS420949、ISIS420950、ISIS420951、ISIS420952、ISIS420953、ISIS420955、ISIS420957、ISIS420959、ISIS425518、ISIS425519、ISIS425520、ISIS425521、ISIS425522、または ISIS425523 を、週 2 回皮下に注射した。各時点での最終投与から 3 日後に、体重を測定し、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

【0 5 4 9】

体重および臓器重量

50

投与前および各処置期間の最後に（２週目および６週目）マウスの体重を測定した。表４９に示される体重は処置開始前に測定したＰＢＳ対照の体重を超えた分の増加率（％）を表わしている。肝臓、脾臓および腎臓の重量を検査の最後に測定し、これもまた、ＰＢＳ対照の各臓器体重を超えた分の変化率（％）として表４９に示す。

【０５５０】

【表４９】

表４９

アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後のＣＤ１マウスの体重および臓器重量における第６週目での変化（％）

	体重	肝臓	脾臓	腎臓
PBS	1.3	1.0	1.0	1.0
ISIS304313	1.2	1.2	1.4	1.2
ISIS420913	1.2	1.2	1.3	1.1
ISIS420919	1.3	1.2	1.9	1.1
ISIS420921	1.1	1.1	2.2	1.1
ISIS420922	1.1	1.0	1.6	0.9
ISIS420937	1.1	1.0	1.2	1.0
ISIS420944	1.1	1.1	2.0	1.0
ISIS420947	1.3	1.2	1.7	1.0
ISIS420949	1.3	1.2	1.8	1.1
ISIS420950	1.3	1.0	1.7	1.0
ISIS420952	1.4	1.3	2.1	0.9
ISIS420953	1.3	1.5	2.2	1.0
ISIS420955	1.2	1.2	2.2	1.0
ISIS420957	1.1	1.1	1.8	1.1
ISIS420959	1.3	1.2	3.2	1.1
ISIS450518	1.4	1.3	1.8	1.1
ISIS450519	1.3	1.5	2.4	1.0
ISIS450520	1.4	1.4	2.2	1.0
ISIS450521	1.2	1.2	1.9	1.1
ISIS450522	1.3	1.5	2.3	1.1
ISIS450523	1.2	1.3	2.4	1.1
ISIS420951	1.3	1.2	1.9	1.0

【０５５１】

肝機能

肝機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、トランスアミナーゼの血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリンパスAU400e、ニューヨーク州メルビル）を用いて測定した。ALT（アラントランスアミナーゼ）およびAST（アスパラギン酸トランスアミナーゼ）の血漿中濃度を測定し、その結果をIU/L表示で表５０に示す。また、ビリルビンおよびアルブミンの血漿中レベルも同じ臨床化学分析機を用いて測定し、その結果も表５０に示す。

【０５５２】

10

20

30

40

【表 5 0】

表 5 0

CD 1 マウス肝臓における代謝マーカーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の
効果

	ALT	AST	TBIL
PBS	34	88	0.20
ISIS304313	42	79	0.16
ISIS420913	35	67	0.17
ISIS420919	63	177	0.20
ISIS420921	47	103	0.15
ISIS420922	42	128	0.16
ISIS420937	33	160	0.15
ISIS420944	38	84	0.15
ISIS420947	42	120	0.17
ISIS420949	46	125	0.15
ISIS420950	73	106	0.15
ISIS420952	151	271	0.19
ISIS420953	982	452	0.16
ISIS420955	47	80	0.15
ISIS420957	53	133	0.18
ISIS420959	31	89	0.11
ISIS450518	103	200	0.20
ISIS450519	64	81	0.12
ISIS450520	350	270	0.12
ISIS450521	104	226	0.13
ISIS450522	109	201	0.14
ISIS450523	80	170	0.19
ISIS420951	67	100	0.09

【 0 5 5 3】

腎機能

腎機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、血中尿素窒素（BUN）およびクレアチニンの血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリンパスAU400e、ニューヨーク州メルビル）を用いて測定した。結果をmg/dL表示で表51に示す。

【 0 5 5 4】

【表 5 1】

表 5 1

CD 1 マウスの腎臓における BUN (mg / d L) に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果

	BUN
PBS	35
ISIS304313	29
ISIS420913	30
ISIS420919	29
ISIS420921	29
ISIS420922	27
ISIS420937	29
ISIS420944	27
ISIS420947	26
ISIS420949	25
ISIS420950	34
ISIS420952	23
ISIS420953	34
ISIS420955	24
ISIS420957	23
ISIS420959	29
ISIS450518	28
ISIS450519	25
ISIS450520	29
ISIS450521	24
ISIS450522	29
ISIS450523	27
ISIS420951	25

【 0 5 5 5】

血液学的分析

全マウス群より得た血液を、ヘマトクリット (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、および平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) の測定並びに分析、加えてWBC (好中球、リンパ球、および単球)、RBC、および血小板等の血液細胞百分率数並びに総ヘモグロビン量の測定のために、アンテック・ダイアグノスティクス社 (Antech Diagnostics) へ送った。結果を表 5 2 ~ 5 3 に示す。表中のパーセンテージは、PBS 対照と比較した総血液細胞数における増減率を表わす。

【 0 5 5 6】

10

20

30

40

【表 5 2】

表 5 2

PBS 対照と比較した CD 1 マウスにおける全血球計算値に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果 (%)

	WBC	RBC	ヘモグロビン	HCT	MCV	MCH	MCHC
ISIS304313	+80	-5	-7	-9	-4	-2	+4
ISIS420913	-10	-1	-3	-5	-4	-2	+3
ISIS420919	+26	-2	-7	-9	-7	-5	+4
ISIS420921	+60	-9	-12	-15	-6	-3	+5
ISIS420922	+18	-6	-11	-16	-11	-6	+6
ISIS420937	+42	-3	-4	-7	-5	-1	+5
ISIS420944	+49	-5	-9	-13	-8	-4	+6
ISIS420947	+36	-2	-2	-5	-3	0	+4
ISIS420949	+61	-4	-6	-9	-7	-3	+5
ISIS420950	+56	-14	-16	-19	-7	-3	+6
ISIS420952	+36	-20	-24	-25	-7	-5	+4
ISIS420953	+105	-21	-24	-26	-6	-4	+4
ISIS420955	+107	-14	-19	-21	-9	-5	+6
ISIS420957	+79	-5	-10	-13	-9	-6	+5
ISIS420959	+92	-8	-14	-18	-11	-7	+6
ISIS450518	+138	-5	-10	-12	-7	-4	+4
ISIS450519	+118	-17	-21	-24	-9	-5	+6
ISIS450520	+151	-18	-21	-23	-7	-4	+4
ISIS450521	+118	-15	-21	-23	-11	-7	+5
ISIS450522	+63	-22	-28	-31	-12	-8	+6
ISIS450523	+116	-22	-27	-29	-11	-7	+6
ISIS420951	+54	-15	-21	-24	-10	-6	+5

【 0 5 5 7 】

10

20

30

【表 5 3】

表 5 3

PBS 対照と比較した CD1 マウスにおける血液細胞百分率数に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果 (%)

