

【図表75】

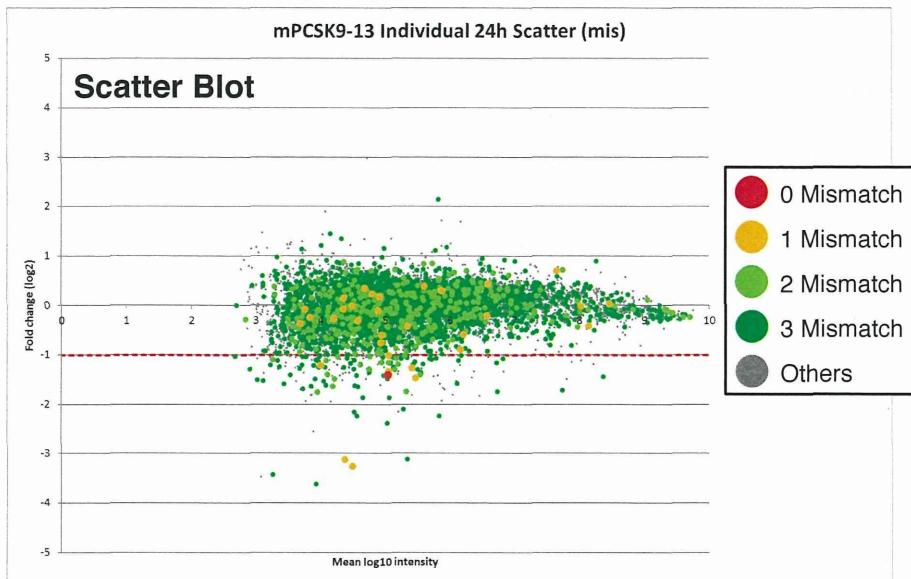
マイクロアレイの解析結果(マウス個体-24h)
 - mPCSK9-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -

| mPCSK9-13 | Mismatch | | | | Other | Total |
|-----------------------|----------|------|-----|------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | | |
| 1. In Silico Analysis | 2 | 54 | 773 | 6225 | 15901 | 26721 |
| 2. On Array | 2 | 48 | 641 | 5011 | 12262 | 21089 |
| 3. Present | 1 | 32 | 387 | 2980 | 6073 | 11284 |
| 4. Varied | 1 | 16 | 133 | 867 | 1654 | 3192 |
| 5. Down Regulated | 1 | 7 | 17 | 62 | 84 | 212 |
| 6. Percentage | 100 | 21.9 | 4.4 | 2.1 | 1.4 | 1.9 |

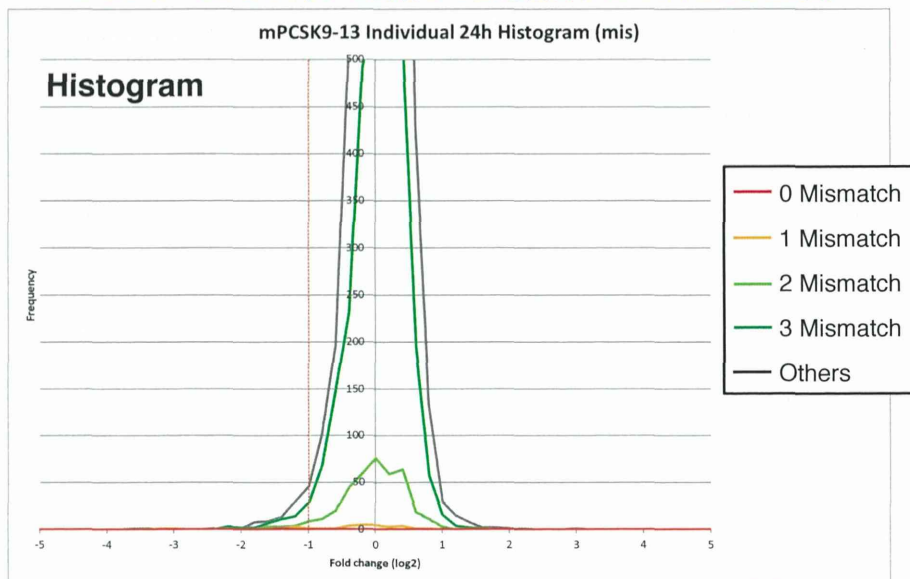
数値の解釈は図表22と同様である

【図表76】

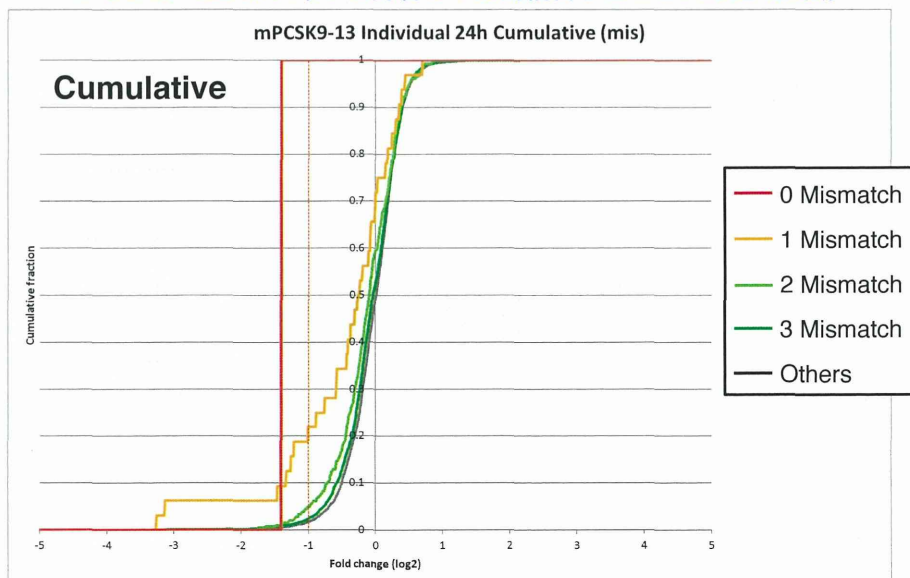
マイクロアレイの解析結果(マウス個体-24h)
 - mPCSK9-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



【図表77】 マイクロアレイの解析結果(マウス個体-24h)
 - mPCSK9-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -

