

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2017年1月19日(19.01.2017)



(10) 国際公開番号  
WO 2017/010500 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12N 15/113* (2010.01) *A61P 7/02* (2006.01)  
*A61K 31/7088* (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/070642
- (22) 国際出願日: 2016年7月13日(13.07.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2015-140081 2015年7月13日(13.07.2015) JP
- (71) 出願人: 協和発酵キリン株式会社 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 山田 陽史(YAMADA, Yoji); 〒1948533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 創薬技術研究所内 Tokyo (JP). 岩井宏徒(IWAI, Hiroto); 〒1948533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 創薬技術研究所内 Tokyo (JP). 梶田 和宏(MASUDA, Kazuhiro); 〒1948533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 創薬技術研究所内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2017/010500 A1

(54) Title: ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE INHIBITING B2GPI EXPRESSION

(54) 発明の名称:  $\beta$  2 G P I の発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a novel nucleic acid with which  $\beta$ 2GPI expression can be inhibited and a pharmaceutical composition for the prevention or treatment of diseases associated with  $\beta$ 2GPI expression. The foregoing is achieved by providing an antisense oligonucleotide having  $\beta$ 2GPI expression-inhibiting activity, a pharmaceutical composition comprising the antisense oligonucleotide, and a drug that contains the antisense oligonucleotide, inhibits expression of  $\beta$ 2GPI, and prevents or treats autoimmune diseases such as APS or SLE and thrombosis during hemodialysis.

(57) 要約: 本発明の目的は、 $\beta$ 2GPIの発現を抑制することが可能な新規核酸、並びに、 $\beta$ 2GPIの発現に関連する疾患を予防または治療するための医薬組成物を提供することである。本発明は、 $\beta$ 2GPIの発現抑制活性を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、該アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物ならびに該アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む $\beta$ 2GPIの発現を抑制し、APS、SLEなどの自己免疫疾患ならびに血液透析における血栓症の予防または治療薬を提供することで上記課題を解決する。

## 明 細 書

発明の名称：

**$\beta$  2 G P I の発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド**

### 技術分野

[0001] 本発明は、 $\beta$  2GPIの発現抑制に用いるためのアンチセンスオリゴヌクレオチド又は該アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物に関する。

### 背景技術

[0002]  $\beta$  2-Glycoprotein 1 ( $\beta$  2GPI) (別名apolipoprotein H (apoH) とも言う) は326残基のアミノ酸から構成される可溶性の糖蛋白質であり、主に肝臓で産生される (International Journal of Clinical and Laboratory Research, 1992年, 第21巻, p256-263)。 $\beta$  2GPIは多彩な生理作用を有すると考えられており、血小板凝集反応、凝固・線溶反応、酸化LDLのマクロファージへの取り込みに関与していることが報告されている (非特許文献1)。

[0003] 疾患との関連については、 $\beta$  2GPIは抗リン脂質抗体症候群 (APS) や全身性エリテマトーデス (SLE) といった自己免疫疾患において出現する抗リン脂質抗体の主要な対応抗原であることが知られている。抗 $\beta$  2GPI抗体は疾患の病態形成にも深く関与しており、 $\beta$  2GPIと抗 $\beta$  2GPI抗体によって形成される複合体は血管内皮細胞、単球、血小板、栄養芽細胞 (trophoblast) といった様々な細胞の膜上受容体に活性化シグナルを発生させ、その結果、血栓症や妊娠異常といったAPSに特徴的な病態を引き起こし得ることが動物モデルを用いた研究ならびに臨床研究より明らかとなっている (非特許文献2)。 $\beta$  2GPIおよび抗 $\beta$  2GPI抗体からなる免疫複合体の形成を特異的に阻害することにより、上記の疾患を予防あるいは治療できると期待できるが、 $\beta$  2GPIは血中に50-500  $\mu$ g/mLという比較的高濃度で存在しており、これら全ての $\beta$  2GPIを例えば一般的な抗体医薬によって阻害し続けることは容易ではない (非特許文献3)。

[0004] 一方、遺伝子の発現自体を抑制する方法として、例えばアンチセンス法が

知られている（特許文献1）。具体的には、標的とする遺伝子のmRNAもしくはmRNA前駆体等に対して相補的なオリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、細胞内に導入すると標的とする遺伝子のmRNAもしくはmRNA前駆体と二本鎖を形成し、該標的遺伝子の発現を特異的に抑制することができる。また、アンチセンス法以外の遺伝子の発現を抑制する方法として、RNA干渉(RNA interference、以下、RNAiと呼ぶ)を利用した方法も知られている。この方法では、標的とする遺伝子と同一の配列を有する二本鎖RNA(siRNA)を導入することにより、該標的遺伝子の発現を特異的に抑制することができる（特許文献2）。

[0005] ヒト $\beta$ 2GPIを標的とするsiRNA配列の一部は開示されているが（特許文献3、4）、該遺伝子の発現を抑制することは知られておらず、また、アンチセンスオリゴヌクレオチドがヒト $\beta$ 2GPI遺伝子の発現を抑制することも知られていない。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0006] 特許文献1：国際公開第98/56905号パンフレット  
特許文献2：国際公開第2001/75164号パンフレット  
特許文献3：国際公開第2005/116204号パンフレット  
特許文献4：国際公開第2008/043561号パンフレット

### 非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Ann. N. Y. Acad. Sci., 1285, 44-58 (2013)  
非特許文献2：N. Engl. J. Med., 368, 1033-1044 (2013)  
非特許文献3：J. Thromb. Haemost., 9, 1275-1284 (2011)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、 $\beta$ 2GPIの発現を抑制することが可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供することを目的とする。また、本発明は $\beta$ 2GPIの発現に関連

する疾患を予防または治療するための医薬組成物を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、以下の(1)～(17)に関する。

(1) 8～80塩基長からなるアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、配列番号201～399のいずれかで表される塩基配列からなる核酸(表1-1～1-4に記載された「標的塩基配列」)にストリンジントな条件でハイブリダイズ可能な配列を含む、 $\beta$ 2GPIの発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(2) 8～80塩基長からなるアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、配列番号2～200のいずれかで表される塩基配列(表1-1～1-4に記載された「アンチセンス塩基配列」)の連続する少なくとも8塩基を含む、 $\beta$ 2GPIの発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(3) 8～80塩基長からなるアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、配列番号201～399のいずれかで表される塩基配列(表1-1～1-4の「標的塩基配列」に記載された群から選択される塩基配列)と相補的である、アンチセンスオリゴヌクレオチド。

(4) 配列番号2～200のいずれかで表される塩基配列(表1-1～1-4の「アンチセンス塩基配列」に記載された群から選択される塩基配列)を含む、(3)に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(5) 配列番号2～200のいずれかで表される塩基配列において1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列を含む、(3)に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(6) 配列番号2～200のいずれかで表される塩基配列からなるアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(7) 配列番号400～680のいずれかで表される塩基配列からなるアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(8) 5'末端近傍及び／又は3'末端近傍が糖部修飾ヌクレオチドで構成される、(1)～(7)のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(9) リガンドを含む、(1)～(8)のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(10) (1)～(9)のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、医薬組成物。

(11) 自己免疫疾患又は血栓症の治療又は予防用である、(10)に記載の医薬組成物。

(12) 抗 $\beta$ 2GPI抗体により媒介される障害を治療する方法であって、治療上有効量の(1)～(9)のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は(10)もしくは(11)に記載の医薬組成物を、そのような治療を必要とするヒトに投与するステップを含む方法。

(13) 前記障害が、自己免疫疾患又は血栓症である、(12)に記載の方法。

(14) 抗 $\beta$ 2GPI抗体により媒介される障害の予防又は治療用の医薬組成物を製造するための、(1)～(9)のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用。

(15) 前記障害が、自己免疫疾患又は血栓症である、(14)に記載の使用。

(16) 抗 $\beta$ 2GPI抗体により媒介される障害の予防又は治療における使用のための、(1)～(9)のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(17) 前記障害が、自己免疫疾患又は血栓症である、(16)に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

## 発明の効果

[0010] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は該アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物を投与することによって、 $\beta$ 2GPIの発現を抑制することが可能となる。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は該アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物は $\beta$ 2GPIの発現に関連する疾患、特に抗 $\beta$ 2GPI抗体により媒介される障害の治療又は予防に有用である。

## 発明を実施するための形態

[0011] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドが標的とする $\beta$ 2GPIをコードする遺伝子(以下、 $\beta$ 2GPI遺伝子ともいう)は、Genbank Accession No. NM\_000

042として登録されている、 $\beta$ 2GPIの完全長mRNAに対応するcDNA塩基配列(配列番号1)が挙げられる。

[0012] 1. 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド

本発明において、アンチセンスオリゴヌクレオチドとは標的遺伝子をコードするDNA並びにこのようなDNAから転写されるmRNA前駆体およびmRNAに対して相補的なオリゴヌクレオチドであり、当該アンチセンスオリゴヌクレオチドが標的とするDNA、mRNA前駆体又はmRNAと二本鎖又は三本鎖を形成することによりDNA、mRNA前駆体又はmRNAの働き(転写、転写後編集、翻訳など)を抑制する。アンチセンスオリゴヌクレオチドには、標的となるDNA、mRNA前駆体又はmRNAと完全に相補的であるもののみならず、DNA、mRNA前駆体又はmRNAとストリンジентな条件でハイブリダイズできる限り、1もしくは数個のミスマッチが存在するものも含まれる。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドとは、標的遺伝子にハイブリダイズする核酸であれば、ヘアピンオリゴマー、環状オリゴマーの形態中に導入されてもよく、内部または末端のバルジまたはループなどの構造要素を含有してもよい。

本発明は、 $\beta$ 2GPIの発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド(本明細書中、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドともいう)を提供する。

[0013] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、ヌクレオチド又は該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した分子であればいかなる分子であってもよく、例えばデオキシリボヌクレオチドの重合体であるDNA、リボヌクレオチドの重合体であるRNA、DNAとRNAとからなるキメラ核酸及びこれらの核酸の少なくとも一つのヌクレオチドが該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子で置換されたヌクレオチド重合体が挙げられる。またRNA中のウラシル(U)は、DNAにおいてはチミン(T)に一義的に読み替えることができる。