	好中球	リンパ球	単球	血小板
ISIS304313	-54	+49	-45	+36
ISIS420913	-46	+39	-21	-2
ISIS420919	-57	+49	-21	+19
ISIS420921	-55	+47	-24	+25
ISIS420922	-53	+46	-31	+24
ISIS420937	-63	+57	-48	+20
ISIS420944	-40	+37	-28	+18
ISIS420947	-55	+49	-38	-9
ISIS420949	-30	+24	+7	+17
ISIS420950	-50	+40	0	+6
ISIS420952	-34	+33	-28	+13
ISIS420953	-37	+35	-34	+11
ISIS420955	-37	+34	-21	+30
ISIS420957	-71	+61	-28	+16
ISIS420959	-52	+45	-24	-1
ISIS450518	-56	+49	-28	+18
ISIS450519	-18	+11	+41	+55
ISIS450520	-41	+34	0	+7
ISIS450521	-41	+36	-14	+21
ISIS450522	-41	+31	+17	+58
ISIS450523	-28	+19	+31	+51
ISIS420951	-28	+24	0	+26

【0 5 5 8】

実施例 18：スプラッグドローリーラットにおける、ヒトトランスサイレチンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの忍容性

実施例 17 に記載される検査から選択される ISIS オリゴヌクレオチドを、スプラッグドローリーラットにおいて試験し、種々の代謝マーカーのレベル変化について評価した。

【0 5 5 9】

処置

ラットの体重、全血球計算値および差分血球数 (different blood count)、並びに尿蛋白／クレアチニン比を投与前に評価した。スプラッグドローリーラット 4 匹からなる群それぞれに、50 mg/kg の ISIS420913、ISIS420921、ISIS420922、ISIS420950、ISIS420955、ISIS420957、および ISIS420959 を、週 2 回皮下に注射した。各時点での最終投与から 3 日後に、体重を測定し、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。

【0 5 6 0】

体重および臓器重量

ラットの体重を投与前および処置期間の最後に測定した。体重は表 5 4 に示され、処置開始前に測定した PBS 対照の体重を超えた分の増加率 (%) として表記した。肝臓、脾臓および腎臓の重量を検査の最後に測定し、また、PBS 対照の各臓器体重を超えた分の変化率 (%) として表 5 4 に示す。

【0 5 6 1】

【表 5 4】

表 5 4

アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後のスプラッグドローリーラットの体重および臓器重量における変化 (%)

	体重	肝臓	脾臓	腎臓
PBS	2.1	1.0	1.0	1.0
ISIS420913	1.5	1.5	4.7	1.1
ISIS420921	1.6	1.5	4.2	1.3
ISIS420922	1.3	1.5	4.4	1.4
ISIS420950	1.4	1.5	6.4	1.7
ISIS420955	1.5	1.6	5.9	1.4
ISIS420957	1.4	1.4	6.8	1.3
ISIS420959	1.5	1.4	5.5	1.4

10

【0 5 6 2】

表 5 4 で示されるように、前記化合物はこれらのラットの臓器重量において、10 倍未満の増加を示した。さらに、ある化合物は、これらのラットの臓器重量において、7 倍未満の増加を示した。一方で、ある化合物は、これらのラットの臓器重量において、6 倍未満の増加を示した。ある化合物は、これらのラットの臓器重量において、5 倍未満の増加を示した。

20

【0 5 6 3】

肝機能

肝機能に対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、トランスアミナーゼの血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリンパス AU400e、ニューヨーク州メルビル）を用いて測定した。ALT（アラニントランスアミナーゼ）および AST（アスパラギン酸トランスアミナーゼ）の血漿中濃度を測定し、その結果を IU/L 表示で表 5 5 に示す。また、ビリルビンおよびアルブミンの血漿中レベルを同じ臨床化学分析機を用いて測定し、その結果も表 5 5 に示す。

30

【0 5 6 4】

【表 5 5】

表 5 5

スプラッグドローリーラットの肝臓における代謝マーカーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TBIL (mg/dL)	アルブミン (g/dL)
PBS	26	66	0.09	4.5
ISIS420913	38	95	0.08	3.3
ISIS420921	65	151	0.11	3.2
ISIS420922	40	121	0.11	4.0
ISIS420950	398	327	0.19	4.0
ISIS420955	78	241	0.18	4.1
ISIS420957	84	244	0.14	3.7
ISIS420959	82	405	0.17	4.6

40

【0 5 6 5】

腎機能

腎機能に対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、血中尿素窒素（BUN）およびクレアチニンの血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリンパス AU

50

400 e、ニューヨーク州メルビル)を用いて測定した。結果をmg/dL表示で表56に示す。クレアチニンに対する全尿蛋白の割合についても評価し、表56に示す。

【0566】

【表56】

表56

スプラッグドローリーラットの腎臓における代謝マーカーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果 (mg/dL)

	BUN	クレアチニン
PBS	14	0.05
ISIS420913	22	0.09
ISIS420921	23	0.07
ISIS420922	21	0.08
ISIS420950	20	0.11
ISIS420955	22	0.06
ISIS420957	23	0.18
ISIS420959	24	0.17

10

【0567】

【表57】

表57

スプラッグドローリーラットの腎臓における全尿蛋白/クレアチニンに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果

	尿蛋白/クレアチニン比
PBS	1.50
ISIS420913	19.51
ISIS420921	5.07
ISIS420922	4.72
ISIS420950	5.61
ISIS420955	5.57
ISIS420957	5.40
ISIS420959	4.39

20

30

【0568】

血液学的分析

全マウス群より得た血液を、ヘマトクリット (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)、および平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) の測定並びに分析、加えてWBC (好中球、リンパ球、および単球)、RBC、および血小板等の血液細胞百分率数並びに総ヘモグロビン量の測定のために、アンテック・ダイアグノスティクス社 (Antech Diagnostics) へ送った。結果を表58～59に示す。表中のパーセントは、PBS対照と比較した総血液細胞数における増減率を表わす。

40

【0569】

【表 5 8】

表 5 8

PBS 対照と比較したスプラッグドローリーラットにおける全血球計算値に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果 (%)

	WBC	RBC	ヘモグロビン	HCT	MCV	MCH	MCHC
PBS	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ISIS420913	1.7	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0
ISIS420921	1.6	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0
ISIS420922	1.6	0.9	0.9	0.8	1.0	1.0	1.0
ISIS420950	2.2	0.7	0.7	0.7	1.0	1.0	1.0
ISIS420955	1.9	0.7	0.8	0.7	1.1	1.2	1.0
ISIS420957	3.1	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0
ISIS420959	2.2	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0

10

【0 5 7 0】

【表 5 9】

表 5 9

PBS 対照と比較したスプラッグドローリーラットにおける血液細胞百分率数に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果 (%)

20

	好中球	リンパ球	単球	血小板
PBS	1.0	1.0	1.0	1.0
ISIS420913	0.5	1.1	1.7	0.7
ISIS420921	0.7	1.0	1.6	0.6
ISIS420922	0.5	1.1	1.3	0.7
ISIS420950	0.8	1.0	2.3	0.7
ISIS420955	0.5	1.0	2.4	0.7
ISIS420957	0.7	1.0	1.6	0.3
ISIS420959	0.5	1.1	1.3	n.d.