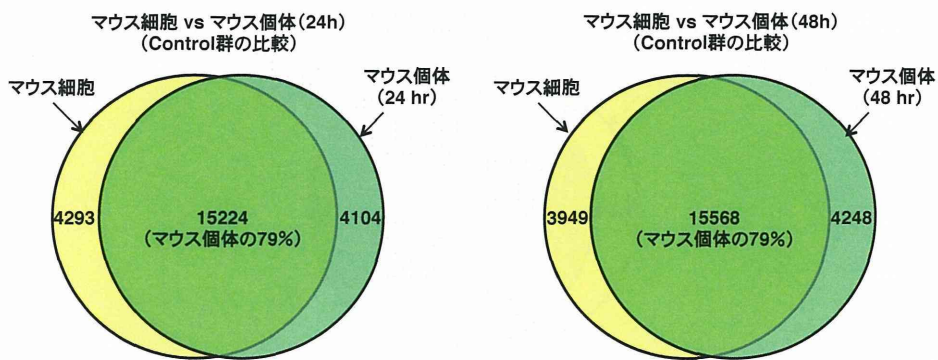


【図表78】 マイクロアレイの解析結果(マウス個体-24h)
 - mPCSK9-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



【図表79】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
-Present判定陽性の遺伝子数の比較-

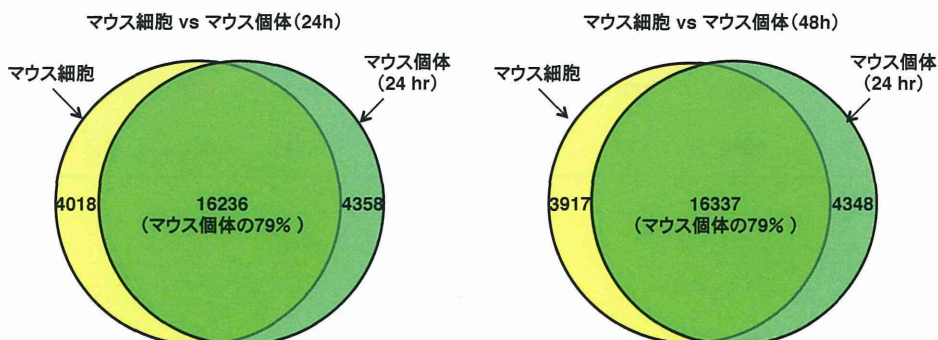
| 検体 | 細胞での総数 | 細胞のみ | 細胞と個体で共通 | 個体のみ | 個体での総数 | 検体 |
|-------|--------|------|----------|------|--------|-------------|
| マウス細胞 | 19517 | 4293 | 15224 | 4104 | 19328 | マウス個体(24hr) |
| マウス細胞 | 19517 | 3949 | 15568 | 4248 | 19816 | マウス個体(48hr) |



【図表80】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
mAPoB-13 -Present判定陽性の遺伝子数の比較-

| 検体 | 細胞での総数 | 細胞のみ | 細胞と個体で共通 | 個体のみ | 個体での総数 | 検体 |
|-------|--------|------|----------|------|--------|-------------|
| マウス細胞 | 20254 | 4018 | 16236 | 4358 | 20594 | マウス個体(24hr) |
| マウス細胞 | 20254 | 3917 | 16337 | 4348 | 20685 | マウス個体(48hr) |

*ControlもしくはサンプルがPresent

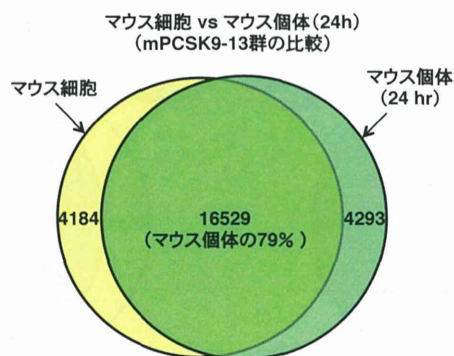


【図表81】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
-Present判定陽性の遺伝子数の比較-

mPCSK9-13

| 検体 | 細胞での総数 | 細胞のみ | 細胞と個体で 共通 | 個体のみ | 個体での 総数 | 検体 |
|-------|--------|------|--------------|------|------------|-----------------|
| マウス細胞 | 20713 | 4184 | 16529 | 4293 | 20822 | マウス個体 (24hr) |

※ControlもしくはサンプルがPresent

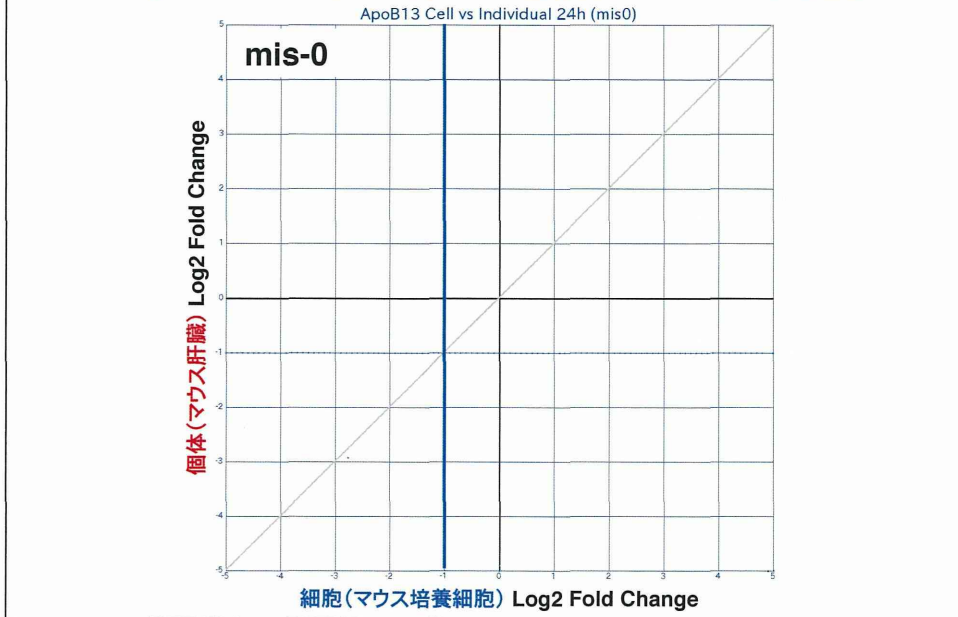


【図表82】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
- mApoB-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -

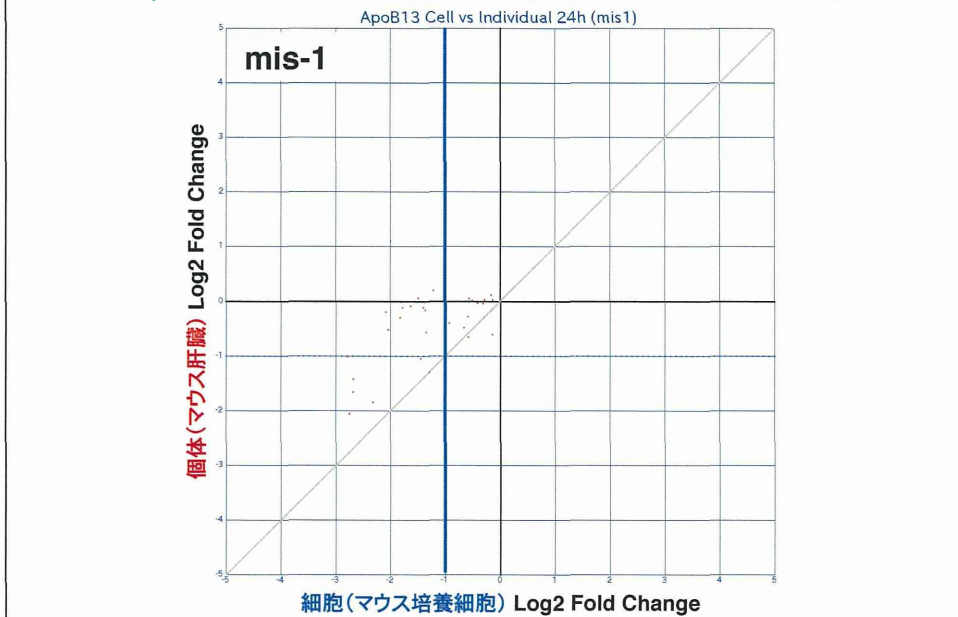
24hr

| mis | 共通 遺伝子数 | 50%以下に 抑制された遺伝子数 | | | 共通遺伝子数 に対する割合(%) | | |
|-----|------------|---------------------|----|------|---------------------|-------|-------|
| | | 細胞 | 個体 | 共通抑制 | 細胞 | 個体 | 共通抑制 |
| 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| 1 | 31 | 19 | 7 | 7 | 61.3 | 22.6 | 22.6 |
| 2 | 531 | 77 | 21 | 21 | 14.5 | 4.0 | 4.0 |
| 3 | 4090 | 179 | 18 | 18 | 4.4 | 0.4 | 0.4 |

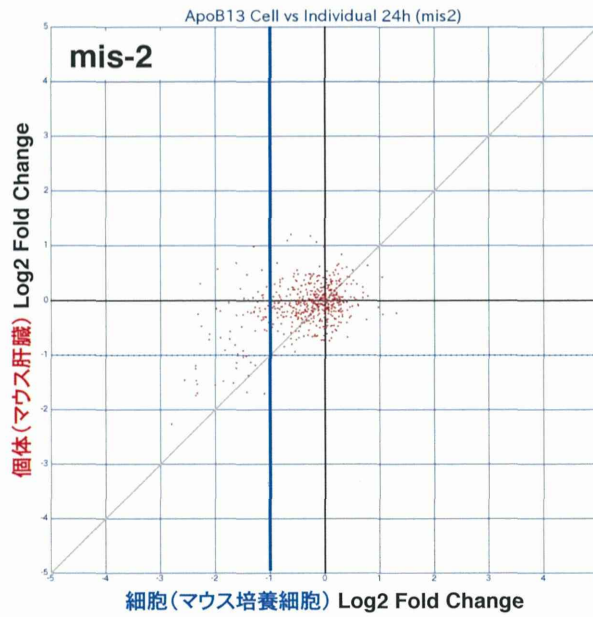
【図表83】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mApoB-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



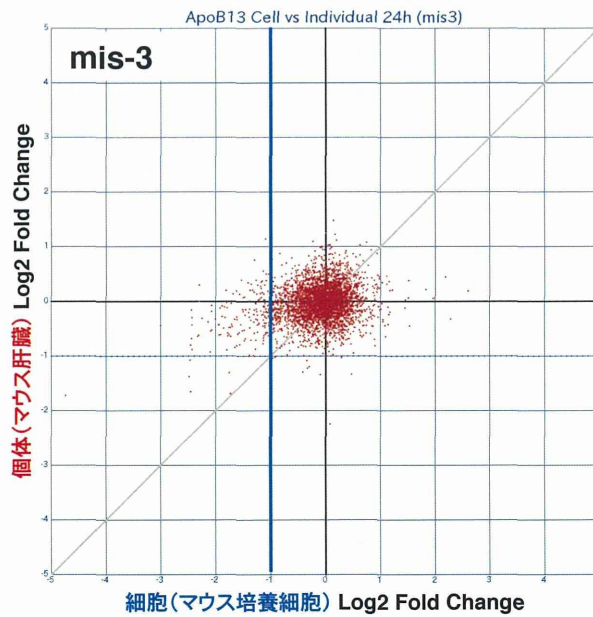
【図表84】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mApoB-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



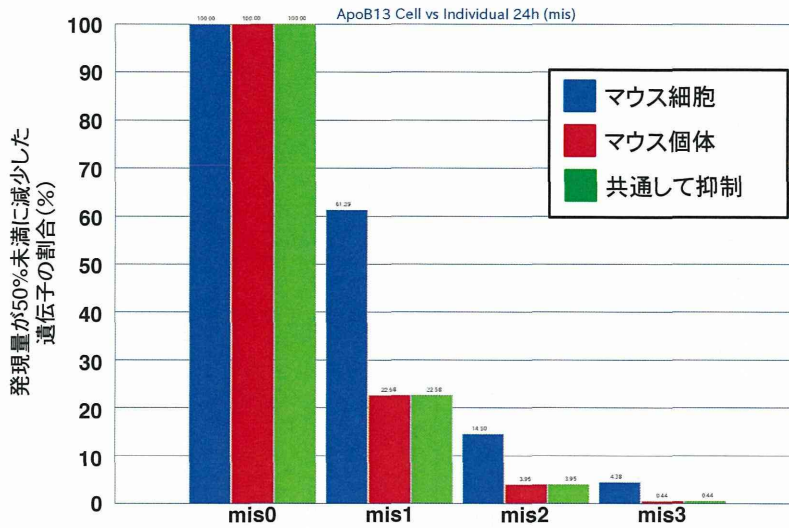
【図表85】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mApoB-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