[0014] ヌクレオチドと同等の機能を有する分子としては、例えばヌクレオチド誘導体等が挙げられる。ヌクレオチド誘導体としては、ヌクレオチドに修飾を

施した分子であればいかなる分子であってもよいが、例えばDNAまたはRNAと比較して、ヌクレアーゼ耐性の向上もしくは安定化させるため、相補鎖核酸とのアフィニティーを上げるため、細胞透過性を上げるため、又は可視化させるために、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドに修飾を施した分子等が好適に用いられる。

[0015] ヌクレオチドに修飾を施した分子としては、例えば糖部修飾ヌクレオチド、リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチド、塩基修飾ヌクレオチド、ならびに糖部、リン酸ジエステル結合及び塩基の少なくとも一つが修飾されたヌクレオチド等が挙げられる。

[0016] 糖部修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドの糖の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、又は任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよいが、2'-修飾ヌクレオチドが好ましく用いられる。

[0017] 2'-修飾ヌクレオチドとしては、例えばリボースの2'-OH基がR、R' OR、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、CN、F、Cl、Br及びIからなる群(Rはアルキルまたはアリール、好ましくは炭素数1~6のアルキルであり、R' はアルキレン、好ましくは炭素数1~6のアルキレンである)から選択される置換基で置換された2'-修飾ヌクレオチドが挙げられ、該置換基としては好ましくはF、メトキシ基が挙げられる。また、2-(methoxy)ethoxy基、3-aminopropoxy基、2-[(N,N-dimethylamino)oxy]ethoxy基、3-(N,N-dimethylamino)propoxy基、2-[2-(N,N-Dimethylamino)ethoxy]ethoxy基、2-(methylamino)-2-oxoethoxy基、2-(N-methylcarbamoyl)ethoxy基及び2-cyanoethoxy基からなる群から選択される置換基で置換された2'-修飾ヌクレオチド等も好ましい置換基として挙げられる。より好ましくはメトキシ基及び2-(methoxy)ethoxy基からなる群から選択される置換基で置換された2'-修飾ヌクレオチド等が挙げられる。

[0018] また、糖部修飾ヌクレオチドとしては、糖部に架橋構造を導入することにより2つの環状構造を有する架橋構造型人工核酸(Bridged Nucleic Acid)(BNA)も好適に用いられる。具体的には、2'位の酸素原子と4'位の炭素原子がメチ

レンを介して架橋したロックト人工核酸(Locked Nucleic Acid)(LNA) [Tetrahedron Letters, 38, 8735, (1997)及びTetrahedron, 54, 3607, (1998)]、エチレン架橋構造型人工核酸(Ethylene bridged nucleic acid)(ENA)[Nucleic Acid Research, 32, e175(2004)]、Constrained Ethyl (cEt)[The Journal of Organic Chemistry 75, 1569 (2010)]、Amido-Bridged Nucleic Acid (AmNA)[Chem Bio Chem 13, 2513 (2012)]及び2'-O,4'-C-Spirocyclopropylene bridged nucleic acid (scpBNA)[Chem. Commun., 51, 9737 (2015)]等が挙げられる。

[0019] さらにペプチド核酸(PNA)[Acc. Chem. Res., 32, 624 (1999)]、オキシペプチド核酸(OPNA)[J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)]、ペプチドリボ核酸(PRNA)[J. Am. Chem. Soc., 122, 6900 (2000)]等も糖部修飾ヌクレオチドとして挙げられる。

[0020] リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、又は任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、リン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がホスホロジチオエート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がアルキルホスホネート結合に置換されたヌクレオチド、リン酸ジエステル結合がホスホロアミデート結合に置換されたヌクレオチド等が挙げられ、好ましくはリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に置換されたヌクレオチドが挙げられる。

[0021] 塩基修飾ヌクレオチドとしては、ヌクレオチドの塩基の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の置換基で修飾もしくは置換したもの、又は任意の原子で置換したものであればいかなるものでもよく、例えば、塩基内の酸素原子が硫黄原子で置換されたもの、水素原子が炭素数1~6のアルキル基、ハロゲン基で置換されたもの、メチル基が水素、ヒドロキシメチル、炭素数2~6のアルキル基で置換されたもの、アミノ基が炭素数1~6のアルキル基、炭素数1~6のアルカノイル基、オキソ基、ヒドロキシ基等に置換されたものが挙



げられる。なお、シトシン (C) の代わりに5-メチルシトシン (5-mC) を塩基修飾ヌクレオチドとして用いることも、本発明の好ましい形態の一つである。

[0022] ヌクレオチド誘導体としては、ヌクレオチド又は糖部、リン酸ジエステル結合もしくは塩基の少なくとも一つが修飾されたヌクレオチド誘導体に、コレステロール、脂肪酸、トコフェロール、レチノイドなどの脂質類、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、ガラクトース(Gal)、マンノース(Man)などの糖類、フル抗体、Fab (Fragment antigen-binding抗体)、scFv (Single-chain variable fragment抗体) 及びVHH (variable domain of heavy chain抗体) などの抗体、低密度リポタンパク質 (LDL)、ヒト血清アルブミンなどのタンパク質、RGD、NGR、R9、CPP (cell penetrating peptide) などのペプチド類、フェナジン、フェナントリジン、アントラキノン、葉酸などの低分子、合成ポリアミノ酸などの合成ポリマー、核酸アプタマー、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリンなどの色素、Cy3シリーズ、Alexaシリーズ、ブラックホールクエンチャーなどの蛍光団等の別の化学物質を、直接又はリンカーを介して付加したのもも挙げられる。具体的にはポリアミン付加ヌクレオチド誘導体、コレステロール付加ヌクレオチド誘導体、ステロイド付加ヌクレオチド誘導体、GalNAc付加ヌクレオチド誘導体、胆汁酸付加ヌクレオチド誘導体、脂肪酸付加ヌクレオチド誘導体、ビタミン付加ヌクレオチド誘導体、Cy5付加ヌクレオチド誘導体、Cy3付加ヌクレオチド誘導体、6-FAM付加ヌクレオチド誘導体及びビオチン付加ヌクレオチド誘導体等が挙げられ、好ましくはGalNAc付加ヌクレオチド誘導体が挙げられる。これらは、固相上での伸長反応時に、固相上で反応可能な修飾剤を反応させることで、5' 末端、3' 末端及び／又は配列内部に修飾を施すことができる。また、アミノ基、メルカプト基、アジド基または3重結合などの官能基を導入した核酸をあらかじめ合成および精製しておき、それらに修飾剤を作用させることで得ることもできる。

[0023] ヌクレオチド誘導体は、核酸内の他のヌクレオチド又はヌクレオチド誘導

体とアルキレン構造、ペプチド構造、ヌクレオチド構造、エーテル構造、エステル構造及びこれらの少なくとも一つを組み合わせた構造等の架橋構造を形成してもよい。

[0024] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、その分子中の一部あるいは全部の原子が質量数の異なる原子（同位体）で置換されたものも包含する。

本明細書において「相補」とは、2つの塩基間で塩基対合をし得る関係を意味し、例えば、アデニンとチミンまたはウラシルとの関係、並びにグアニンとシトシンとの関係のように緩やかな水素結合を介して、二重鎖領域全体として2重螺旋構造をとるものをいう。

[0025] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの長さは、8～80塩基であり、8～30塩基が好ましい。例えば、8～20塩基、10～20塩基、13～20塩基、13～16塩基、13塩基、14塩基、15塩基、16塩基、17塩基、18塩基、19塩基、20塩基であり得る。

[0026] 特定の好ましい具体的な塩基配列は本明細書中に記載されるが、表1-1～1-4に記載されたアンチセンス塩基配列の中から選択された少なくとも8個の連続した塩基を含む長さ8～80塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた、好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドと言える。表1に記載されたアンチセンス塩基配列の中から選択された、より好ましくは9個以上、さらに好ましくは10個以上、より一層好ましくは11個以上、特に好ましくは12個以上、最も好ましくは13個の連続した塩基を含む、長さ8～80塩基、好ましくは8～30塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた、好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドと言える。

[0027]

[表1-1]

配列番号	アンチセンス塩基配列	配列番号	標的塩基配列
2	GAGCACTGGAGAA	201	TTCTCCAGTGCTG
3	TGAGCACTGGAGA	202	TCTCCAGTGCTCA
4	AGATGAGCACTGG	203	CCAGTGCTCATCT
5	AGCAACATGGCAG	204	CTGCCATGTTGCT
6	TAGCAACATGGCA	205	TGCCATGTTGCTA
7	ATAGCAACATGGC	206	GCCATGTTGCTAT
8	CAATAGCAACATG	207	CATGTTGCTATTG
9	GCAATAGCAACAT	208	ATGTTGCTATTGC
10	CCTGCAATAGGAA	209	TTGCTATTGCAGG
11	TCCTGCAATAGCA	210	TGCTATTGCAGGA
12	GTCCTGCAATAGC	211	GCTATTGCAGGAG
13	TCCGTCCTGCAAT	212	ATTGCAGGACCGA
14	GTCCGTCCTGCAA	213	TTGCAGGACCGAC
15	GGTCCGTCCTGCA	214	TGCAGGACCGACC
16	AGGTCCGTCCTGC	215	GCAGGACCGACCT
17	CAGGTCCGTCCTG	216	CAGGACCGACCTG
18	TGGGACAGTCCG	217	CGGACCTGTCCCA
19	TTGGGACAGTCCG	218	GGACCTGTCCCAA
20	GGCTTGGGACAGG	219	CCTGTCCCAAGCC
21	TGGCTTGGGACAG	220	CTGTCCCAAGCCA
22	CTGGCTTGGGACA	221	TGTCCCAAGCCAG
23	TCTGGCTTGGGAC	222	GTCCCAAGCCAGA
24	CATCTGGCTTGGG	223	CCCAAGCCAGATG
25	TCATCTGGCTTGG	224	CCAAGCCAGATGA
26	ATCATCTGGCTTG	225	CAAGCCAGATGAT
27	AATCATCTGGCTT	226	AAGCCAGATGATT
28	AAATCATCTGGCT	227	AGCCAGATGATTT
29	TCCTGGCTCATAG	228	CTATGAGCCAGGA
30	CTCCTGGCTCATA	229	TATGAGCCAGGAG
31	TCTCCTGGCTCAT	230	ATGAGCCAGGAGA
32	CCGGCTTGCAGGA	231	TCCTGCAAGCCGG
33	CCCGGCTTGCAGG	232	CCTGCAAGCCGGG
34	GCCCGGCTTGCAG	233	CTGCAAGCCGGGC
35	AGCCCGGCTTGC	234	TGCAAGCCGGGCT
36	TAGCCCGGCTTGC	235	GCAAGCCGGGCTA
37	ATAGCCCGGCTTG	236	CAAGCCGGGCTAT
38	CATAGCCCGGCTT	237	AAGCCGGGCTATG
39	ACACATAGCCCGG	238	CCGGGCTATGTGT
40	GACACATAGCCCG	239	CGGGCTATGTGTC
41	TGTGAGAGGGCAG	240	CTGCCCTCTCACA
42	TTGATGGGCCAGA	241	TGTGGCCCATCAA
43	GTTGATGGGCCAC	242	GTGGCCCATCAAC
44	TGTTGATGGGCCA	243	TGGCCCATCAACA
45	GTGTTGATGGGCC	244	GGCCCATCAACAC
46	GGACATACTCTGG	245	CCAGAGTATGTCC
47	AGGACATACTCTG	246	CAGAGTATGTCTT
48	AAGGACATACTCT	247	AGAGTATGTCTTT
49	AAAGGACATACTC	248	GAGTATGTCTTTT
50	GCTCCATTTTCTA	249	TAGAAAATGGAGC
51	GGGATATTCAAAA	250	TTTTGAATATCCC
52	TGGGATATTCAAA	251	TTTGAATATCCCA
53	TTGGGATATTCAA	252	TTGAATATCCCAA
54	GTTGGGATATTC	253	TGAATATCCCAAC
55	GCACTTGGCAGAA	254	TTCTGCCAAGTGC
56	TGCACTTGGCAGA	255	TCTGCCAAGTGCA
57	GTGCACTTGGCAG	256	CTGCCAAGTGCA
58	AGTGCACTTGGCA	257	TGCCAAGTGCACT