30

【0 5 7 1】

実施例 19：スプラッグドローリーラットの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濃度の半減期に関する薬物動態試験

スプラッグドローリーラットを、実施例 18 に記載される試験から得られた ISIS アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、オリゴヌクレオチドの半減期、並びに肝臓からオリゴヌクレオチドが分解および除去されるのに要する経過時間を評価した。

【0 5 7 2】

処置

スプラッグドローリーラット 4 匹からなる群にそれぞれ、20 mg/kg の ISIS420913、ISIS420921、ISIS420922、ISIS420950、ISIS420955、ISIS420957、および ISIS420959 を、週 2 回を 2 週間、皮下に注射した。最終投与から 3 日後、ラットを屠殺し、肝臓および腎臓を分析のために採取した。

40

【0 5 7 3】

オリゴヌクレオチド濃度の測定

完全長オリゴヌクレオチドの濃度および総オリゴヌクレオチド濃度（分解された形態も含む）を測定した。使用された方法は既刊の方法を改変したものであり（Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999）、フェノールクロロホルム（液-液）抽出とそれに続く固相抽出から成る。内部標準（ISIS355868、27 塩基長の 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、G C G T T T G C T C T T C T T C T T G C G T T T T T、本明細書では配列番号166と指定される）を抽出前に加えた。組織試料濃度を、定量下限（LLOQ）がおよそ1.14 $\mu\text{g}/\text{g}$ である検量線を用いて計算した。結果を、 $\mu\text{g}/\text{肝臓}$ または $\mu\text{g}/\text{腎臓}$ 組織のg表示で、表60および61に示す。オリゴヌクレオチド濃度について腎臓の肝臓に対する割合についても計算し、表60および61に示す。

【0574】

【表60】

表60

スプラッグドローラットの腎臓および肝臓における完全長オリゴヌクレオチドの濃度
（ $\mu\text{g}/\text{g}$ ）および比

ISIS 番号.	肝臓	腎臓	腎臓/肝臓比
420913	154	285	1.9
420921	147	293	2.0
420922	226	497	2.2
420950	161	411	2.6
420955	152	383	2.5
420957	235	453	1.9
420959	187	513	2.7

【0575】

【表61】

表61

スプラッグドローラットの腎臓および肝臓における総オリゴヌクレオチド濃度（ $\mu\text{g}/\text{g}$ ）

ISIS 番号.	肝臓	腎臓	腎臓/肝臓比
420913	180	310	1.7
420921	159	305	1.9
420922	238	544	2.3
420950	168	466	2.8
420955	156	442	2.8
420957	244	551	2.3
420959	202	534	2.6

【0576】

実施例20：トランスジェニックマウスにおける、ヒトトランスサイレチンの *in vivo*での用量依存的阻害

ISIS420913、ISIS420921、ISIS420922、ISIS420957およびISIS420959は、実施例16～19で明示されるように、良好な効能および忍容性を示し、ヒトトランスサイレチン遺伝子を含むトランスジェニックマウスにおける用量依存的な標的ノックダウンについての試験を行うために選択された。CD1マウスにおいて90%以上の標的ノックダウンを示したが、毒性も示したISIS420950およびISIS420955も、比較を目的とする本試験のために選択された。

【0577】

処置

マウス4匹からなる群（2匹の雄および2匹の雌）にそれぞれ、4 mg/kg 、10 mg/kg または25 mg/kg のISIS420913、ISIS420921、ISIS420922、ISIS420950、ISIS420955、ISIS420957

10

20

30

40

50

、またはISIS420959を、週に2回、4週間、皮下に注射した。4匹のマウスからなる群（2匹の雄および2匹の雌）の1つに、25mg/kgの対照オリゴヌクレオチド、ISIS141923を、週に2回、4週間、皮下に注射した。4匹のマウスからなる対照群（2匹の雄および2匹の雌）の1つに、PBSを、週に2回、4週間、皮下に注射した。0、14および28日目に、各群から血漿試料を採取した。最終投与から2日後、マウスを安楽死させ、臓器をさらなる分析のために採取した。

【0578】

RNA分析

プライマープローブセットRTS3029を用いてトランスサイレチンのリアルタイムPCR分析を行うために、RNAを肝臓組織から抽出した。結果を、PBS対照と比較したヒトトランスサイレチンの阻害率(%)として示す。表62で示されるように、ISISアンチセンスオリゴヌクレオチドでの処置により、ヒトトランスサイレチンmRNAがPBS対照と比較して用量依存的に有意に減少した。対照オリゴヌクレオチドISIS141923での処理では、予想通り、トランスサイレチンは有意に減少しなかった。

【0579】

【表62】

表62

PBS対照と比較したhTTRトランスジェニックマウスの肝臓におけるヒトトランスサイレチンmRNAの阻害

ISIS 番号.	用量 (mg/kg)	阻害率 (%)
420913	25	78
	10	65
	4	32
420921	25	76
	10	64
	4	13
420922	25	80
	10	53
	4	21
420950	25	92
	10	77
	4	57
420955	25	88
	10	56
	4	23
420957	25	85
	10	72
	4	32
420959	25	75
	10	26
	4	11
141923	25	0

【0580】

タンパク質分析

トランスジェニックマウスの血漿中におけるヒトトランスサイレチンのタンパク質レベルを、抗トランスサイレチンポリクローナル抗体(Abcam社 Ab37774)およびヒッジ抗TTRホースラディッシュペルオキシダーゼ検出抗体(Abcam社カタログ番号35217)を用いたELISAにより測定した。ImmunoPure(登録商標)TMB基質キットにより呈色反応を起こし、吸光度をマイクロプレート分光光度計を用

いて450nmで測定した。投与前および7、14、21および28日目に血漿試料を採取した。表63に示される結果は投与前レベルと比較した阻害率を表わしており、ISISオリゴヌクレオチドでの処置時におけるタンパク質レベルの時間依存的且つ用量依存的な減少を示している。

【0581】

【表63】

表63

投与前レベルと比較したhTTRトランスジェニックマウスの血漿におけるヒトトランスサイレチンタンパク質の阻害

ISIS 番号	用量 (mg/kg)	0 日目	14 日目	28 日目
420913	25	0	73	93
	10	0	27	96
	4	0	25	54
420921	25	0	73	90
	10	0	63	79
	4	0	42	67
420922	25	0	63	96
	10	0	57	89
	4	0	38	77
420950	25	0	95	97
	10	0	71	96
	4	0	29	53
420955	25	0	84	96
	10	0	53	91
	4	0	20	30
420957	25	0	83	93
	10	0	51	66
	4	0	32	49
420959	25	0	74	80
	10	0	31	58
	4	0	0	0
141923	25	0	22	0

【0582】

体重および臓器重量

マウスの体重を、投与前および処置期間の最後に測定した。表64に示される体重は処置開始前に測定したPBS対照の体重を超えた分の増加率(%)を表わしている。肝臓、脾臓および腎臓の重量を検査の最後に測定し、PBS対照の各臓器体重を超えた分の変化率(%)として表64に示す。

【0583】

【表 6 4】

表 6 4

アンチセンスオリゴヌクレオチド処置後のトランスジェニックマウスの体重および臓器重量における変化 (%)