【図表86】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mApoB-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



【図表87】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mApoB-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -

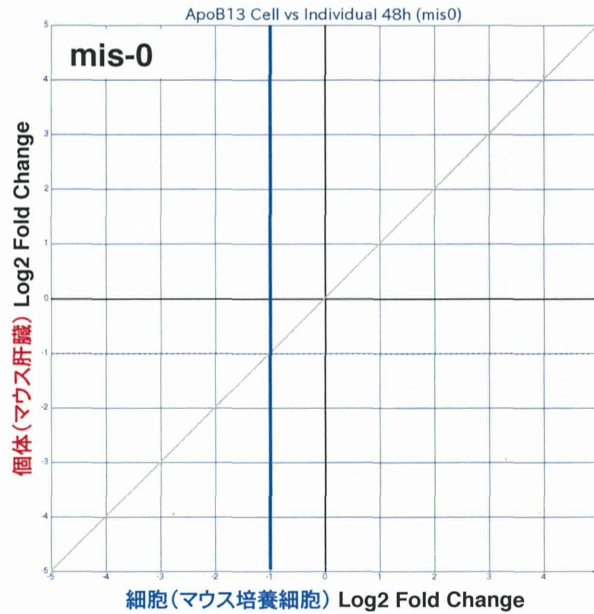


【図表88】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mApoB-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -

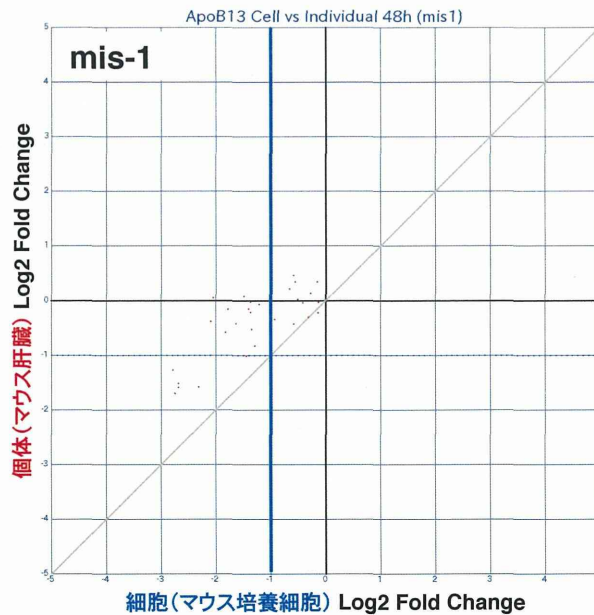
48hr

| mis | 共通遺伝子数 | 50%以下に抑制された遺伝子数 | | | 共通遺伝子数に対する割合(%) | | |
|-----|--------|-----------------|----|------|-----------------|-------|-------|
| | | 細胞 | 個体 | 共通抑制 | 細胞 | 個体 | 共通抑制 |
| 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| 1 | 31 | 19 | 7 | 7 | 61.3 | 22.6 | 22.6 |
| 2 | 539 | 75 | 20 | 19 | 13.9 | 3.7 | 3.5 |
| 3 | 4139 | 182 | 22 | 22 | 4.4 | 0.5 | 0.5 |

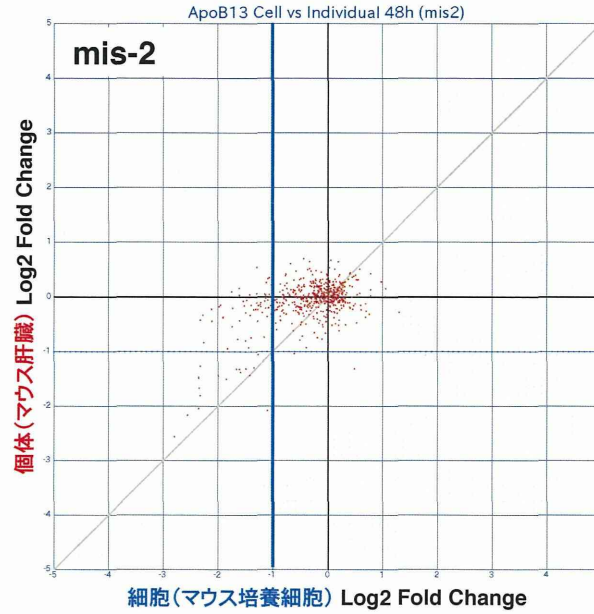
【図表89】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mApoB-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



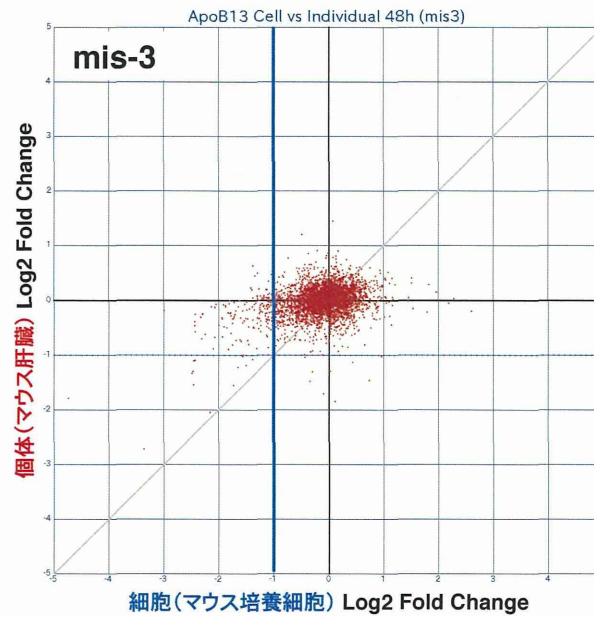
【図表90】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mApoB-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



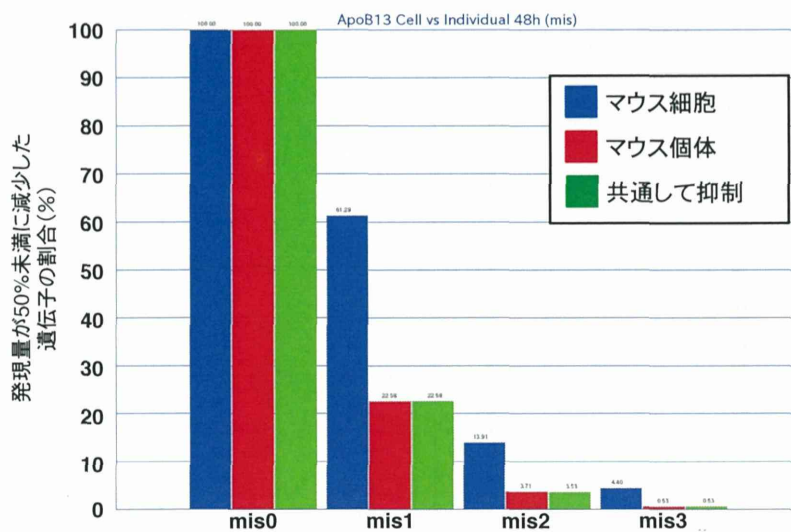
【図表91】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
- mApoB-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