[0028]

[表1-2]

配列番号	アンチセンス塩基配列	配列番号	標的塩基配列
59	CGAGTGCAGTTGGC	258	GCCAAGTGCAGTGT
60	CTCAGTGCAGTTG	259	CAAGTGCAGTGTGAG
61	CCTCAGTGCAGTT	260	AAGTGCAGTGTGAGG
62	TCCTCAGTGCAGT	261	AGTGCAGTGTGAGGA
63	TTGCTCAGTGCAC	262	GTGCACTGTGAGGAA
64	CTTCCTCAGTGC	263	TGCACTGTGAGGAAG
65	CCTTCCTCAGTGC	264	GCACTGTGAGGAAGG
66	TCCTTCCTCAGTG	265	CACTGTGAGGAAGGA
67	GCTGATGGCTTAT	266	ATAAGCCATCAGC
68	AGCTGATGGCTTA	267	TAAGCCATCAGCT
69	CAGCTGATGGCTT	268	AAGCCATCAGCTGT
70	CCAGCTGATGGCT	269	AGCCATCAGCTGG
71	TCCAGCTGATGGC	270	GCCATCAGCTGGA
72	TTCCAGCTGATGG	271	CCATCAGCTGGAA
73	GTTTCCAGCTGAT	272	ATCAGCTGGAAAC
74	TGTTTCCAGCTGA	273	TCAGCTGGAAACA
75	TTGTTTCCAGCTG	274	CAGCTGGAAACAA
76	AACTGCTGTGTCC	275	GGACACAGCAGTT
77	AAAAAUCTGTGTG	276	CACAGCAGTTTTT
78	TGGCAAACATTCA	277	TGAATGTTTGCCA
79	GTGGCAAACATTC	278	GAATGTTTGCCAC
80	GTTGTGGCAAACA	279	TGTTTGCCACAAC
81	TGTTGTGGCAAAC	280	GTTTGCCACAACA
82	GCAATGTTGTGGCA	281	TGCCACAACATGC
83	CGCATGTTGTGGC	282	GCCACAACATGGG
84	TGGATGTTGTGG	283	CCACAACATGCCA
85	ATGGCATGTTGTG	284	CACAACATGCGAT
86	ACATGGCATGTTG	285	CAACATGCGATGT
87	TTCCAAACATCGC	286	GCGATGTTTGGA
88	AGTCSAATTTCCA	287	TGGAATTTGGACT
89	CCCTGCATTCTGG	288	CCAGAATGCAGGG
90	TCCCTGCATTCTG	289	CAGAATGCAGGGA
91	TTCCCTGCATTCT	290	AGAATGCAGGGAA
92	ATTGCTGGTCTT	291	AAGACCAGACAAT
93	CATTGCTGGTCT	292	AGACCAGACAATG
94	CCATTGCTGGTCT	293	GACCAGACAATGG
95	TCCATTGCTGGT	294	ACCAGACAATGGA
96	ATCCATTGCTGG	295	CCAGACAATGGAT
97	AATCCATTGCTG	296	CAGACAATGGATT
98	GCAGGATAGTTCA	297	TGAACTATCCTGC
99	GGTTTTGCAGGAT	298	ATCCTGCAAAAACC
100	TGGTTTTGCAGGA	299	TCCTGCAAAAODD
101	GGCTTTATCCTTG	300	CAAGGATAAAGCC
102	GTGGCTTTATCCT	301	AGGATAAAGCCAC
103	ATGTGGCTTTATC	302	GATAAAGCCACAT
104	AATGTGGCTTTAT	303	ATAAAGCCACATT
105	CCAAATGTGGCTT	304	AAGCCACATTTGG
106	CATCATGGCAGCC	305	GGCTGCCATGATG
107	CCATCATGGCAGC	306	GCTGCCATGATGG
108	TCCATCATGGCAG	307	CTGCCATGATGGA
109	ATCCATCATGGCA	308	TGCCATGATGGAT
110	TATCCATCATGGC	309	GCCATGATGGATA
111	ATATCCATCATGG	310	CCATGATGGATAT
112	CCCAGTTTGGTAC	311	GTACCAAACTGGG
113	TCCCAGTTTGGTA	312	TACCAAACTGGGA
114	TTCCCAGTTTGGT	313	ACCAAACTGGGAA
115	TTTCCCAGTTTGG	314	CCAAACTGGGAAA

[0029]

[表1-3]

配列番号	アンチセンス塩基配列	配列番号	標的塩基配列
116	GTTTCCCAGTTTG	315	CAAACCTGGGAAAC
117	CAGTTTCCCAGTT	316	AACTGGGAAACTG
118	CCAGTTTCCCAGT	317	ACTGGGAAACTGG
119	ACCAGTTTCCCAG	318	CTGGGAAACTGGT
120	GACCAGTTTCCCA	319	TGGGAAACTGGTC
121	AGACCAGTTTCCC	320	GGGAAACTGGTCT
122	GCAGACCAGTTTC	321	GAAACTGGTCTGC
123	GGCAGACCAGTTT	322	AAACTGGTCTGCC
124	TGGCAGACCAGTT	323	AACTGGTCTGCCA
125	ATGGCAGACCAGT	324	ACTGGTCTGCCAT
126	CATGGCAGACCAG	325	CTGGTCTGCCATG
127	GCATGGCAGACCA	326	TGGTCTGCCATGC
128	GGCATGGCAGACC	327	GGTCTGCCATGCC
129	TGGCATGGCAGAC	328	GTCTGCCATGCCA
130	TTGGCATGGCAGA	329	TCTGCCATGCCAA
131	CTTGGCATGGCAG	330	CTGCCATGCCAAG
132	ACTTGGCATGGCA	331	TGCCATGCCAAGT
133	AACTTGGCATGGC	332	GCCATGCCAAGTT
134	CAACTTGGCATGG	333	CCATGCCAAGTTG
135	ACAACTTGGCATG	334	CATGCCAAGTTGT
136	GCTTTACAACCTG	335	CAAGTTGTAAAGC
137	TCACAGGTACTTT	336	AAAGTACCTGTGA
138	ACADCACAGTGGC	337	GCCACTGTGGTGT
139	GTADACCACAGTG	338	CACTGTGGTGTAC
140	GGTADACCACAGT	339	ACTGTGGTGTACC
141	TGGTADACCACAG	340	CTGTGGTGTACCA
142	TTGGTADACCACA	341	TGTGGTGTACCAA
143	CTTGGTADACCAC	342	GTGGTGTACCAAG
144	CCTTGGTADACCA	343	TGGTGTACCAAGG
145	TCCTTGGTACACC	344	GGTGTACCAAGGA
146	CTCCTTGGTACAC	345	GTGTACCAAGGAG
147	TCTCCTTGGTACA	346	TGTACCAAGGAGA
148	CTCCTCCTTGGTAC	347	GTACCAAGGAGAG
149	TCTCCTCCTTGGTA	348	TACCAAGGAGAGA
150	CTCCTCCTTGGT	349	ACCAAGGAGAGAG
151	TCTCCTCCTTGG	350	CCAAGGAGAGAGA
152	CTCCTCCTCCTTG	351	CAAGGAGAGAGAG
153	ACTCCTCCTCCTT	352	AAGGAGAGAGAGT
154	TACTCCTCCTCCT	353	AGGAGAGAGAGTA
155	TTACTCCTCCTCC	354	GGAGAGAGAGTAA
156	GCATTCCATTCTT	355	AAGAATGGAATGC
157	AGCATTCCATTCT	356	AGAATGGAATGCT
158	AGCTACACTTCTT	357	AAGAAGTGTAGCT
159	TAGCTACACTTCT	358	AGAAGTGTAGCTA
160	TTGAAGCATTGGG	359	CCAAATGCTTCAA
161	GTTCCCTGAAGCA	360	TGCTTCAAGGAAC
162	TGTTCCCTGAAGC	361	GCTTCAAGGAACA
163	GTGTTCCCTGAAG	362	GTTCAAGGAACAC
164	TGTGTTCCCTGAA	363	TTCAAGGAACACA
165	CTGTGTTCCCTGA	364	TCAAGGAACACAG
166	ACTGTGTTCCCTG	365	CAAGGAACACAGT
167	AACTGTGTTCCCT	366	AAGGAACACAGTT
168	GAACTGTGTTCCCT	367	AGGAACACAGTTC
169	AGAACTGTGTTCC	368	GGAACACAGTTCT
170	GAGAACTGTGTTC	369	GAACACAGTTCTC
171	AGAGAACTGTGTT	370	AACACAGTTCTCT
172	CAGAGAACTGTGT	371	ACACAGTTCTCTG