		体重	肝臓	脾臓	腎臓
PBS		6.4	0.0	0.0	0.0
ISIS420913	25	8.1	0.3	11.4	4.1
	10	10.6	-8.6	14.3	13.6
	4	7.4	3.7	5.0	12.0
ISIS420921	25	10.5	8.8	25.6	-0.1
	10	9.7	5.7	10.8	4.0
	4	8.7	-4.4	16.0	11.0
ISIS420922	25	8.4	5.6	18.0	1.7
	10	9.2	-1.7	27.1	6.3
	4	8.1	-2.1	-11.4	5.1
ISIS420950	25	12.8	14.3	22.8	1.7
	10	8.4	4.3	-2.8	0.6
	4	9.1	0.4	14.2	1.5
ISIS420955	25	10.1	14.6	17.7	-4.4
	10	11.8	5.6	-0.3	1.4
	4	7.9	4.7	-12.3	4.5
ISIS420957	25	12.8	6.4	33.1	2.8
	10	14.5	13.9	-6.3	9.7
	4	7.4	-5.4	12.2	6.2
ISIS420959	25	10.0	2.4	72.7	23.3
	10	7.2	-5.4	40.2	9.8
	4	4.1	-4.4	27.8	-6.6
ISIS141923	25	9.2	-1.3	20.4	-5.5

【 0 5 8 4】

肝機能

肝機能に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、トランスアミナーゼの血漿中濃度を、自動臨床化学分析機（日立オリンパスAU400e、ニューヨーク州メルビル）を用いて測定した。ALT（アラニントランスアミナーゼ）およびAST（アスパラギン酸トランスアミナーゼ）の血漿中濃度を測定し、その結果をIU/L表示で表65に示す。また、ビリルビンの血漿中レベルを同じ臨床化学分析機を用いて測定し、その結果もmg/dL表示で表65に示す。

【 0 5 8 5】

【表 6 5】

表 6 5

トランスジェニックマウスの肝臓における代謝マーカーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果

	用量 (mg/kg)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TBIL (mg/dL)
PBS		47	63	0.16
ISIS420913	25	42	69	0.13
	10	49	90	0.17
	4	42	59	0.18
ISIS420921	25	56	96	0.12
	10	51	68	0.22
	4	42	75	0.14
ISIS420922	25	50	76	0.12
	10	40	170	0.14
	4	37	48	0.13
ISIS420950	25	74	116	0.14
	10	37	67	0.13
	4	34	64	0.11
ISIS420955	25	46	117	0.15
	10	54	76	0.16
	4	50	153	0.17
ISIS420957	25	40	73	0.13
	10	36	63	0.20
	4	37	61	0.12
ISIS420959	25	51	92	0.19
	10	48	69	0.13
	4	37	67	0.13
ISIS141923	25	44	79	0.12

【 0 5 8 6 】

腎機能

腎機能に対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、血中尿素窒素 (BUN) の血漿中濃度を、自動臨床化学分析機 (日立オリンパス AU 400 e、ニューヨーク州メルビル) を用いて測定した。結果を mg/dL 表示で表 6 6 に示す。

【 0 5 8 7 】

【表 6 6】

表 6 6

トランスジェニックマウスの腎臓におけるBUN (mg/dL) に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果

	用量 (mg/kg)	BUN
PBS	-	23
ISIS420913	25	24
	10	22
	4	20
ISIS420921	25	24
	10	22
	4	23
ISIS420922	25	23
	10	22
	4	24
ISIS420950	25	22
	10	26
	4	23
ISIS420955	25	23
	10	24
	4	25
ISIS420957	25	20
	10	22
	4	20
ISIS420959	25	25
	10	22
	4	22
ISIS141923	25	19

【0588】

実施例 21：カニクイザル初期肝細胞における、ヒトトランスサイレチンを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの用量反応確認

CD1マウスおよびスプラグドローリーラットにおいて忍容性を示し（実施例 17～19に記載された試験）、且つトランスジェニックマウスにおいて効力を示す（実施例 16および20に記載された試験）ギャップマーを選択し、カニクイザル初期肝細胞において種々の用量で試験した。細胞を1ウェル当たり35,000細胞の密度で播種し、表67で規定されるように、156.25nM、312.5nM、625nM、1,250nM、2,500nM、5,000nM、10,000nMおよび20,000nMの濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドと一緒に、エレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。およそ16時間の処理期間の後、RNAを細胞から単離し、トランスサイレチンのmRNAレベルを定量的リアルタイムPCRによって測定した。ヒトトランスサイレチンのプライマープローブセットRTS1396を使用して、mRNAレベルを測定した。トランスサイレチンのmRNAレベルを、RIBOGREEN（登録商標）により測定される全RNA含量に従って補正した。結果を、未処理対照群細胞と比較したトランスサイレチンの阻害率（%）として示す。表67に例示されるように、アカゲザルトランスサイレチン遺伝子（本明細書では配列番号4と指定される（GENBANK受託番号NW_001105671.1から抽出されるエキソン1～4））と交差反応性である全てのISISオリゴヌクレオチドで処理した肝細胞において、トランスサイレチンのmRNAレベルは用量依存的に減少した。

【0589】

【表67】

表67

エレクトロポレーションを用いたカニクイザル初期肝細胞におけるヒトトランスサイレチンの用量依存的なアンチセンス阻害

ISIS 番号	156.25nM	312.5nM	625nM	1250nM	2500nM	5000nM	10000nM	20000nM	IC ₅₀ (μ M)	標的開始部位
304299	0	0	25	42	89	95	98	99	1.4	504
420913	0	0	42	49	84	96	98	98	1.2	502
420915	0	8	46	58	84	94	97	99	1	505
420921	0	0	26	30	53	74	94	97	2	512
420922	4	0	13	29	38	69	87	97	2.9	513
420950	23	27	60	71	88	94	98	98	0.6	577
420955	19	0	25	50	74	86	93	97	1.4	582
420957	0	0	15	34	65	72	87	94	2.2	584
420959	3	12	10	37	71	88	94	94	1.5	586

10

【0590】

実施例22：ヒトトランスサイレチンを標的とするISISアンチセンスオリゴヌクレオチドの粘度測定

20

実施例21に記載される試験から得られたアンチセンスオリゴヌクレオチドの粘度を、40cP超の粘度を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドの選別排除を目的として、測定した。40cP超の粘度を有するオリゴヌクレオチドは、あまりに粘性が高いため、いかなる対象にも投与できないだろう。

【0591】

ISISオリゴヌクレオチド(32~35mg)をガラス製のバイアルに量って入れ、120 μ Lの水を加え、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させた。予め加熱した試料の一部分(75 μ L)を、microviscometer(ケンブリッジ社(Cambridge))にピペットで入れた。microviscometerの温度を25℃に設定し、試料の粘度を測定した。260nm、85℃でUVを読み取るために(Cary UV機器)、予め加熱した試料の別の部分(20 μ L)を、10mLの水にピペットで入れた。表68に示されるその結果は、全てのアンチセンスオリゴヌクレオチド溶液が、上記の基準の下で、それらの粘度において最適であることを示している。

30

【0592】

【表 6 8】

表 6 8

ヒトトランスサイレチンを標的とする I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドの粘度および濃度

ISIS 番号	粘度 (cP)	濃度 (mg/mL)
304299	9.9	169
420913	6.5	178
420915	8.4	227
420921	8.2	234
420922	5.3	191
420950	12.5	297
420955	15.7	259
420957	12.9	233
420959	18.7	276