【図表92】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
- mApoB-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



【図表93】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mApoB-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -

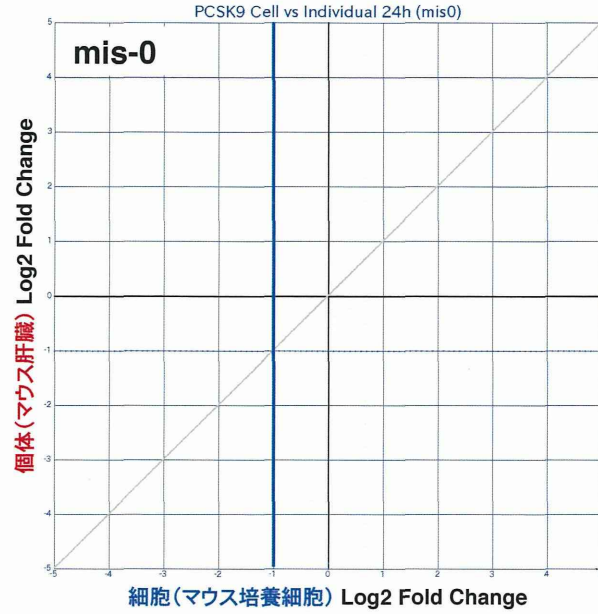


【図表94】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mPCSK9-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -

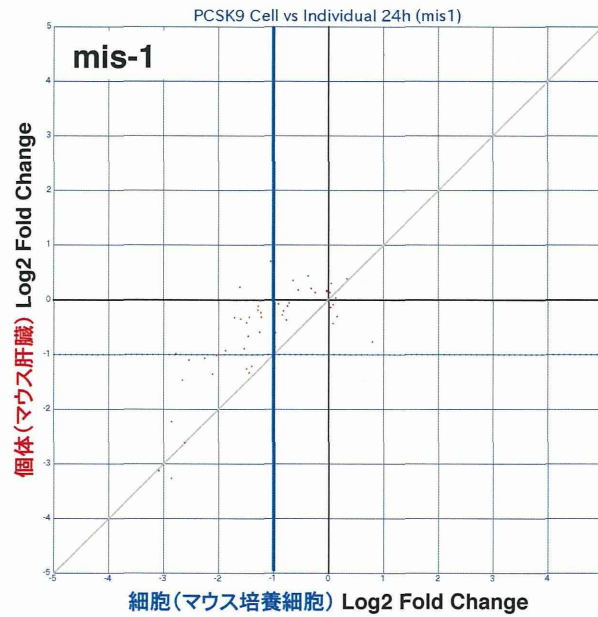
24hr

| mis | 共通遺伝子数 | 50%以下に抑制された遺伝子数 | | | 共通遺伝子数に対する割合(%) | | |
|-----|--------|-----------------|----|------|-----------------|-------|-------|
| | | 細胞 | 個体 | 共通抑制 | 細胞 | 個体 | 共通抑制 |
| 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| 1 | 52 | 28 | 12 | 12 | 53.9 | 23.1 | 23.1 |
| 2 | 525 | 102 | 19 | 19 | 17.4 | 3.3 | 3.3 |
| 3 | 4468 | 373 | 65 | 65 | 8.4 | 1.5 | 1.5 |

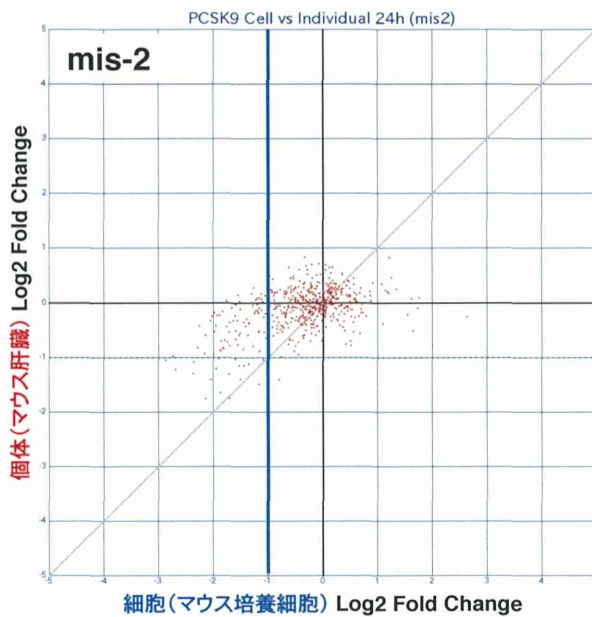
【図表95】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mPCSK9-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



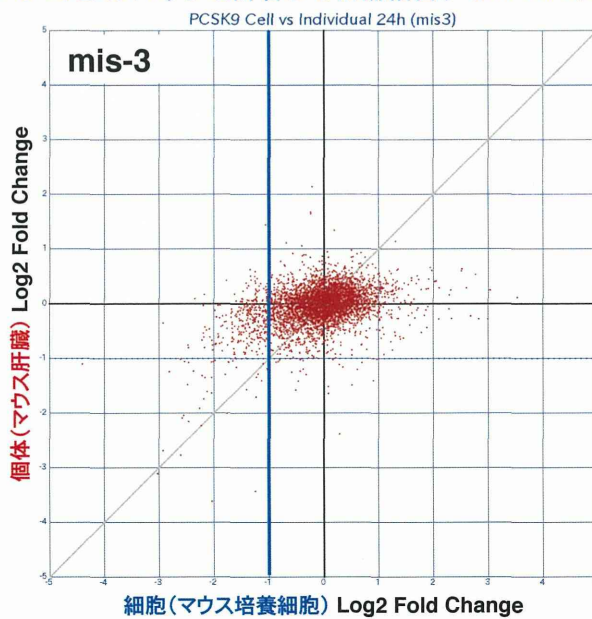
【図表96】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mPCSK9-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