[0030] [表1-4]

配列番号	アンチセンス塩基配列	配列番号	標的塩基配列
173	CCAGAGAACTGTG	372	CACAGTTCTCTGG
174	GCCAGAGAACTGT	373	ACAGTTCTCTGGC
175	AGCCAGAGAACTG	374	CAGTTCTCTGGCT
176	AAGCCAGAGAACT	375	AGTTCTCTGGCTT
177	GCATCAGTTTTCC	376	GGAAAACTGATGC
178	TGCATCAGTTTTCC	377	GAAAACTGATGCA
179	GATGCATCAGTTT	378	AAACTGATGCATC
180	GGATGCATCAGTT	379	AACTGATGCATCC
181	CGGATGCATCAGT	380	ACTGATGCATCCG
182	TCGGATGCATCAG	381	CTGATGCATCCGA
183	ATCGGATGCATCA	382	TGATGCATCCGAT
184	CATCGGATGCATC	383	GATGCATCCGATG
185	ACATCGGATGCAT	384	ATGCATCCGATGT
186	TACATCGGATGCA	385	TGCATCCGATGTA
187	TTACATCGGATGC	386	GCATCCGATGTAA
188	GCTTTACATCGGA	387	TCCGATGTAAAGC
189	GGCTTTACATCGG	388	CCGATGTAAAGCC
190	TGGCTTTACATCG	389	CGATGTAAAGCCA
191	TGTGGAATCTGAA	390	TTCAGATTCCACA
192	AGTGTGACATTTT	391	AAAATGTCACACT
193	AAGTGTGACATTT	392	AAATGTCACACTT
194	COTTGGATGAACA	393	TGTTCATCCAAAGG
195	TCOTTGGATGAAC	394	GTTTCATCCAAAGGA
196	GTTTCOTTGGATGA	395	TCATCCAAAGGAAC
197	GGTTCOTTGGATG	396	CATCCAAAGGAACC
198	AGGTTTCOTTGGAT	397	ATCCAAAGGAACCT
199	TAGGTTTCOTTGGA	398	TCCAAGGAACCTA
200	TTAGGTTTCOTTGG	399	CCAAGGAACCTAA

[0031] 典型的な好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドには、表1-1~1-4に記載されたアンチセンス塩基配列（配列番号2~200のいずれかで表される配列）の5'末端から少なくとも8個、より好ましくは9個以上、さらに好ましくは10個以上、より一層好ましくは11個以上、特に好ましくは12個以上、最も好ましくは13個の連続した核酸塩基を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。同様に好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドは、表1に記載されたアンチセンス塩基配列の3'末端から少なくとも8個以上、より好ましくは9個以上、さらに好ましくは10個以上、より一層好ましくは11個以上、特に好ましくは12個以上、最も好ましくは13個の連続した核酸塩基を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。

[0032] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、表2-1~2-3、表3-1~3-2又は4に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号400~680のいずれかで表される配列）を用いることが好ましい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、表2-1~2-3、表3-1~3-2及び4に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、該表に記載の $\beta$ 2GPI相対発現量が0.5以下であるアンチセンスオリゴヌクレオチド配列（例、配列番号407、408、415、418、424、427~430、437、440、443、445~454、456~460、462、463、465、470、471、481~484、492、505、506、508、509、511~519、523、524~527、529、531~533、535~537、539、542、546~548、550~554、558~560、565~569、574、575、577、578、582~597、599~641、643~680のいずれかで表される配列）を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることがより好ましく、さらに好ましくは $\beta$ 2GPI相対発現量が0.3以下であるアンチセンスオリゴヌクレオチド（例、配列番号445、450、456、457、459、462、471、482、509、513、514、518、523、525、526、529、553、565、566、567、584、585、586~597、599、600、602~611、613、615~621、624~630、633~641、643、644、645、647、648、649、651~657、659~680のいずれかで表される配列）、特に好ましくは $\beta$ 2GPI相対発現量が0.1以下であるアンチセンスオリゴヌクレオチド（例、配列番号586、587、588、590、591、592、593、602、603、604、605、608、617、618、620、624、625、627、636、640、641、652、656、659、660、661、662、663、664、665、666、667、668、669、671、672、673、675のいずれかで表される配列）を用いることができる。

[0033] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、 $\beta$ 2GPI遺伝子の一部の標的塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸を含み、かつ $\beta$ 2GPIの発現を抑制する核酸が用いられるが、該核酸のうち1~3塩基、好ましくは1~2塩基、より好ましくは1塩基が欠失、置換または付加したものをを用いてもよい。

[0034] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞内に導入されると、相補的なmRNA及びmRNA前駆体と結合し、mRNA及びmRNA前駆体が蛋白質に翻訳されるのを立体的に阻害して $\beta$ 2GPI遺伝子の発現を抑制することができる。

また、細胞内に導入された本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、

細胞内において、相補的なmRNA及びmRNA前駆体と結合し、mRNA及びmRNA前駆体を切断することもある。このような例として、RNAとDNAの二重鎖のRNA鎖を切断するエンドヌクレアーゼであるRNaseHを介した作用が知られている。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドが細胞内でmRNA及びmRNA前駆体と二重鎖を形成すると、内在性のRNaseHに認識され、相補的なmRNA鎖を酵素的に分解することができる。

[0035] RNaseHによるmRNA及びmRNA前駆体の切断を誘導するには、連続する4～80個のヌクレオチドからなるDNA領域を持つアンチセンスオリゴヌクレオチドが好ましい。この場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは0～80%の糖部修飾ヌクレオチドを持つことが好ましく、10～60%がより好ましく、20～50%がさらに好ましい。また、糖部修飾ヌクレオチドを持つ場合、DNA領域は、連続する4～20個のヌクレオチドからなることがより好ましく、連続する4～15個のヌクレオチドからなることがさらに好ましく、連続する5～10個のヌクレオチドからなることが最も好ましい。更に、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおける糖部修飾ヌクレオチドの位置は、5'末端近傍及び／又は3'末端近傍に配置することが好ましく、5'末端から全長の長さの30%以内の位置及び／又は3'末端から全長の長さの30%以内の位置に配置することがより好ましく、糖部修飾ヌクレオチドが、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端から全長の長さの25%以内の位置及び／又は3'末端から全長の長さの25%以内の位置に配置することがさらに好ましい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'末端近傍及び／又は3'末端近傍が糖部修飾ヌクレオチドで構成されることが特に好ましい。本明細書中、5'末端近傍が糖部修飾ヌクレオチドで構成されるとは、5'末端から1～4個、好ましくは2～4個の連続するヌクレオチドが糖部修飾ヌクレオチドであることを意味し、3'末端近傍が糖部修飾ヌクレオチドで構成されるとは、3'末端から1～4個、好ましくは2～4個の連続するヌクレオチドが糖部修飾ヌクレオチドであることを意味する。すなわち、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、その5'末端から1～4個のヌクレオチドが糖部修飾



ヌクレオチドであるアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることが好ましく、より好ましくは5'末端から2~4個のヌクレオチドが糖部修飾ヌクレオチドであるものを用いることができる。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、その3'末端から1~4個のヌクレオチドが糖部修飾ヌクレオチドであるアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることが好ましく、より好ましくは3'末端から2~4個のヌクレオチドが糖部修飾ヌクレオチドであるものを用いることができる。

[0036] 本発明において、ストリンジентな条件とは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドが $\beta$ 2GPI遺伝子の標的塩基配列に対してはハイブリダイズするが、その他の配列にはハイブリダイズしないか、するとしても標的塩基配列にハイブリダイズする量よりも大幅に少なく、相対的に無視できる程度の微量しかハイブリダイズしない条件を意味する。ハイブリダイゼーション反応および洗浄時の温度や、ハイブリダイゼーション反応液および洗浄液の塩濃度等を変化させることによって、このような条件を容易に選択することができる。具体的には6xSSC (0.9M NaCl, 0.09M クエン酸三ナトリウム) 又は6xSSPE (3M NaCl, 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20mM EDTA·2Na, pH7.4) 中42℃でハイブリダイズさせ、さらに42℃で0.5xSSCにより洗浄する条件が、ストリンジентな条件の一例として挙げられるが、これに限定されるものではない。ハイブリダイゼーションの方法としては、例えばサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることができる。具体的には、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、Current Protocols in Molecular Biology (1994) (Wiley-Interscience) 等に記載されている方法に準じて行うことができる。

[0037] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを製造する方法としては、特に限定されず、公知の化学合成を用いる方法、あるいは、酵素的転写法等が挙

げられる。公知の化学合成を用いる方法として、ホスホロアミダイト法、ホスホロチオエート法、ホスホトリエステル法、CEM法[Nucleic Acid Research, 35, 3287 (2007)]等を挙げることができ、例えば、ABI3900ハイスループット核酸合成機(アプライドバイオシステムズ社製)により合成することができる。合成が終了した後は、固相からの脱離、保護基の脱保護および目的物の精製等を行う。精製により、純度90%以上、好ましくは95%以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドを得るのが望ましい。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを製造する酵素的転写法としては、目的の塩基配列を有したプラスミド又はDNAを鋳型としてファージRNAポリメラーゼ、例えば、T7、T3、またはSP6RNAポリメラーゼを用いた転写による方法が挙げられる。

[0038] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、トランスフェクション用の担体、好ましくはカチオン性リポソーム等のカチオン性担体を用いて細胞内に導入することができる。また、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法又はマイクロインジェクション法などにより、直接細胞内に導入することもできる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、相補的なオリゴ核酸と二重鎖を形成させ、二重鎖核酸として細胞内に導入することで標的遺伝子の発現抑制を誘導することもできる(特許文献 国際公開第2005/113571号パンフレット)。この場合の二重鎖核酸をリガンドで修飾する位置は、相補的なオリゴ核酸の5'末端又は3'末端が好ましい。

[0039] 2.  $\beta$ 2GPIの発現抑制活性を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド

本発明の $\beta$ 2GPI遺伝子の一部の塩基配列に対して相補的な塩基配列からなるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、Genbank Accession No. NM\_000042として登録されているヒト $\beta$ 2GPIの完全長mRNAのcDNA塩基配列(配列番号1)あるいはゲノム配列に基づいて設計することができる。ヒト $\beta$ 2GPIの完全長mRNAのcDNAは例えば、Genbank Accession No. NM\_000042として登録されており、またヒト $\beta$ 2GPIのmRNA前駆体を含むゲノム配列は、例えばGenbank Accession No. NC\_000017.11として登録されている。