10

【0 5 9 3】

実施例 2 3：C D 1 マウス肝臓における、アンチセンスオリゴヌクレオチドの半減期測定

マウスを、実施例 2 2 に記載される試験から得られた I S I S アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置し、オリゴヌクレオチド半減期並びに肝臓からオリゴヌクレオチドが分解および除去されるのに要する経過時間を評価した。

20

【0 5 9 4】

処置

1 2 匹の C D 1 マウスからなる群にそれぞれ、5 0 m g / k g の I S I S 4 2 0 9 1 3、I S I S 4 2 0 9 2 1、I S I S 4 2 0 9 2 2、I S I S 4 2 0 9 5 0、I S I S 4 2 0 9 5 5、I S I S 4 2 0 9 5 7、および I S I S 4 2 0 9 5 9 を、週に 2 回、2 週間、皮下に注射した。各群から 4 匹のマウスを、最終投与後の 3 日目、2 8 日目および 5 6 日目に屠殺した。肝臓を分析のために採取した。

【0 5 9 5】

オリゴヌクレオチド濃度の測定

完全長オリゴヌクレオチドの濃度および総オリゴヌクレオチド濃度（分解された形態も含む）を測定した。使用された方法は既刊の方法を改変したものであり（Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999）、フェノールクロロホルム（液-液）抽出とそれに続く固相抽出から成る。内部標準（I S I S 3 5 5 8 6 8、2 7 塩基長の 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、G C G T T T G C T C T T C T T C T T G C G T T T T T T、本明細書では配列番号 1 6 6 と指定される）を抽出前に加えた。組織試料濃度を、定量下限（L L O Q）がおよそ 1 . 1 4 μ g / g である検量線を用いて計算した。続いて、半減期を W i n N o n l i n ソフトウェア（ファースイト社（PHARSI GHT））を用いて計算した。

30

40

【0 5 9 6】

結果は、μ g / 肝臓組織の g 表示で表 6 9 に示す。各オリゴヌクレオチドの半減期を表 7 0 に示した。

【0 5 9 7】

【表 6 9】

表 6 9

CD 1 マウス肝臓における完全長オリゴヌクレオチド濃度 ($\mu\text{g}/\text{g}$)

ISIS 番号	3 日目	28 日目	56 日目
420913	243	109	33
420921	225	49	6
420922	310	129	53
420950	254	88	62
420955	308	137	79
420957	325	129	49
420959	258	97	37

10

【0 5 9 8】

【表 7 0】

表 7 0

CD 1 マウス肝臓におけるオリゴヌクレオチド半減期 (日)

ISIS 番号	半減期 (日)
420913	18.5
420921	10.0
420922	20.7
420950	26.4
420955	27.2
420957	19.5
420959	18.9

20

【0 5 9 9】

実施例 2 4 : カニクイザルにおける、ヒトトランスサイレチンを標的とする ISIS 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、実施例 2 1、2 2 および 2 3 に記載された試験から得られた ISIS アンチセンスオリゴヌクレオチドで処置した。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の効能および忍容性、並びにそれらの薬物動態プロファイルを評価した。

【0 6 0 0】

処置

試験に先立ち、カニクイザルを 3 0 日間隔離し、その間に、標準的な一連の血清の生化学検査および血液学検査、卵および寄生虫に関する糞便試料検査、並びに結核検査が行われ、異常なまたは病的な状態にあるサルを選別して除いた。4 匹の無作為に割り付けられた雄カニクイザルからなる 9 群にそれぞれ、 $25\text{mg}/\text{kg}$ の ISIS 3 0 4 2 9 9、ISIS 4 2 0 9 1 5、ISIS 4 2 0 9 2 1、ISIS 4 2 0 9 2 2、ISIS 4 2 0 9 5 0、ISIS 4 2 0 9 5 5、ISIS 4 2 0 9 5 7、または ISIS 4 2 0 9 5 9 を、最初の週は週 3 回、続く 1 1 週間は週 2 回、皮下に注射した。4 匹のカニクイザルからなる一対照群に、PBS を、最初の週は週 3 回、続く 1 1 週間は週 2 回、皮下に注射した。処置の 5 日前および試験期間の様々な日において血液試料を採取し、分析した。動物は血液採取前に少なくとも 1 3 時間（一晚）絶食させた。全ての群の最終屠殺を、8 6 日目、すなわち最終投与から 4 8 時間後に行った。

40

【0 6 0 1】

試験期間中、カニクイザルを、病気または疾患の兆候について毎日観察した。処置に対

50

し有害作用を示した動物についてはいずれも、試験から排除し獣医師および試験責任者に問い合わせた。群中の2匹のサルに病気の症状が現れたため、I S I S 4 2 0 9 5 5で処置された動物は全て、31日目に試験から排除した。同様に、I S I S 4 2 0 9 5 7およびI S I S 4 2 0 9 5 0で処置された群から各1匹ずつを、それぞれ44日目および76日目に、疾病兆候があったために試験から排除した。

【0602】

阻害試験

RNA分析

86日目に、プライマープローブセットRTS3029を用いてトランスサイレチンのリアルタイムPCR分析を行うために、RNAを肝臓組織から抽出した。結果は、PBS対照と比較したトランスサイレチンの阻害率(%)として示し、シクロフィリンに対し正規化した。同様の結果が、RIBO GREEN(登録商標)での正規化で得られた。表71で示されるように、I S I Sアンチセンスオリゴヌクレオチドで処置することにより、PBS対照と比較してトランスサイレチンmRNAが有意に減少した。特に、I S I S 4 2 0 9 1 5処置は、I S I S 3 0 4 2 9 9処置よりも、TTRのmRNAをより大きく阻害したが、この2つのオリゴヌクレオチドは一塩基シフトにより互いに異なるだけである。I S I S 4 2 0 9 5 5で処置された動物のデータを31日に取った。

【0603】

【表71】

表71

PBS対照と比較したカニクイザルの肝臓におけるトランスサイレチンmRNAの阻害

ISIS番号	阻害率(%)
304299	59
420915	78
420921	54
420922	61
420950	91
420955*	79
420957	64
420959	55

(※31日目のデータ)

【0604】

タンパク質分析

カニクイザルを血液採取前に一晩絶食させた。全ての利用可能な動物からおおよそ1mLの血液を採取し、EDTAのカリウム塩を含む管に入れた。該管を遠心し(3000rpm、室温で10分間)血漿を得た。血漿中のトランスサイレチンのタンパク質レベルを、臨床分析機器を用いて測定した。血漿試料を、投与前(-5日目)並びに1、9、16、23、30、44、58、72、および86日目に、採取した。表72に示される結果は投与前レベルと比較した阻害率(%)を表わしており、I S I Sオリゴヌクレオチド処理でのタンパク質レベルにおける時間依存的な減少を示している。最終的な血漿中TTRレベルは表73に示され、TTRのタンパク質レベルの減少およびTTRのmRNA阻害の間に強い相関関係が明示される(表71)。特に、I S I S 4 2 0 9 1 5処置は、I S I S 3 0 4 2 9 9処置よりも、血漿中TTRタンパク質をより強く阻害したが(76%阻害対47%阻害)、この2つのオリゴヌクレオチドは一塩基シフトにより互いに異なるだけである。