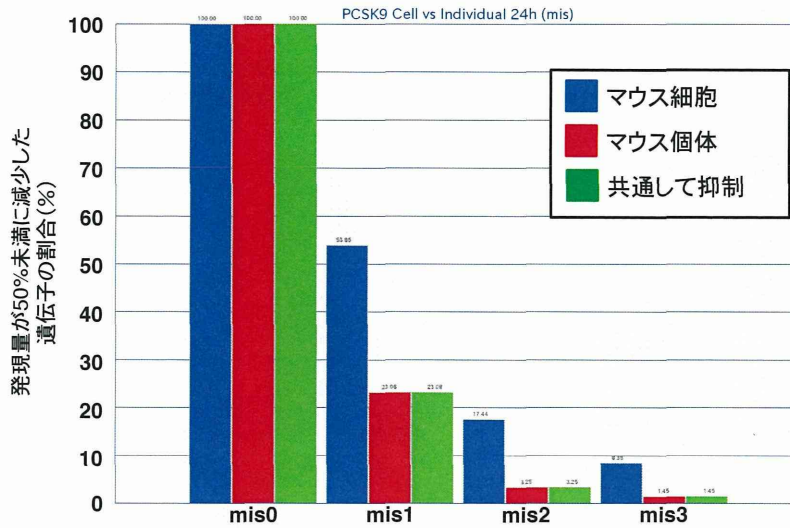
【図表97】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mPCSK9-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



【図表98】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mPCSK9-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



【図表99】 細胞(マウス培養細胞)と個体(マウス肝臓)の相関性
 - mPCSK9-13とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



【図表100】 ヒト肝細胞キメラマウスを用いた
 マイクロアレイ解析の条件設定- ASO13-1 を用いた解析-

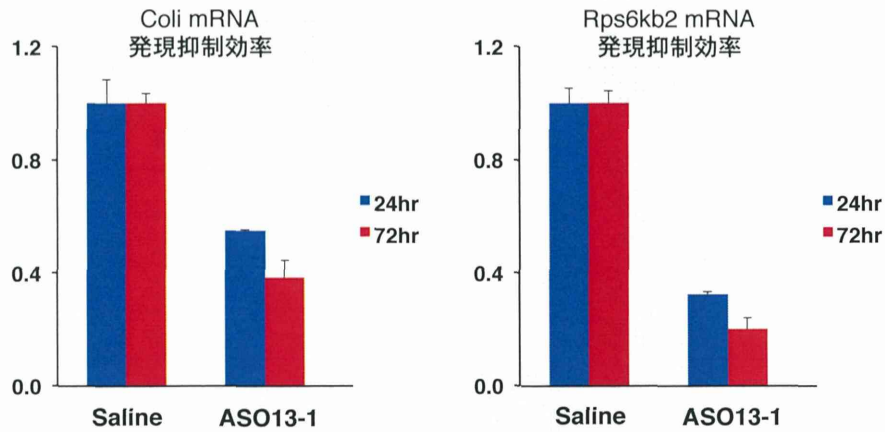
正常マウス(C57/BL6マウス)を用いて条件設定



RNA抽出後、リアルタイムPCRでオンターゲット効果を確認
 *マウスゲノムで完全相補するmRNA(Coli, Rps6kb2)の分解効率を解析

【図表101】 ヒト肝細胞キメラマウスを用いた
マイクロアレイ解析の条件設定- ASO13-1 を用いた解析-

正常マウス(C57/BL6マウス)を用いて条件設定

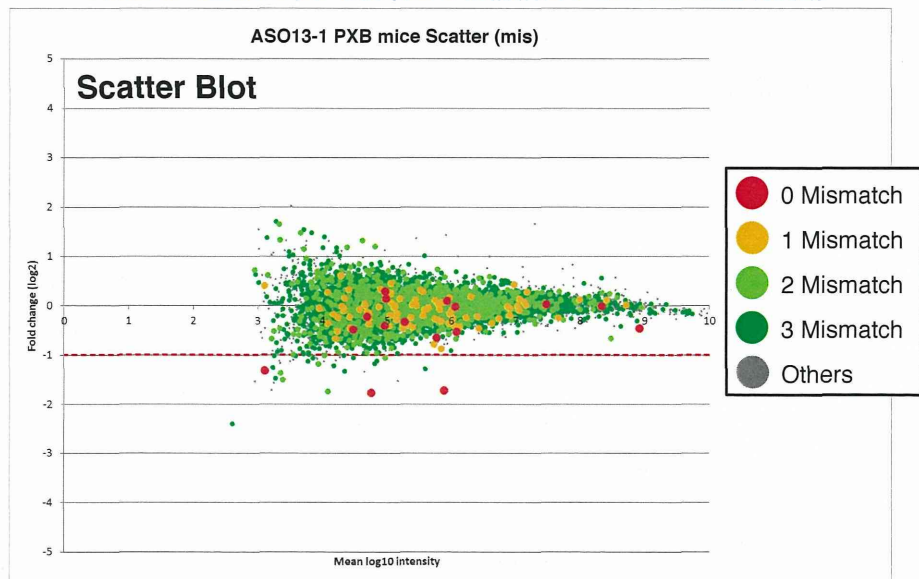


【図表102】
マイクロアレイの解析結果(ヒト肝細胞キメラマウス)
- ASO13-1とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -

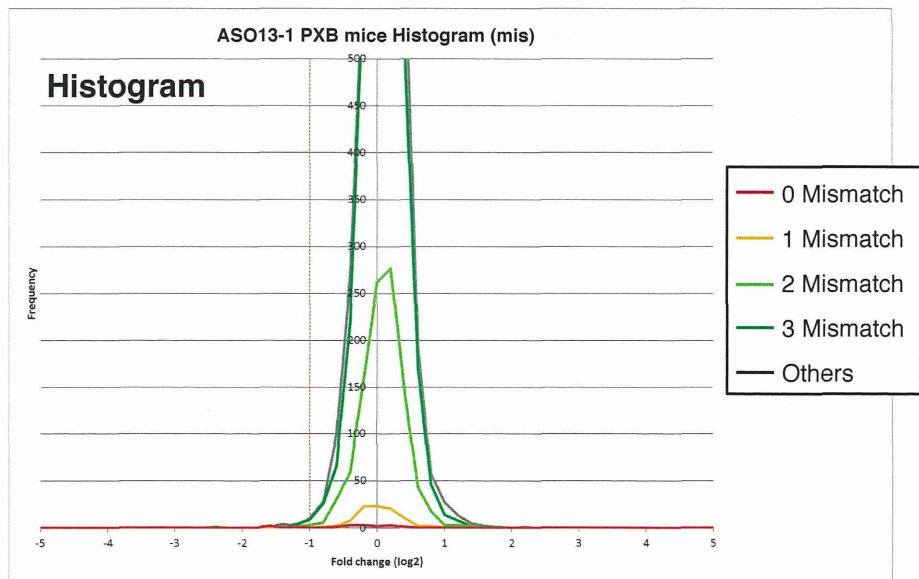
| ASO13-1 | Mismatch | | | | Other | Total |
|-----------------------|----------|-----|------|------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | | |
| 1. In Silico Analysis | 24 | 186 | 1997 | 7415 | 13412 | 26266 |
| 2. On Array | 22 | 175 | 1801 | 6422 | 9189 | 20478 |
| 3. Present | 16 | 92 | 1019 | 3765 | 4592 | 11175 |
| 4. Varied | 5 | 9 | 88 | 294 | 317 | 858 |
| 5. Down Regulated | 2 | 0 | 3 | 4 | 8 | 23 |
| 6. Percentage | 12.5 | 0.0 | 0.3 | 0.1 | 0.2 | 0.2 |

数値の解釈は図表22と同様である

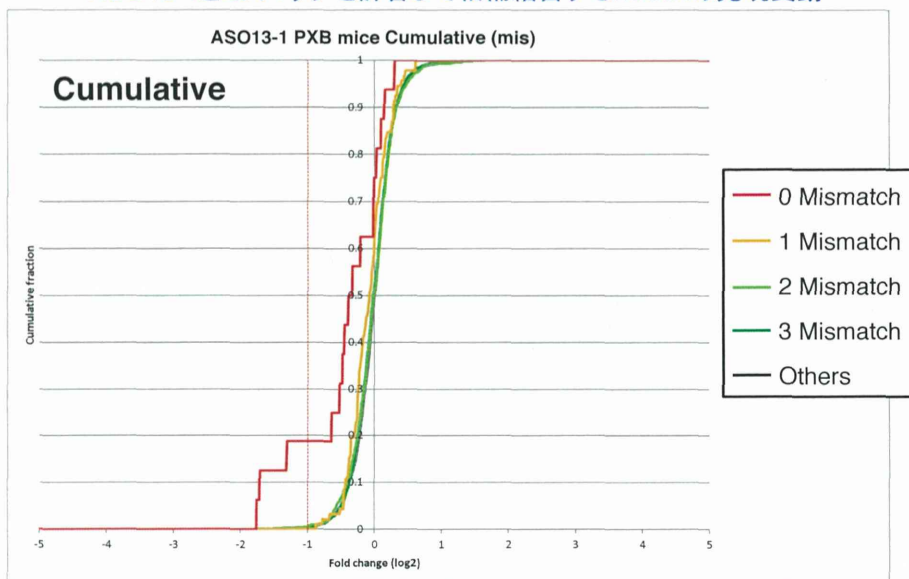
【図表103】マイクロアレイの解析結果(ヒト肝細胞キメラマウス)
 - ASO13-1とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



【図表104】マイクロアレイの解析結果(ヒト肝細胞キメラマウス)
 - ASO13-1とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



【図表105】マイクロアレイの解析結果(ヒト肝細胞キメラマウス)
 - ASO13-1とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -

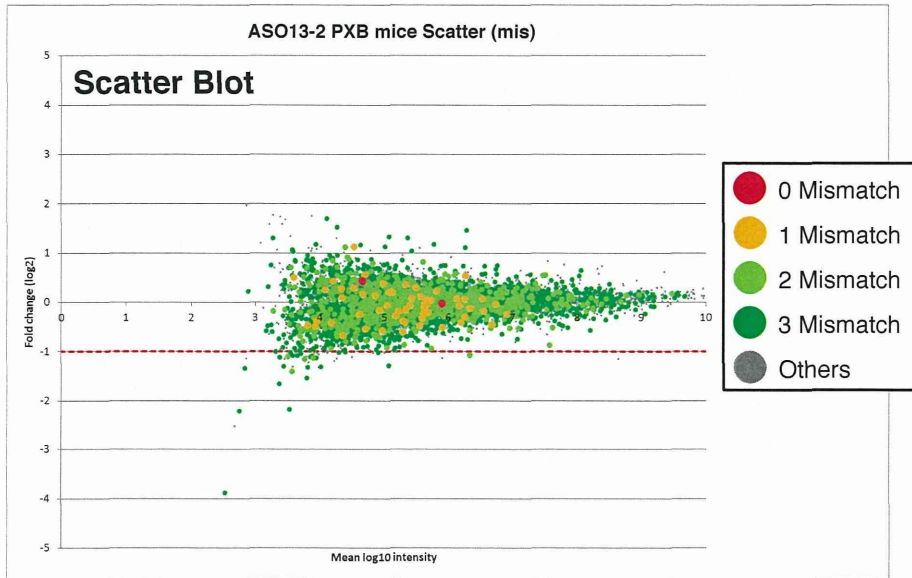


【図表106】
 マイクロアレイの解析結果(ヒト肝細胞キメラマウス)
 - ASO13-2とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -

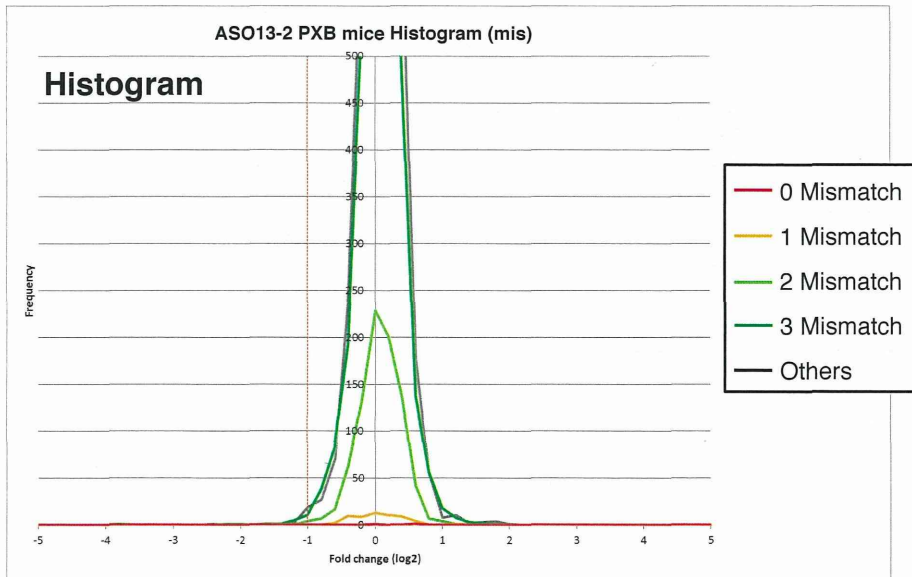
| ASO13-2 | Mismatch | | | | Other | Total |
|-----------------------|----------|-----|------|------|-------|-------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | | |
| 1. In Silico Analysis | 6 | 121 | 1607 | 7005 | 13121 | 26266 |
| 2. On Array | 6 | 112 | 1457 | 6058 | 8960 | 20478 |
| 3. Present | 2 | 59 | 842 | 3358 | 4611 | 11057 |
| 4. Varied | 1 | 9 | 73 | 309 | 354 | 939 |
| 5. Down Regulated | 0 | 0 | 1 | 6 | 5 | 18 |
| 6. Percentage | 0 | 0 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 |

数値の解釈は図表22と同様である

【図表107】マイクロアレイの解析結果(ヒト肝細胞キメラマウス)
 - ASO13-2とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -

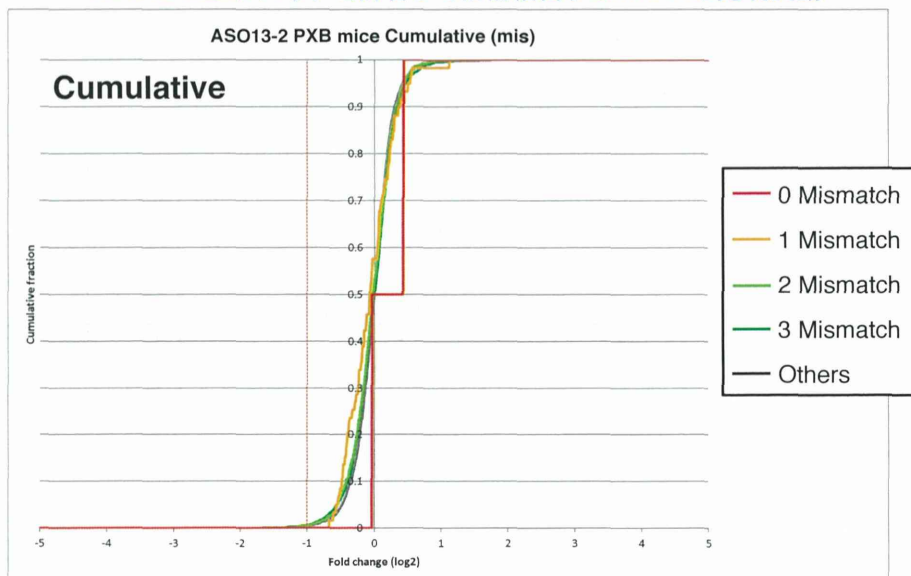


【図表108】マイクロアレイの解析結果(ヒト肝細胞キメラマウス)
 - ASO13-2とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



【図表109】マイクロアレイの解析結果(ヒト肝細胞キメラマウス)

- ASO13-2とミスマッチを許容して相補結合するmRNAの発現変動 -



【図表110】 オフターゲット候補遺伝子の発現割合

| 対象検体 | アンチセンス | “Present”と判定された遺伝子 | | |
|-----------------|------------------|--------------------|-------------------|-------|
| | | 総遺伝子数 | オフターゲット候補 遺伝子数 | 割合(%) |
| ヒト培養細胞 | ASO13-1 | 12404 | 5570 | 44.9 |
| | ASO13-2 | 12366 | 4855 | 39.3 |
| | ASO13-3 | 12234 | 1379 | 11.3 |
| | ASO15-1 | 12322 | 5846 | 47.4 |
| | ASO15-2 | 12415 | 6091 | 49.1 |
| | ASO15-3 | 12118 | 1343 | 11.1 |
| | ASO18-1 | 12246 | 3367 | 27.5 |
| マウス培養細胞 | ASO18-2 | 12144 | 766 | 6.3 |
| | mApoB-13 | 10961 | 2977 | 27.2 |
| マウス個体 | mPCSK9-13 | 11206 | 3472 | 31.0 |
| | mApoB-13(24 hr) | 11127 | 2989 | 26.9 |
| | mApoB-13(48 hr) | 11214 | 3029 | 27.0 |
| ヒト肝細胞 キメラマウス | mPCSK9-13(24 hr) | 11284 | 3400 | 30.1 |
| | ASO13-1 | 11175 | 4892 | 43.8 |
| | ASO13-2 | 11057 | 4261 | 38.5 |

【図表111】

これまでに上市された核酸医薬品

| 商品名 | 一般名 | 分類 | 承認国 承認年 | 標的 | 適応 | 投与ルート |
|-----------|------------|--------|-----------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------|------------|
| Vitravene | Fomivirsen | アンチセンス | 米 1998 EU 1999 | サイトメガロウイルス (CMV) 遺伝子IE2 mRNA | CMV性網膜炎 (AIDS患者) | 硝子体内 局注 |
| Macugen | Pegaptanib | アプタマー | 米 2004 EU 2006 日 2008 | Vascular endothelial growth factor (VEGF)165 蛋白質 | 滲出型 加齢黄斑変性症 | 硝子体内 局注 |
| Kynamro | Mipomersen | アンチセンス | 米 2013 | ApoB100 mRNA | ホモ接合型家族性 高コレステロール血症 | 皮下注 |

【図表112】

アンチセンスと遺伝子間の
「相補の不完全性」の分類

「相補の不完全性」の分類

概念図



【図表113】 オフターゲット候補遺伝子数の理論値

| 塩基長 | ミスマッチ数 | | | | | |
|-----|----------------------|------------|-----|------|---------|---------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 13 | 8.5×10^{-1} | 33 | 596 | 6559 | $>10^4$ | $>10^4$ |
| 15 | $<10^{-1}$ | 2.4 | 50 | 652 | 5869 | $>10^4$ |
| 18 | $<10^{-1}$ | $<10^{-1}$ | 1.1 | 18 | 206 | 1727 |