[0040]  $\beta$ 2GPI遺伝子の一部の標的塩基配列に対して相補的な塩基配列からなる核酸のうち、 $\beta$ 2GPIの発現抑制活性を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば表1～表4に記載された群から選択される塩基配列で構成されるアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドの長さは、8～80塩基であり、8～30塩基が好ましい。例えば、8～20塩基、10～20塩基、13～20塩基、13～16塩基、13塩基、14塩基、15塩基、16塩基、17塩基、18塩基、19塩基、20塩基であり得る。

[0041] これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に導入することにより、 $\beta$ 2GPIの発現を抑制することができる。例えば本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、数nM～数 $\mu$ Mの濃度で、細胞に導入した後、24時間以上、例えば48時間培養した段階で $\beta$ 2GPIの発現を抑制することができる。

[0042] また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの $\beta$ 2GPIの発現抑制活性の評価は、該アンチセンスオリゴヌクレオチドをカチオン性リポソームなどを用いて、もしくは該アンチセンスオリゴヌクレオチドをそのまま、あるいは該アンチセンスオリゴヌクレオチドを何らかのリガンドと結合させて、ヒト細胞株などへ導入し、一定時間培養した後、当該ヒト細胞株における $\beta$ 2GPIのmRNAの発現量を定量することにより行うことができる。

[0043] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、リガンドを含んでもよい。該リガンドは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端、3'末端および／または配列内部を、直接修飾するものであってもよい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドに含まれるリガンドとしては、生体分子と親和性のある分子であれば良いが、例えば、コレステロール、脂肪酸、トコフェロール、レチノイドなどの脂質類、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、ガラクトース(Gal)、マンノース(Man)などの糖類、フル抗体、Fab、scFv及びVHHなどの抗体、低密度リポタンパク質(LDL)、ヒト血清アルブミンなどのタンパク質、RGD、NGR、R9、CPPなどのペプチド類、葉酸などの低分子、合成ポリアミノ酸などの合成ポリマー、あるいは核酸アプタマーなどがあげられるがこれらに限定されず、これらを適宜組み合わせるこ

ともできる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドにリガンドを付加する方法としては、例えば、固相上での伸張反応時に、固相上で反応可能な修飾剤を反応させることで、5'末端、3'末端および／または配列内部に修飾を施すことができるが、これに限定されない。また、アミノ基、メルカプト基、アジド基または3重結合などの官能基を導入した核酸をあらかじめ合成および精製しておき、それらに修飾剤を作用させることでコンジュゲート核酸を得ることもできる。

### [0044] 3. 本発明の医薬組成物

本発明は、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する医薬組成物（本明細書中、本発明の医薬組成物ともいう）に関する。

当該医薬組成物は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞内に移行させるのに有効な担体をさらに含むことができる。本発明の医薬組成物は、APS、SLEといった自己免疫疾患及び血液透析等における血栓症の治療剤又は予防剤として用いることができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞内に移行させるのに有効な担体としては、例えばカチオン性担体が挙げられる。カチオン性担体としては、カチオン性リポソームおよびカチオン性ポリマーなどが挙げられる。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞内に移行させるのに有効な担体として、ウイルスエンベロープを利用した担体を用いてもよい。カチオン性リポソームとしては、2-0-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0-ジオレオイルグリセロールを含有するリポソーム(以下リポソームAともいう)、オリゴフェクトアミン(Invitrogen社)、リポフェクチン(Invitrogen社)、リポフェクトアミン(Invitrogen社)、リポフェクトアミン2000(Invitrogen社)、DMRIE-C(Invitrogen社)、GeneSilencer(Gene Therapy Systems社)、Trans Messenger(QIAGEN社)、TransIT TK0(Mirus社)などが好ましく用いられる。カチオン性ポリマーとしては、JetSI(Qbiogene社)、Jet-PEI(ポリエチレンイミン;Qbiogene社)などが好ましく用いられる。ウイルスエンベロープを利用し

た担体としては、GenomeOne(HVJ-Eリポソーム;石原産業社)などが好ましく用いられる。

[0045] 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドに上記担体を含む本発明の医薬組成物は、当業者に既知の方法により調製することができる。例えば、適当な濃度の担体分散液とアンチセンスオリゴヌクレオチド溶液とを混合して調製することができる。カチオン性担体を用いる場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは水溶液中で負電荷を帯びているため、常法により水溶液中で混合することによって容易に調製することができる。該組成物を調製するために用いる水性溶媒としては、注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水などの電解質液、ブドウ糖液、マルトース液などの糖液などが挙げられる。また、該組成物を調製する際のpHおよび温度などの条件は当業者が適宜選択できる。例えば、リポソームAの場合、10%マルトース水溶液中の16mg/mlのリポソーム分散液に、10%マルトース水溶液中のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、pH7.4、25℃で攪拌しながら徐々に添加して調製することができる。

[0046] 該組成物は、必要ならば超音波分散装置や高圧乳化装置などを用いて分散処理を行うことにより、均一な組成物とすることもできる。担体とアンチセンスオリゴヌクレオチドとを含む組成物の調製に最適な方法及び条件は、用いる担体に依存するので、当業者であれば、上記の方法にとらわれることなく、用いる担体に最適な方法を選択できる。

[0047] 本発明の医薬組成物としては、アンチセンスオリゴヌクレオチドとリード粒子とを構成成分とする複合粒子および該複合粒子を被覆する脂質膜から構成され、該脂質膜の構成成分が可溶性極性有機溶媒を含む液の中に、該脂質膜の構成成分が分散可能で、該複合粒子も分散可能な濃度で該極性有機溶媒を含む液が存在するリポソームも好適に用いられるが、これに限定されない。リード粒子としては、例えば、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイド、微粒子製剤等が挙げられ、好ましくはリポソームが用いられる。本発明におけるリード粒子は、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイド、微粒子製剤等を2つ以上組み合わせ

せた複合体を構成成分としていてもよく、脂質集合体、リポソーム、エマルジョン粒子、高分子、金属コロイド、微粒子製剤等と他の化合物(例えば糖、脂質、無機化合物等)とを組み合わせた複合体を構成成分としていてもよい。

[0048] 該複合粒子を被覆する脂質膜としては、例えば中性脂質およびポリエチレングリコール-ホスファチジルエタノールアミン等を構成成分とするものが挙げられる。

[0049] 該リポソームは、例えばW02006/080118等に記載の方法に従って調製することができる。

[0050] 本発明の医薬組成物に含まれるアンチセンスオリゴヌクレオチドと担体との配合比は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの1重量部に対して担体1~200重量部が適当である。好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの1重量部に対して担体2.5~100重量部、さらに好ましくは担体10~20重量部である。

[0051] 本発明の医薬組成物には、上記担体の他に、医薬的に許容できるキャリアー又は希釈剤などを含んでいてもよい。医薬的に許容できるキャリアー又は希釈剤などは、本質的に化学的に不活性及び無害な組成物であり、本発明の医薬組成物の生物学的活性に全く影響を与えないものである。そのようなキャリアー又は希釈剤の例は、塩溶液、糖溶液、グリセロール溶液、エタノールなどがあるが、これらに限定されない。

[0052] 本発明の医薬組成物は、 $\beta$ 2GPIの発現に関連する疾患、特に、抗 $\beta$ 2GPI抗体により媒介される障害の治療又は予防用に好適に用いることができる。本明細書中、抗 $\beta$ 2GPI抗体により媒介される障害とは、抗リン脂質抗体症候群(APS)、SLEといった自己免疫疾患及び血液透析における血栓症を指す。従って、本発明の医薬組成物は、APS、SLEといった自己免疫疾患及び血液透析における血栓症の治療剤又は予防剤として用いることができる。

[0053] 本発明の医薬組成物は、疾患の治療又は予防に有効な量の該複合体を含み、かつ、患者に適切に投与できるような形態で提供され得る。本発明の医薬組成物の製剤形態は、例えば注射剤、点眼剤、吸入用などの液剤、例えば軟

膏、ローション剤などの外用剤等であってもよい。

[0054] 液剤の場合、本発明の医薬組成物の濃度範囲は通常、0.001~25%(w/v)であり、好ましくは0.01~5%(w/v)であり、より好ましくは0.1~2%(w/v)である。本発明の医薬組成物は医薬的に許容される任意の添加剤、例えば、乳化補助剤、安定化剤、等張化剤、pH調整剤等を適当量含有していてもよい。医薬的に許容される任意の添加剤は、該複合体の分散前でも分散後でも適当な工程で添加することができる。

[0055] 本発明の医薬組成物は、凍結乾燥製剤として提供することもできる。凍結乾燥製剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチドと担体とを分散処理した後、凍結乾燥処理することにより調製することができる。凍結乾燥処理は、常法により行うことができる。例えば、上記の分散処理後の複合体溶液を無菌状態にて所定量をバイアル瓶に分注し、約-40~-20℃の条件で予備乾燥を約2時間程度行い、約0~10℃で減圧下に一次乾燥を行い、次いで、約15~25℃で減圧下に二次乾燥して凍結乾燥することができる。そして、例えばバイアル内部を窒素ガスで置換し、打栓することにより、本発明の医薬組成物の凍結乾燥製剤を得ることができる。

[0056] 本発明の医薬組成物を凍結乾燥製剤として提供する場合、本発明の医薬組成物を任意の適当な溶液の添加によって再溶解し、使用することができる。このような溶液としては、注射用水、生理食塩水などの電解質液、ブドウ糖液、その他一般輸液などを挙げることができる。この溶液の液量は、用途などによって異なり、特に制限されないが、凍結乾燥前の液量の0.5~2倍量、または500ml以下が好ましい。

[0057] 本発明の医薬組成物は、ヒトを含む動物に対し、例えば静脈内投与、動脈内投与、経口投与、組織内投与、経皮投与、経粘膜投与又は経直腸投与することができるが、患者の症状に合わせた適切な方法により投与することが好ましい。特に静脈投与、経皮投与、経粘膜投与が好ましく用いられる。また、癌内局所投与など、局所投与をすることもできる。これらの投与方法に適した剤型としては、例えば各種の注射剤、経口剤、点滴剤、吸収剤、点眼剤