【0605】

【表 7 2】

表 7 2

投与前のレベルと比較したカニクイザルの血漿におけるトランスサイレチンタンパク質レベルの減少の時間経過

ISIS 番号	0 日目	9 日目	16 日目	23 日目	30 日目	44 日目	58 日目	72 日目	86 日目
304299	4	15	21	23	26	27	31	38	47
420915	2	8	23	34	42	54	63	70	76
420921	5	11	21	31	23	27	30	40	50
420922	0	17	37	42	49	49	50	49	54
420950	0	39	63	68	72	79	85	82	87
420955	0	42	63	80	81	n/a	n/a	n/a	n/a
420957	2	18	28	26	26	35	35	41	50
420959	0	25	29	28	32	38	42	43	50

n/a : ISIS 420955 処置された動物については 31 日目に試験が終了したため、後日のデータは入手不可である。

【0606】

【表 7 3】

表 7 3

投与前のレベルと比較したカニクイザルの血漿における 86 日目のトランスサイレチンタンパク質レベルの減少

ISIS 番号	減少率
304299	47
420915	76
420921	50
420922	54
420950	87
420957	50
420959	50

【0607】

血漿中の RBP4 のタンパク質レベルについても、ELISA キットを用いて測定した。血漿試料を、投与前（-5 日目）並びに 9、16、23、30、44、58、72、および 86 日目に、採取した。表 7 4 に示される結果は、投与前レベルと比較した阻害率（％）を表わしている。いくつかの ISIS オリゴヌクレオチド（ISIS 420915、ISIS 420922、ISIS 420950、ISIS 420955 および ISIS 420959）は、TTR 減少に付随して、タンパク質レベルにおける時間依存的な減少を示している。最終的な血漿中 RBP4 レベルを表 7 5 に示し、またその結果により、上記オリゴヌクレオチド処置時に、RBP4 および TTR のタンパク質レベルの減少（表 7 3）の間に強い相関関係が明示される。特に、ISIS 420915 処置は、ISIS 304299 処置よりも、血漿中 RBP4 タンパク質をより大きく阻害するが（63% 阻害対 19% 阻害）、その 2 つのオリゴヌクレオチドは一塩基対シフトにより互いに異なるのみである。

【0608】

【表 7 4】

表 7 4

投与前のレベルと比較したカニクイザルの血漿における R B P 4 タンパク質レベルの減少
の時間経過

ISIS 番号	9 日目	16 日目	23 日目	30 日目	44 日目	58 日目	72 日目	86 日目
304299	0	6	10	4	1	9	13	19
420915	5	22	22	30	38	47	54	63
420921	0	0	0	0	0	0	6	24
420922	4	19	16	34	33	29	15	32
420950	30	44	46	47	52	54	47	48
420955	6	36	53	65	n/a	n/a	n/a	n/a
420957	0	10	0	0	0	0	3	27
420959	18	22	14	17	19	25	22	34

n/a : I S I S 4 2 0 9 5 5 処置された動物については 3 1 日目に試験が終了したため、後日のデータは入手不可である。

【0 6 0 9】

【表 7 5】

表 7 5

投与前のレベルと比較したカニクイザルの血漿における 8 6 日目の R B P 4 タンパク質レベルの減少

ISIS 番号	減少率
304299	19
420915	63
420921	24
420922	32
420950	48
420957	27
420959	34

【0 6 1 0】

忍容性試験

体重および臓器重量の測定

動物の健康全般に対する I S I S オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、体重および臓器重量を 8 6 日目に測定した。I S I S 4 2 0 9 5 5 で処置された動物のデータは 3 1 日目に取った。体重を測定し投与前レベルでの体重と比較した。臓器重量を測定し、処置群の重量を対応する P B S 対照群の体重と比較した。データを表 7 6 に示す。

【0 6 1 1】

【表 7 6】

表 7 6

投与前のレベルと比較したカニクイザルにおける最終的な体重および臓器重量の変化率
(%)

ISIS 番号	体重	肝臓重量	腎臓重量	脾臓重量
304299	+6	+27	+37	+53
420915	+6	+37	+26	+41
420921	+4	+42	+43	+22
420922	+4	+45	+39	+63
420950	0	+204	+166	+297
420955*	-3	+36	+81	+70
420957	-6	+55	+184	+109
420959	0	+57	+101	+112

(※ 31 日目のデータ)

【0 6 1 2】

肝機能

肝機能に対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、血液試料を全ての試験群から採取した。血液試料は血清分離のために抗凝結剤なしで管に採取された。管を室温に 90 分間置き、その後遠心し (3000 rpm、室温で 10 分間)、血清を得た。トランスアミナーゼの濃度を、Toshiba 200FR NEO chemistry analyzer (東芝、日本) を用いて測定した。ALT (アラニントランスアミナーゼ) および AST (アスパラギン酸トランスアミナーゼ) の血漿中濃度を 86 日目に測定し、その結果を IU/L 表示で表 77 に示す。アルカリホスファターゼは、損傷した肝臓細胞では合成量が増加し、これも肝臓疾患のマーカーであるが、同様に測定された。C-re 活性タンパク質 (CRP) は、肝臓で合成され炎症のマーカーとして利用されるが、これについても同様に 86 日目に測定された。アルカリホスファターゼおよび CRP の両方のデータも、表 77 に示す。また、ビリルビンも肝臓代謝マーカーであり、同様に測定され、mg/dL 表示で表 77 に示される。

【0 6 1 3】

【表 7 7】

表 7 7

カニクイザル血漿における肝臓代謝マーカーに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果

	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	CRP (mg/L)	ビリルビン (mg/dL)
PBS	60	54	955	2.4	0.24
ISIS304299	81	101	747	3.3	0.17
ISIS420915	68	62	672	1.6	0.15
ISIS420921	98	107	832	3.2	0.14
ISIS420922	94	96	907	2.4	0.15
ISIS420950	132	94	1032	12.9	0.11
ISIS420957	100	73	868	23.5	0.15
ISIS420959	70	63	811	16.0	0.13

【0 6 1 4】

腎機能

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、血液試料を全

ての試験群から採取した。血液試料は血清分離のために抗凝結剤なしで管に採取された。管を室温に90分間置き、その後遠心し(3000rpm、室温で10分間)、血清を得た。BUNおよびクレアチニンの濃度を、Toshiba 200FR NEO chemistry analyzer (東芝、日本)を用いて、86日目に測定した。結果をmg/dL表示で表78に示す。

【0615】

尿試料を、試験5日前、並びに25日目および84日目に、特殊なステンレス鋼ケージ便器からドレナージにより採取した。クレアチニンに対する全尿蛋白の比を、Toshiba 200FR NEO chemistry analyzer (東芝、日本)を用いて測定し、その結果を表79に示す。

【0616】

【表78】

表78

カニクイザルにおける血漿中BUNおよびクレアチニンレベルに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果 (mg/dL)

	BUN	クレアチニン
PBS	28	0.86
ISIS304299	27	0.85
ISIS420915	25	0.90
ISIS420921	33	0.99
ISIS420922	28	0.86
ISIS420950	36	0.97
ISIS420957	35	0.86
ISIS420959	27	0.89

【0617】

【表79】

表79

カニクイザルにおけるクレアチニンに対する尿蛋白の比に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果

	-5日目	25日目	84日目
PBS	0.003	0.01	0.00
ISIS304299	0.000	0.01	0.00
ISIS420915	0.003	0.00	0.00
ISIS420921	0.033	0.13	0.09
ISIS420922	0.010	0.05	0.02
ISIS420950	0.008	0.29	0.21
ISIS420955	0.000	0.61	n/a
ISIS420957	0.000	0.48	0.36
ISIS420959	0.005	0.08	0.03

n/a: ISIS420955処置された動物については31日目に試験が終了したため、後日のデータは入手不可である。

【0618】

血液学的分析

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効果を評価するために

、利用可能な試験動物からおよそ0.5 mLの血液を試料としてEDTAのカリウム塩を含む管に採取した。ADVIA 120 hematology analyzer（バイエル、米国）を用いて、試料を分析し、赤血球（RBC）数、白血球（WBC）数、単球、好中球、リンパ球等の個々の白血球細胞の割合（%）、並びに血小板数およびヘマトクリット（%）を求めた。データを表80に示す。

【0619】

【表80】

表80

カニクイザルにおける血液学的パラメータに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処
置の効果

	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	血小板 ($\times 1000/\mu\text{L}$)	ヘマトクリット (%)	リンパ球 (%)	好中球 (%)	単球 (%)
PBS	9.6	5.3	415	40	62	35	1.8
ISIS304299	11.6	5.2	395	38	68	26	3.1
ISIS420915	10.3	5.1	382	36	72	22	3.5
ISIS420921	9.8	5.2	385	36	60	34	2.5
ISIS420922	11.6	5.2	396	37	62	29	5.4
ISIS420950	13.7	4.4	260	33	51	34	7.8
ISIS420957	18.6	4.7	298	33	52	35	9.1
ISIS420959	7.7	4.8	306	32	62	29	5.5

【0620】

炎症に関する因子の分析

炎症に関与する因子に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、血液を86日目に全ての利用可能な動物から採取し、補体C3分析およびサイトカインレベルの測定を行った。補体C3分析を目的として、血清分離のために血液試料を抗凝血剤なしで管に採取した。該管を室温に90分置き、その後遠心し（3000 rpm、室温で10分間）、血清を得た。補体C3を、自動分析器（Toshiba 200 FR NEO chemistry analyzer、東芝、日本）を用いて測定した。データをmg/dL表示で表81に示す。

【0621】

サイトカインレベル分析を目的として、血漿分離のために血液をEDTAを含む管に採取した。その後、該管を遠心し（3000 rpm、室温で10分間）、血漿を得た。血漿試料を、ケモカインおよびサイトカインのレベルを測定するために、オーション・バイオシステムズ社（Aushon Biosystems Inc.）（マサチューセッツ州ビルリカ）に送った。TNF- α のレベルを、それぞれの霊長類抗体を用いて測定し、MIP-1 α 、MCP-1、およびMIP-1 β のレベルを、それぞれの交差反応ヒト抗体を用いて測定した。測定は、処置開始の5日前、並びに3日目および86日目に行った。結果を表82～85に示す。

【0622】

【表 8 1】

表 8 1

カニクイザルにおける補体 C 3 に対するアンチセンスオリ
ゴヌクレオチド処置の効果 (m g / d L)

	C3
PBS	133
ISIS304299	96
ISIS420915	104
ISIS420921	91
ISIS420922	102
ISIS420950	70
ISIS420957	69
ISIS420959	95

10

【 0 6 2 3】

【表 8 2】

表 8 2

カニクイザルにおける MCP-1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果
(p g / m L)

	-5 日目	3 日目	86 日目
PBS	232	362	206
ISIS304299	219	292	427
ISIS420915	204	342	400
ISIS420921	281	407	2120
ISIS420922	215	482	838
ISIS420950	170	370	3355
ISIS420957	208	308	3485
ISIS420959	237	715	2035

30

【 0 6 2 4】

【表 8 3】

表 8 3

カニクイザルにおけるTNF- α に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果
(pg/mL)

	-5日目	3日目	86日目
PBS	60	46	16
ISIS304299	46	35	24
ISIS420915	113	83	30
ISIS420921	57	50	56
ISIS420922	30	59	46
ISIS420950	48	54	266
ISIS420957	29	33	87
ISIS420959	22	77	74

10

【0625】

【表 8 4】

表 8 4

カニクイザルにおけるMIP-1 α に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果
(pg/mL)

	-5日目	3日目	86日目
PBS	6	7	7
ISIS304299	6	7	9
ISIS420915	5	5	10
ISIS420921	8	11	9
ISIS420922	9	8	5
ISIS420950	7	9	5
ISIS420957	6	6	6
ISIS420959	9	6	5

20

30

【0626】

【表 8 5】

表 8 5

カニクイザルにおけるMIP-1 β に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果
(pg/mL)

	-5日目	3日目	86日目
PBS	13	19	42
ISIS304299	17	23	54
ISIS420915	15	27	72
ISIS420921	23	43	112
ISIS420922	9	41	70
ISIS420950	8	25	126
ISIS420957	16	27	182
ISIS420959	36	46	117

40

50

【0627】

凝固試験

凝固経路に関与する因子に対するISISオリゴヌクレオチドの効果を評価するために、凝固に関する標準的な試験を行った。PTおよびaPTTを、カニクイザルから得た乏血小板血漿（PPP）を用いて、48時間にわたって測定した。PTおよびaPTTの値を、秒表示で表86および87に示す。また、血漿中のフィブリノーゲンレベルを48時間にわたって定量化し、そのデータを表88に示す。表86～88に示されるように、PT、aPTTおよびフィブリノーゲンは、PBS対照と比較して、ISISオリゴヌクレオチド処置されたカニクイザルにおいて有意に変化しなかった。

【0628】

【表86】

表86

PTに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置の効果（秒）

	0時間	1時間	4時間	8時間	24時間	48時間
PBS	10.08	10.38	10.10	10.33	9.83	9.40
ISIS304299	10.38	10.30	10.48	10.20	9.95	9.53
ISIS420915	10.15	10.13	10.38	9.93	9.75	9.48
ISIS420921	10.28	10.13	10.43	10.18	9.80	9.55
ISIS420922	9.95	10.00	10.05	9.70	9.48	9.28
ISIS420950	10.30	10.47	10.57	10.27	9.63	9.50
ISIS420957	10.63	10.47	10.60	10.77	10.33	10.27
ISIS420959	10.08	10.10	10.20	10.15	9.80	9.55

【0629】

【表87】

表87

PTTに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果（秒）

	0時間	1時間	4時間	8時間	24時間	48時間
PBS	19.40	19.70	20.13	20.20	19.43	17.30
ISIS304299	21.83	24.35	27.05	25.73	22.40	18.78
ISIS420915	20.05	22.83	23.83	24.00	21.78	17.90
ISIS420921	24.15	26.68	31.78	31.90	27.80	22.15
ISIS420922	25.28	29.48	34.83	33.90	29.13	25.08
ISIS420950	28.13	31.40	35.40	35.40	31.40	28.37
ISIS420957	29.13	33.27	39.13	37.40	36.50	29.93
ISIS420959	22.45	24.73	29.18	28.38	25.50	20.65

【0630】

【表 8 8】

表 8 8

フィブリノーゲンに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果 (mg/dL)

	0 時間	1 時間	4 時間	8 時間	24 時間	48 時間
PBS	212	203	240	247	282	272
ISIS304299	175	172	198	207	227	200
ISIS420915	213	196	204	258	257	215
ISIS420921	208	209	230	237	301	249
ISIS420922	278	277	335	338	400	304
ISIS420950	293	295	348	376	390	296
ISIS420957	280	299	344	330	434	328
ISIS420959	276	277	354	326	414	320