、軟膏剤、ローション剤、坐剤等が挙げられる。

[0058] 本発明の医薬組成物の用量は、薬物、剤型、年齢や体重などの患者の状態、投与経路、疾患の性質と程度などを考慮した上で決定することが望ましいが、通常はアンチセンスオリゴヌクレオチドの質量として、成人に対して1日当たり、0.1mg~10g/日、好ましくは1mg~500mg/日である。場合によっては、これ以下でも十分であるし、また逆にこれ以上の用量を必要とすることもある。また1日1回~数回投与することもでき、1日~数日の間隔をおいて投与することもできる。

#### [0059] 4. 治療方法

本発明はさらに、 $\beta$ 2GPIの発現に関連する疾患、特に、抗 $\beta$ 2GPI抗体により媒介される障害を治療する方法であって、治療上有効量の、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は本発明の医薬組成物を、そのような治療を必要とするヒトに投与するステップを含む方法（本発明の治療方法）を提供する。

本発明の治療方法は、好ましくは、自己免疫疾患又は血栓症を治療する方法であって、治療上有効量の本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは本発明の医薬組成物を、該治療を必要とするヒトに投与することが特徴である。その他の工程および条件は、何ら制限されない。

[0060] 本発明の治療方法は、例えば、前記本発明の医薬組成物の投与方法、用量、調製方法等を援用できる。

[0061] 以下に、本発明を実施例により説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

### 実施例 1

#### [0062] $\beta$ 2GPI mRNAのノックダウン活性の測定

96ウェルの培養プレートにヒト肝臓癌由来の細胞株であるHuh7細胞（国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB細胞バンクより入手）を、5,000細胞/80 $\mu$ L/ウェルとなるよう播種した。培地は、10%ウシ胎仔血清(FBS)を含むMEM培地（ライフテクノロジー社製、カタログ番号11095-098）を用い



た。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、表2～表4に記載のものをジーンデザイン社または北海道システムサイエンス社にて合成して利用した。表2のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、小文字はDNAを、大文字は2'-O-メチル化RNAを示す。表3及び表4のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、小文字はDNAを、大文字はLNAを示し、mCは5-メチルシトシンLNAを示す。なお、表2～表4のいずれのアンチセンスオリゴヌクレオチドも各ヌクレオチドはリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合で置換されている。このアンチセンスオリゴヌクレオチドとLipofectamine LTX & Plus試薬(ライフテクノロジー社製、カタログ番号15338)とをOpti-MEM 培地(ライフテクノロジー社製、カタログ番号11058-021)で希釈して、アンチセンスオリゴヌクレオチドの終濃度が100nMとなるように20 $\mu$ Lのアンチセンスオリゴヌクレオチド/Lipofectamine混合液を各々96ウェルの培養プレートに添加し、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下で24時間培養した。その後、細胞をPBS (Phosphate buffered saline) で洗浄し、各々のプレートからCells-to-Ctキット (アプライドバイオシステムズ社製、カタログ番号:AM1728) を用いて製品に添付された説明書に記載された方法に従いcDNAを合成した。このcDNA 5 $\mu$ LをMicroAmpOptical 96ウェルプレート (アプライドバイオシステムズ社製、カタログ番号4326659) に加え、更に10 $\mu$ LのTaqMan Gene Expression Master Mix (アプライドバイオシステムズ社製、カタログ番号4369016)、3 $\mu$ LのUltraPure Distilled Water (ライフテクノロジー社製、カタログ番号:10977-015)、1 $\mu$ Lのhuman  $\beta$ 2GPIプローブ、1 $\mu$ Lのヒト GAPDHプローブを添加した。ABI7900 HTリアルタイムPCRシステムを用いて、ヒト  $\beta$ 2GPI遺伝子およびヒト GAPDH (D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) のリアルタイムPCRを行った。GAPDHは構成的発現遺伝子であり内部対照として測定し、 $\beta$ 2GPI発現量を補正した。アンチセンスオリゴヌクレオチドを添加せずにトランスフェクション試薬だけでHuh7細胞を処理した時の $\beta$ 2GPI mRNA量を1.0として、各アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した時の $\beta$ 2GPI mRNA相対発現量を算出した。本実験を2回行い、 $\beta$ 2GPI mRNA相対発現量の平均値を表2～表4に示した。

[0063] [表2-1]

配列番号	アンチセンス塩基配列	配列番号	アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'→3')	$\beta$ 2GPI 相対発現量
2	gggcaotgggaa	400	GAgacontggaGAA	0.570
3	tgagcaotggaga	401	UGagcaotggaAGA	0.652
4	agatgagcaotgg	402	AGatgagcaotUGG	0.652
5	agcaacatggcag	403	AGcaacatggCAQ	0.660
6	tagcaacatggca	404	UAgcaacatggGCA	0.697
7	atagcaacatggc	405	AUagcaacatggGCG	0.648
12	gtctgcaatagc	406	GUctgcaatAGC	0.528
14	gtcgtcctgcaaa	407	GUcgtcctgCAA	0.388
15	ggtcgtcctgca	408	GUcgtcctgGCA	0.447
16	aggtcgtcctgcn	409	AGgtcgtcctUGC	0.517
17	caggtcgtcctg	410	CAgttgcctcGUG	0.627
18	tgggacaggtcg	411	UGggacaggTCG	0.583
19	ttggacaggtc	412	UUGggacaggUCC	0.538
20	ggttgggacagg	413	GGttgggacAGG	0.691
21	tggttgggacag	414	UGgttgggacCAG	0.555
22	ctgggttgggaca	415	UUGgttgggACA	0.412
23	ctgggttgggac	416	UCgttgggtgGAC	0.583
24	aatgtggttggg	417	CActgttgggtGGG	0.663
25	tcctgtggttgg	418	UCctgttgggtUGG	0.373
26	atcatgtggtt	419	AUCatgttggGUU	0.537
27	aatcatgtggtt	420	AAatcatgttGUU	0.621
28	aatcatgttggct	421	AAatcatgttGCU	0.681
29	tcctgtgctcctag	422	UCctgtgctcaUAG	0.601
30	ctcctgtgctcata	423	CUcctgtgctAUA	0.537
31	ctcctgtgctcat	424	UCctgtgctCAU	0.402
32	cgggttgcaggca	425	CCgggttgcGGA	0.567
33	ccgggttgcagg	426	CCgggttgcAGG	0.581
34	gcccgggttgcag	427	GCcccgggttgcCAG	0.477
35	agcccgggttgc	428	AGcccgggttgcGCA	0.325
36	tagcccgggttgc	429	UAGcccgggttgcUGC	0.310
37	atagcccgggtt	430	AUagcccgggttGUU	0.402
38	catagcccgggtt	431	CAtagcccgggttGUU	0.583
39	acacatagcccgg	432	ACacatagcccGGG	0.629
40	gacacatagccc	433	GAacacatagcccCGG	0.687
41	tgtagagggcag	434	UGtagagggcCAG	0.652
42	ttgatgggcaca	435	UUGatgggcACA	0.572
43	gttgatgggcacc	436	GUtgatgggcCAC	0.606
44	gttgatgggcaca	437	UGttgatgggcCCA	0.479
45	gtttgatgggc	438	GUttgatgggcGCC	0.535
46	ggacatactctgg	439	GGacatactcUGG	0.505
47	aggacatactctg	440	AGgacatactcGUG	0.487
50	gctcattttcta	441	GCTcattttCUA	0.606
54	gttggatattca	442	GUtgggatUUA	0.663
55	gcacttggcagaa	443	GCacttggcGAA	0.499
56	tgcaacttggcaga	444	UGcaacttggcAGA	0.517
57	gtgcaacttggcag	445	GUgcaacttggcCAG	0.281
58	agtgcaacttggca	446	AGtgcaacttgcGCA	0.482
59	cagtgcacttggc	447	CAgtgcacttgcGGC	0.480
60	ctcagtgcaactg	448	CUcagtgcaactUUG	0.456
61	cctcagtgcaact	449	CCcagtgcaactUUU	0.387
62	tcctcagtgcaact	450	UCctcagtgcaactAGU	0.226
63	ttcctcagtgca	451	UUcctcagtgcaCAG	0.334
64	cttctcagtgca	452	CUctcagtgcaGCA	0.364
65	ccttctcagtgca	453	CCttctcagtgcaUGC	0.415
66	tcttctcagtg	454	UCttctcagtgGUG	0.425
67	gotgatggcttat	455	GCTgatggctUAU	0.695
68	agotgatggctta	456	AGotgatggctUUA	0.275
69	cagctgatggctt	457	CAgctgatggctUUU	0.225
70	ccagctgatggct	458	CCagctgatggctGCU	0.421
71	ttccagctgatgg	459	UCcagctgatggGCC	0.217
72	ttccagctgatgg	460	UUccagctgatggUGG	0.454
73	gtttccagctgat	461	GUttccagctGAU	0.535
74	gtttccagctga	462	UGttccagctGUA	0.249

[0064]

[表2-2]