10

【0 6 3 1】

甲状腺パネル分析

甲状腺ホルモンに対する ISIS オリゴヌクレオチドの効果を評価するために、処置開始の 5 日前並びに 51 日目および 86 日目に、サルを一晩絶食させ、3.5 mL の血液をそれぞれの利用可能な試験動物から採血した。採取した血液試料を、血清分離のために抗凝結剤なしで管に保存した。管を室温に 90 分間置き、その後遠心し (3000 rpm、室温で 10 分間)、血清を得た。血清試料を、パネル分析のためにエモリー大学の生物マーカー中央研究所 (Biomarkers Core Laboratory) (ジョージア州アトランタ) に送った。甲状腺刺激ホルモン (TSH) に関する結果を、 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 表示で表 89 に示す。全 T3 ホルモンおよび遊離型 T3 ホルモンに関する結果を、表 90 および 91 に示す。全 T4 ホルモンおよび遊離型 T4 ホルモンに関する結果を、表 92 および 93 に示す。全体的に、甲状腺パネル分析により、トランスサイレチン発現レベルが減少しても全ての動物は許容できるホルモンレベル内に維持されることが示され、このことはトランスサイレチンのアンチセンスオリゴヌクレオチドがホルモンレベルに影響しなかったことを明示している。

20

【0 6 3 2】

【表 8 9】

表 8 9

TSH に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果 ($\mu\text{L}/\text{mL}$)

	-5 日目	51 日目	86 日目
PBS	0.8	0.7	1.0
ISIS304299	1.4	1.0	2.2
ISIS420915	1.4	1.5	2.5
ISIS420921	0.7	0.6	1.0
ISIS420922	1.0	1.2	1.9
ISIS420950	0.6	2.2	5.4
ISIS420957	0.6	2.6	4.9
ISIS420959	0.9	1.6	4.7

40

【0 6 3 3】

【表 9 0】

表 9 0

全T 3に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果 (n g / d L)

	-5 日目	51 日目	86 日目
PBS	177	248	140
ISIS304299	202	226	176
ISIS420915	156	206	156
ISIS420921	217	204	137
ISIS420922	188	177	131
ISIS420950	260	208	105
ISIS420957	266	160	78
ISIS420959	299	219	137

10

【 0 6 3 4】

【表 9 1】

表 9 1

遊離T 3に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果 (p g / m L)

	-5 日目	51 日目	86 日目
PBS	7.7	5.8	5.2
ISIS304299	9.2	6.0	4.7
ISIS420915	8.9	5.6	4.5
ISIS420921	10.2	4.8	4.0
ISIS420922	8.9	5.4	3.7
ISIS420950	7.2	3.8	2.1
ISIS420957	8.8	4.0	2.4
ISIS420959	8.3	4.9	3.3

20

30

【 0 6 3 5】

【表 9 2】

表 9 2

全T 4に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果 (n g / d L)

	-5 日目	51 日目	86 日目
PBS	5.8	4.9	4.4
ISIS304299	8.1	5.5	6.1
ISIS420915	8.3	5.7	5.5
ISIS420921	7.6	6.1	5.6
ISIS420922	7.3	6.1	5.8
ISIS420950	6.1	6.3	5.7
ISIS420957	6.3	4.4	5.0
ISIS420959	7.9	5.9	8.1

40

【 0 6 3 6】

【表 9 3】

表 9 3

遊離 T 4 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果 (p g / m L)

	-5 日目	51 日目	86 日目
PBS	3.4	2.4	1.7
ISIS304299	3.2	2.5	1.7
ISIS420915	5.0	1.8	1.7
ISIS420921	2.6	1.5	1.5
ISIS420922	3.5	1.6	1.5
ISIS420950	2.5	1.2	1.1
ISIS420957	2.4	1.2	1.2
ISIS420959	3.8	1.4	1.5

10

【0 6 3 7】

薬物動態試験

オリゴヌクレオチド濃度の測定

完全長オリゴヌクレオチドの濃度および総オリゴヌクレオチド濃度（分解された形態も含む）を測定した。使用された方法は既刊の方法を改変したものであり（Leeds et al., 1996; Geary et al., 1999）、フェノールクロロホルム（液-液）抽出とそれに続く固相抽出から成る。内部標準（ISIS355868、27塩基長の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、GCGTTTGCTCTTCTTCTTGTGCGTTT、本明細書では配列番号166と指定される）を抽出前に加えた。組織試料濃度を、定量下限（LLOQ）がおよそ1.14 μg / gである検量線を用いて計算した。肝臓中の濃度に対する腎臓中の濃度の比率を計算した。結果をμg / 組織のg表示で表94および95に示す。

20

【0 6 3 8】

【表 9 4】

表 9 4

カニクイザルの肝臓における完全長オリゴヌクレオチド濃度 (μ g / g)

ISIS 番号	腎臓	肝臓	腎臓 / 肝臓比
304299	2179	739	2.9
420915	2439	1064	2.3
420921	4617	1521	3.0
420922	3957	1126	3.5
420950	3921	1082	3.6
420955	2444	1111	2.2
420957	3619	1230	2.9
420959	3918	1158	3.4

30

40

【0 6 3 9】

【表 9 5】

表 9 5

カニクイザルの肝臓における総オリゴヌクレオチド濃度 ($\mu\text{g}/\text{g}$)

ISIS 番号	腎臓	肝臓	腎臓／肝臓比
304299	3098	992	3.1
420915	3024	1266	2.4
420921	6100	1974	3.1
420922	4861	1411	3.4
420950	6003	1553	3.9
420955	2763	1208	2.3
420957	5420	1582	3.4
420959	5498	1501	3.7

【配列表】

0005896175000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	25/20	(2006.01)	A 6 1 P	25/20	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/02	1 0 3
A 6 1 P	1/10	(2006.01)	A 6 1 P	1/10	
A 6 1 P	1/12	(2006.01)	A 6 1 P	1/12	
A 6 1 P	1/08	(2006.01)	A 6 1 P	1/08	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	13/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/00	
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	1 0 1
A 6 1 P	9/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/06	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	27/06	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	27/06	
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/22	(2006.01)	A 6 1 P	25/18	
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	25/22	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	25/24	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	15/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
			A 6 1 P	15/10	

(74)代理人 100092967

弁理士 星野 修

(74)代理人 100117813

弁理士 深澤 憲広

(72)発明者 モニア, ブレット・ピー

アメリカ合衆国カリフォルニア州92008, カールスバッド, ラザフォード・ロード 1896

(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92008, カールスバッド, ラザフォード・ロード 1896

(72)発明者 シウコウスキー, アンドリュー・エム

アメリカ合衆国カリフォルニア州92009, カールスバッド, アリカンティ・ロード 7317
ービー

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 国際公開第2010/017509 (WO, A1)

国際公開第2010/048228 (WO, A1)

米国特許出願公開第2005/0244869 (US, A1)

PNAS, 2010年 2月, Vol.107, No.5, pp.1864-1869

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-15/90

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

JSTPlus/JMEDPlus (JDreamIII)

Genbank/EMBL/DDBJ/GenSeq
PubMed