配列番号	アンチセンス塩基配列	配列番号	アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'→3')	$\beta$ 2GPI 相対発現量
75	ttgtttccagctg	463	UUgtttccagCUG	0.302
76	aaacigtctgtcc	464	AAactgtctgtGCC	0.548
77	aaaaactgtgtg	465	AAaaaactgtctGUG	0.475
78	tggcaaacattca	466	UGgcaaacatUCA	0.581
79	gtggcaaacattc	467	GUggcaaacUUUC	0.660
80	gttgtggcaasca	468	GUtgtggcaACA	0.654
81	tgttgtggcaaac	469	UGttgtggcaAAC	0.676
82	gcctgttgggca	470	GCctgttgtgCCA	0.408
83	ggcctgttgggca	471	CGcctgttgtGGC	0.243
84	tgcctgttgggca	472	UCgctgttgtUGG	0.613
95	atcgcctgttggg	473	AUcgcctgttGUG	0.685
86	acatcgcctgttgg	474	ACatcgcctgtUUG	0.683
87	ttccaaacatcgc	475	UUccaaacatCGC	0.578
88	agtccaatttcca	476	AGtccaatttCCA	0.626
89	ccctgcatttctg	477	CCctgcatttUGG	0.583
90	tccctgcatttctg	478	UCcctgcatttCUG	0.548
91	ttccctgcatttct	479	UUccctgcatttCCU	0.683
92	attgtctgtctct	480	AUgtctgtctCCU	0.562
93	cattgtctgtctct	481	CAttgtctgttCCU	0.356
94	ccattgtctgtctc	482	CCattgtctgttGUC	0.253
95	tccattgtctgtct	483	UCcattgtcttGGU	0.345
96	atccattgtctgtg	484	AUccattgtctUGG	0.334
97	aatccattgtctgt	485	AAatccattgttCUG	0.669
98	gcaggatagttca	486	GCaggatagtUCA	0.550
99	ggttttgcaggat	487	GGttttgcagGAU	0.562
100	tgttttgcaggat	488	UGttttgcagGGA	0.637
101	ggctttatccttg	489	GGctttatctUUG	0.610
102	gtggctttatcct	490	GUggctttatCCU	0.672
108	catcatggcagcc	491	CAcatggcaGCC	0.888
107	ccatcatggcagcc	492	CCcatggcaAGC	0.427
108	tccatcatggcag	493	UCcatcatggCAG	0.691
109	atccatcatggca	494	AUccatcatgGCA	0.614
110	tatccatcatggc	495	UAatccatcatGCC	0.407
111	atccatcatcatgg	496	AUatccatcatUGG	0.607
112	cccagtttggta	497	CCcagtttggUAC	0.378
113	tcccagtttggta	498	UCcccagtttGUA	0.637
114	ttcccagtttgg	499	UUcccagtttGGU	0.512
115	ttcccagtttgg	500	UUcccagtttUGG	0.632
116	gtttcccagtttgg	501	GUttcccagttUUG	0.518
117	ccagtttcccagtt	502	CAgtttcccGUU	0.581
118	cccagtttcccag	503	CCagtttcccAGU	0.549
119	accagtttcccag	504	ACcagtttcccCAG	0.631
120	gaccagtttccc	505	GAaccagtttCCA	0.313
121	agaccagtttccc	506	AGaccagtttCCC	0.405
122	gcagaccagttt	507	GCagaccagttUUC	0.694
123	ggcagaccagttt	508	GGcagaccagttUUU	0.389
124	tggcagaccagtt	509	UGgcagaccagttUUU	0.219
125	atggcagaccag	510	AUggcagaccAGU	0.516
126	cattggcagaccag	511	CAttggcagaccCAG	0.426
127	gcattggcagacc	512	GCattggcagaccCCA	0.374
128	ggcattggcagacc	513	GGcattggcagaccACC	0.246
129	tggcattggcagacc	514	UGgcattggcagaccGAC	0.203
130	ttggcattggcagacc	515	UUggcattggcagaccAGA	0.479
131	cttggcattggcag	516	CUttggcattggCAG	0.305
132	acttggcattggcag	517	ACttggcattggCCA	0.356
133	aaacttggcattgg	518	AAacttggcattGGC	0.221
134	caacttggcattgg	519	CAacttggcattUGG	0.465
135	acaacttggcattg	520	ACAacttggcattAUG	0.679
136	gotttacaacttgg	521	GUtttacaacttUUG	0.598
137	tcacaggtacttt	522	UCacaggtactUUU	0.686
138	acaccacaggttgc	523	ACaccacaggtGGC	0.158
139	gtacaccacaggtg	524	GUaccaccacagGUG	0.478

[0065]

[表2-3]

配列番号	アンチセンス塩基配列	配列番号	アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'→3')	β2GPI 相対発現量
140	ggtaacaccacagt	525	GGtaacaccacAGU	0.267
141	fggtacaccacag	526	UGgtacaccacCAG	0.235
142	ftggtacaccaca	527	UUggtacaccACA	0.370
143	nttggtaaccacac	528	GUtggtaaccCAG	0.607
144	ccttggtaaccaca	529	CUtggtaaccACA	0.271
145	tccttggtaaccac	530	UCcttggtaaccACC	0.544
146	ctccttggtaacc	531	CUccttggtaaccCAG	0.325
147	ctccttggtaacc	532	UCccttggtaaccACA	0.496
148	ctccttggtaacc	533	CUccttggtaaccUAC	0.340
149	ctccttggtaacc	534	UCccttggtaaccGUA	0.624
150	ctccttggtaacc	535	CUccttggtaaccGUU	0.397
151	ctccttggtaacc	536	UCccttggtaaccUGG	0.309
152	ctccttggtaacc	537	CUccttggtaaccUUG	0.372
153	actctctctctct	538	ACtctctctctCUU	0.526
154	taactctctctct	539	UAactctctctCCU	0.489
155	ttactctctctct	540	UUactctctctUCC	0.604
156	gcattccattctt	541	GCattccattCUU	0.564
157	agcattccattct	542	AGcattccattUCU	0.342
158	agctacactcttt	543	AGctacactctGUU	0.507
159	tagctacactctt	544	UAgtacactctUCU	0.647
160	ttgaagcatttgg	545	UUgaagcattUGG	0.897
161	gttccttgaagca	546	GUtcttgaagCAA	0.332
162	gttccttgaagca	547	UGtcttgaagAGC	0.324
163	gttccttgaagca	548	GUtcttgaagAAG	0.496
164	gttccttgaagca	549	UGtcttgaagGAA	0.511
165	ctgttctcttga	550	CUgttctcttUGA	0.304
166	actgttctcttga	551	ACgttctcttUUG	0.353
167	aactgttctctt	552	AActgttctctCUU	0.449
168	gaactgttctct	553	GAactgttctCCU	0.262
169	agaactgttctct	554	AGaactgttctUCC	0.416
170	gagactgttctct	555	GAgactgttctUUC	0.588
171	agagaactgttct	556	AGagaactgttGUU	0.623
172	cagagaactgttct	557	CAgagaactgttUGU	0.569
173	ccagagaactgtt	558	CCagagaactgttGUG	0.428
174	gccagagaactgt	559	GCcagagaactgtUGU	0.457
175	agccagagaactgt	560	AGccagagaactgtCUG	0.314
176	aagccagagaact	561	AAgccagagaactACU	0.611
177	gcacagatttctc	562	GCacagatttcttUCC	0.888
178	tgacacagatttct	563	UGacacagatttcttUUC	0.693
179	gatgcacagattt	564	GAtgcacagatttGUU	0.534
180	ggatgcacagatt	565	GGatgcacagattGUU	0.134
181	cggatgcacagatt	566	CGatgcacagattAGU	0.188
182	tcggatgcacag	567	UCggatgcacagCAG	0.227
183	atcggatgcacac	568	AUcggatgcacacUGA	0.386
184	catcggatgcacac	569	CAtcggatgcacacAUU	0.497
185	acatcggatgcac	570	ACatcggatgcacCAU	0.528
186	tacatcggatgcac	571	UAcatcggatgcacGCA	0.594
187	ttacatcggatgc	572	UUacatcggatgcUGC	0.594
188	gotttacatcggac	573	GUtttacatcggacGGA	0.826
189	ggotttacatcgg	574	GGotttacatcggCGG	0.359
190	tgotttacatcgg	575	UGotttacatcggUCC	0.411
191	tgtggaatctgaa	576	UGtggaaatctGAA	0.671
192	agtgtggaatctt	577	AGtgtggaatctUUU	0.428
193	aagtgtggaatct	578	AAgtgtggaatctUUU	0.440
194	ccttggatgaaac	579	CCttggatgaaacACA	0.690
195	tccttggatgaaac	580	UCcttggatgaaacAAC	0.669
196	gttcttggatgaa	581	GUtcttggatgaaUGA	0.558
197	ggttcttggatg	582	GGttcttggatgAUG	0.432
198	aggttcttggatg	583	AGgttcttggatgGAU	0.354
199	taggttcttggatg	584	UAgttcttggatgGGA	0.278
200	ttaggttcttggatg	585	UUaggttcttggatgUGG	0.278

[0066]

[表3-1]

配列番号	アンチセンス塩基配列	配列番号	アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'→3')	A 2GPI 相対発現量
6	tagcaacatggca	586	TAgcaacatgGmCA	0.033
7	atagcaacatggc	587	ATagcaacatGGmC	0.067
8	caatagcaacatg	588	mCAatagcaacATG	0.065
9	gcaatagcaacet	589	GmCaatagcaamCAT	0.220
10	ccfgcaatagcae	590	mGmCtfgcaatagmCAA	0.093
11	tcctgcaatagca	591	TmCctgcaatsGmCA	0.043
12	gtcctgcaatagc	592	GTcctgcaatAGmC	0.025
13	tcogtcaatagca	593	TmCogtcaatgCAAT	0.082
14	gtccgtcaatagca	594	GTccgtcaatgCAA	0.161
15	ggccgtcaatagca	595	GGccgtcaatGmCA	0.141
22	ctggctggggaca	596	mCTggctgggAmCA	0.169
25	tcactctggctgg	597	TmCactctggctGG	0.134
31	tcctctggctcat	598	TmCctctggctmCAT	0.584
35	agcccgcttggca	599	AGcccgcttGmCA	0.295
36	tagcccgcttggc	600	TAgcccgctTGmC	0.231
37	ctagcccgcttgg	601	ATagcccgctTTG	0.357
45	gtgtgatgggccc	602	GTgtgatggGmGmC	0.058
46	ggacatactctgg	603	GGacatactTGG	0.009
48	aaaggacatactct	604	AAaggacatactmCT	0.020
49	aaaggacatactct	605	AAaggacatactmCTmC	0.012
51	gggatattcaaaa	606	GGgatattcaAAA	0.294
52	gggatattcaaaa	607	TGgatattcaAAA	0.104
53	tgggatattcaaa	608	TTgggatattmCAA	0.025
57	gtgcacttggcag	609	GTgcacttggmCAG	0.212
61	ctcacttggcactt	610	mCmCtcaacttggamCTT	0.201
62	tcctcacttggcact	611	TmCctcacttggAmCT	0.122
65	ccctcacttggcact	612	mCmCtctcacttggmCT	0.369
68	agctgatggctta	613	AGctgatggcTTA	0.193
69	cagctgatggctt	614	mCAGctgatggmCTT	0.448
70	ccagctgatggct	615	mCmCagctgatgGmCT	0.148
71	tcagctgatggc	616	TmCagctgatGGmC	0.289
74	tgtttccagctga	617	TGtttccagctGA	0.084
75	tgtttccagctg	618	TTgtttccagmCTG	0.042
82	gcacttggctgca	619	GmCacttggctGmCA	0.218
83	ccacttggctgca	620	mCccacttggctGmC	0.053
83	ccacttggctgca	621	mCActtggctgTmCT	0.217
94	ccattgtctgctc	622	mCmCattgtctgGmC	0.324
95	tcattgtctgctc	623	TmCattgtctGGT	0.422
96	atcattgtctgctg	624	ATcattgtctTGG	0.079
103	atgtgcttctatc	625	ATgtgcttctAmC	0.074
104	aatgtgcttctat	626	AAatgtgcttTAT	0.111
105	ccaatgtgcttct	627	mCmCaaatgtgctmCTT	0.019
107	ccatcatggcagc	628	mCmCcatcatggcAGmC	0.129
110	tatcatcatggc	629	TAtcatcatGGmC	0.204
112	ccacttggctgca	630	mCmCacttggctAmC	0.210
120	gaccagtttccca	631	GAccagtttcmCmCA	0.414
121	agaccagtttccc	632	AGaccagtttcmCmCmC	0.436
123	ggcagaccagttt	633	GGcagaccagTTT	0.136
124	ggcagaccagttt	634	TGcagaccagGTT	0.187
126	catggcagaccag	635	mCAtggcagaccmCAG	0.134
127	gcattggcagacc	636	GmCattggcagaccmCA	0.091
128	ggcattggcagacc	637	GGcattggcagAmCmC	0.163
129	ggcattggcagacc	638	TGcattggcagGmC	0.265
131	cttggcattggcag	639	mCTtggcattggmCAG	0.134
132	acttggcattggca	640	AmCtttggcattGmCA	0.086
133	aaacttggcattggc	641	AAacttggcattGGmC	0.061
138	acaccacagtggc	642	AmCaccacagtgGmC	0.501
140	ggtacaccacagtg	643	GGtacaccacAGT	0.137
144	cttggctacacca	644	mCmCtttggctacmCmCA	0.265
145	tccttggctacacc	645	TmCcttggctacAmCmC	0.232
146	ctccttggctacac	646	mCTccttggctamCmC	0.493
148	ctctccttggctac	647	mCTctccttggctAmC	0.119
150	ctctccttggct	648	mCTctccttggctGGT	0.250

[0067]

[表3-2]

配列番号	アンチセンス塩基配列	配列番号	アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'→3')	β 2GPI 相対発現量
151	tctctctcctgg	648	TmCtctctcctTGG	0.198
152	ctctctctccttg	650	mGTctctctctTGG	0.458
157	agcattccattct	651	AGcattccattTmCT	0.283
161	gttctctgaagca	652	GTtctctgaaGmCA	0.067
162	tgttctctgaagc	653	TGtctctgaAGmC	0.112
164	tgtgttctctgaa	654	TGtgttctctGAA	0.271
165	ctgtgttctctga	655	mCTgtgttctctTGA	0.148
166	actgtgttctctg	656	AmCTgtgttctctTTG	0.081
168	gaaactgtgttct	657	GAAactgtgttctmCmCT	0.218
169	agaactgtgttct	658	AGAactgtgtTmCmC	0.361
174	gcccagagactgt	659	GmCagagagactGT	0.007
176	agcccagagactg	660	AGcccagagactmCTG	0.013
179	gatgcactagttt	661	GATgcactagTTT	0.084
180	ggatgcactagtt	662	GgatgcactagTTT	0.052
181	cggatgcactcgt	663	mCGgatgcactAGT	0.061
182	tggatgcactcag	664	TmCggatgcactmCAG	0.072
183	atcggatgcactc	665	ATcggatgcactmCA	0.054
189	ggcttctcactcgg	666	GGcttctcactmCGG	0.021
192	agtgtagactttt	667	AGtgtagactTTT	0.081
193	aagttagactttt	668	AagttagactTTT	0.038
197	ggttccttgatg	669	GGttccttgATG	0.038
198	aggttctctggat	670	AGgttctctgCAT	0.109
199	taggttctctgga	671	TAGgttctctGGA	0.026
200	ttaggttctctgg	672	TTaggttctctTGG	0.019

[0068] [表4]

配列番号	アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'→3')	β 2GPI相対発現量
673	GGacatactcTGG	0.070
674	GGAcatactcTGG	0.249
675	AGGacatactcTGG	0.069
676	AAGgacatactcTGG	0.141
677	AAGgacatactmCTGG	0.107
678	AAGGacatactcTGG	0.205
679	AAGGacatactmCTGG	0.219
680	AAAGgacatactmCTGG	0.121

産業上の利用可能性

[0069] 本発明により、β 2GPIの発現抑制活性を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、該アンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分とする医薬組成物などが提供される。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび医薬組成物は、β 2GPIの発現を抑制し、APS、SLEなどの自己免疫疾患ならびに血液透析における血栓症の治療及び予防に有用である。

[0070] ここで述べられた特許、特許出願明細書、科学文献を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示された

と同程度に本明細書に組み込まれるものである。

[0071] 本出願は、日本で出願された特願2015-140081（出願日：2015年7月13日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

## 請求の範囲

- [請求項1] 8～80塩基長からなるアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、配列番号201～399のいずれかで表される塩基配列からなる核酸にストリンジентな条件でハイブリダイズ可能な配列を含む、 $\beta$ 2GPIの発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド。
- [請求項2] 8～80塩基長からなるアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、配列番号2～200のいずれかで表される塩基配列の連続する少なくとも8塩基を含む、 $\beta$ 2GPIの発現を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド。
- [請求項3] 8～80塩基長からなるアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、配列番号201～399のいずれかで表される塩基配列と相補的である、アンチセンスオリゴヌクレオチド。
- [請求項4] 配列番号2～200のいずれかで表される塩基配列を含む、請求項3に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。
- [請求項5] 配列番号2～200のいずれかで表される塩基配列において1もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列を含む、請求項3に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。
- [請求項6] 配列番号2～200のいずれかで表される塩基配列からなるアンチセンスオリゴヌクレオチド。
- [請求項7] 配列番号400～680のいずれかで表される塩基配列からなるアンチセンスオリゴヌクレオチド。
- [請求項8] 5'末端近傍及び／又は3'末端近傍が糖部修飾ヌクレオチドで構成される、請求項1～7のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。
- [請求項9] リガンドを含む、請求項1～8のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。
- [請求項10] 請求項1～9のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、医薬組成物。



- [請求項11] 自己免疫疾患又は血栓症の治療又は予防用である、請求項10に記載の医薬組成物。
- [請求項12] 抗 $\beta$ 2GPI抗体により媒介される障害を治療する方法であって、治療上有効量の、請求項1～9のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は請求項10もしくは11に記載の医薬組成物を、そのような治療を必要とするヒトに投与するステップを含む方法。
- [請求項13] 前記障害が、自己免疫疾患又は血栓症である、請求項12に記載の方法。
- [請求項14] 抗 $\beta$ 2GPI抗体により媒介される障害の予防又は治療用の医薬組成物を製造するための、請求項1～9のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用。
- [請求項15] 前記障害が、自己免疫疾患又は血栓症である、請求項14に記載の使用。
- [請求項16] 抗 $\beta$ 2GPI抗体により媒介される障害の予防又は治療における使用のための、請求項1～9のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。
- [請求項17] 前記障害が、自己免疫疾患又は血栓症である、請求項16に記載のアンチセンスヌクレオチド。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/070642

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/113(2010.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i,  
A61P7/02(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/113, A61K31/7088, A61K48/00, A61P7/02, A61P37/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN),  
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII), PubMed

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CA 2746981 A1 (REPLICOR INC.), 05 February 2012 (05.02.2012), paragraphs [0002], [0014]; example V; claims 26, 27, 33 (Family: none)	1-17
Y	Fumito WADA et al., "Kanzo-nai Torikomi no Josho o Mokuteki to shita Cholesterol Shushokugata Antisense Kakusan no Tainai, Oyobi Kanzonai Dotai Kaiseki", Abstracts of 134th Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, 2014.03, 29P-am12S, entire text, particularly, [Method], [Result·Study]	1-17

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
28 September 2016 (28.09.16)

Date of mailing of the international search report  
11 October 2016 (11.10.16)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2016/070642

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AGARWALA, A., et al., The Role of Antisense Oligonucleotide Therapy in Patients with Familial Hypercholesterolemia: Risks, Benefits, and Management Recommendations, Current Atherosclerosis Reports, 2014.11, 17:467, pp. 1/8 - 8/8, entire text	1-17
Y	GRAHAM, M. J., et al., Antisense Oligonucleotide Inhibition of Apolipoprotein C-III Reduces Plasma Triglycerides in Rodents, Nonhuman Primates, and Humans, Circulation Research, 2013, Vol. 112, No. 11, pp. 1479-1490, entire text including Supplemental Material	1-17
P,X	WO 2015/108162 A1 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), 23 July 2015 (23.07.2015), entire text (Family: none)	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/113(2010.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P7/02(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/113, A61K31/7088, A61K48/00, A61P7/02, A61P37/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	CA 2746981 A1 (REPLICOR INC.) 2012.02.05, [0002]、[0014]、EXAMPLE V、Claims 26、27、及び33等 (ファミリーなし)	1-17

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- |  |   |
|--|---|
| 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                                 | 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの     |
| 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                         | 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                     |
| 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                                      | 「&」 同一パテントファミリー文献   |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願                                   |   |

国際調査を完了した日

28.09.2016

国際調査報告の発送日

11.10.2016

国際調査機関の名称及びあて先  
 日本国特許庁 (ISA/J P)  
 郵便番号 100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 崇之

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

4152

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	和田郁人、他、 肝臓内取り込みの上昇を目的としたコレステロール修飾型アンチセンス核酸の体内、及び肝臓内動態解析、 日本薬学会第134年会要旨集, 2014. 03, 29P-am12S, 全文、特に[方法]、[結果・考察]	1-17
Y	AGARWALA, A., et al., The Role of Antisense Oligonucleotide Therapy in Patients with Familial Hypercholesterolemia: Risks, Benefits, and Management Recommendations, Current Atherosclerosis Reports, 2014. 11, 17:467, pp. 1/8 - 8/8, 全文	1-17
Y	GRAHAM, M. J., et al., Antisense Oligonucleotide Inhibition of Apolipoprotein C-III Reduces Plasma Triglycerides in Rodents, Nonhuman Primates, and Humans, Circulation Research, 2013, Vol. 112, No. 11, pp. 1479-1490, Supplemental Material を含む、 全文	1-17
P, X	WO 2015/108162 A1 (協和発酵キリン株式会社) 2015. 07. 23, 全文 (ファミリーなし)	1-17