

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7660515号  
(P7660515)

(45)発行日 令和7年4月11日(2025.4.11)

(24)登録日 令和7年4月3日(2025.4.3)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/7105(2006.01)

A 6 1 K

31/7105

Z N A

A 6 1 K 31/712(2006.01)

A 6 1 K

31/712

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

A 6 1 P 25/08 (2006.01)

A 6 1 P

25/08

請求項の数 23 (全82頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-550217(P2021-550217)

(86)(22)出願日 令和2年2月27日(2020.2.27)

(65)公表番号 特表2022-522205(P2022-522205  
A)

(43)公表日 令和4年4月14日(2022.4.14)

(86)国際出願番号 PCT/US2020/020175

(87)国際公開番号 WO2020/176776

(87)国際公開日 令和2年9月3日(2020.9.3)

審査請求日 令和5年2月27日(2023.2.27)

(31)優先権主張番号 62/811,511

(32)優先日 平成31年2月27日(2019.2.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 518195690

ストーク セラピューティクス, インク.  
アメリカ合衆国 0 1 7 3 0 マサチュー  
セッツ州 ベドフォード ウィギンズ・ア  
ヴェニュー 4 5

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100196508

弁理士 松尾 淳一

(74)代理人 100122644

弁理士 寺地 拓己

(72)発明者 アズナレズ, イザベル

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2  
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 病態及び疾患の治療用アンチセンスオリゴマー

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ナンセンス変異依存性mRNA分解誘導エクソン(NMDエクソン)を含有しかつNav1.1タンパク質をコードするプレmRNAを有する細胞において、Nav1.1タンパク質の発現を増加させる方法に使用するための医薬組成物であって、治療薬剤を含み、該方法は：

治療薬剤を前記細胞と接触させ、治療薬剤はNav1.1タンパク質をコードするプレmRNAからのNMDエクソンの排除を促進し、それによりNav1.1タンパク質をコードするプロセシングされたmRNAのレベル及びNav1.1タンパク質の発現を前記細胞内で増加させる、

ことを含み、治療薬剤はNav1.1をコードするプレmRNAの標的領域に結合し、そして、標的領域は：

NMDエクソンの5'端から約1000ヌクレオチド上流～NMDエクソンの5'端から約100ヌクレオチド上流；又は

NMDエクソンの3'端の約100ヌクレオチド下流～NMDエクソンの3'端の約1000ヌクレオチド下流、

にあり、

治療薬剤はアンチセンスオリゴマー(ASO)を含み、そして

NMDエクソンは、配列番号7に対して少なくとも95%の配列同一性がある配列を含む、

前記医薬組成物。

【請求項 2】

疾患又は病態の治療を必要とする被験者において、被験者の細胞における Nav 1.1 タンパク質の発現を増加させることによってそれを治療するための治療薬剤を含む医薬組成物であって、

治療薬剤は、前記細胞内で、NMDエクソンを含有しかつ Nav 1.1 タンパク質をコードする premRNA からの、ナンセンス変異依存性 mRNA 分解誘導エクソン (NMD エクソン) の排除を促進し、それにより Nav 1.1 タンパク質をコードするプロセシングされた mRNA のレベル及び Nav 1.1 タンパク質の発現を被験者の細胞内で増加させ；

10

治療薬剤は、Nav 1.1 タンパク質をコードする premRNA の標的化部分に結合し、  
標的化部分は：

NMD エクソンの 5' 端から 1000 ヌクレオチド上流 ~ NMD エクソンの 5' 端から 1000 ヌクレオチド上流；又は

NMD エクソンの 3' 端の 00 ヌクレオチド下流 ~ NMD エクソンの 3' 端の 1000 ヌクレオチド下流、

にあり、

治療薬剤はアンチセンスオリゴマー (ASO) を含み、そして

NMD エクソンは、配列番号 7 に対して少なくとも 95% の配列同一性がある配列を含む、

20

前記医薬組成物。

【請求項 3】

疾患又は病態が、Nav 1.1 タンパク質における機能欠失変異によって誘導される、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

疾患又は病態が SCN1A 遺伝子のハプロ不全に関連し、被験者が、機能的 Nav 1.1 タンパク質をコードする第 1 対立遺伝子と、Nav 1.1 タンパク質を産生しないか若しくは低下したレベルで産生する第 2 対立遺伝子、又は非機能的 Nav 1.1 タンパク質若しくは部分機能的 Nav 1.1 タンパク質をコードする第 2 対立遺伝子とを有する、請求項 2 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 5】

疾患又は病態が、ドラベ症候群 (DS)；乳児重症ミオクロニーてんかん (SMEI) - 辺縁型 (SMEB)；熱性痙攣 (FS)；家族性熱性痙攣 3A；全般性てんかん熱性痙攣プラス (GEFS+)；全般性てんかん熱性痙攣プラス 2 型；脳症；てんかん性脳症、早期乳児、13；潜在性全般性てんかん；潜在性焦点性てんかん；ミオクロニー失立発作てんかん；レノックス・ガスト症候群；ウェスト症候群；特発性痙攣；早期ミオクロニー脳症；進行性ミオクロニーてんかん；小児交互性片麻痺；分類不能てんかん性脳症；てんかんにおける予期せぬ突然死 (SUDEP)；洞不全症候群 1；自閉症；又は乳児悪性遊走性部分発作である、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

40

疾患又は病態が、ドラベ症候群 (DS) である、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

被験者への投与が、髄腔内注射又は脳室内注入である、請求項 2 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

対象がヒト被験者である、請求項 2 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

治療薬剤が、標的領域の領域からの NMD エクソンのスプライシングに関与する因子の結合に干渉する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

50

標的領域が：

- (a) NMDエクソンの5'端の最大でも500ヌクレオチド上流；
- (b) NMDエクソンの5'端の少なくとも500ヌクレオチド上流；
- (c) NMDエクソンの3'端の最大でも500ヌクレオチド下流；又は
- (d) NMDエクソンの3'端の少なくとも500ヌクレオチド下流、

にある、請求項1～9のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項11】

標的領域が、配列番号6に対して少なくとも95%の配列同一性がある配列の内部に含まれる、請求項1～10のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項12】

治療薬剤と接触した細胞におけるNav1.1タンパク質の量が、対照細胞におけるNav1.1タンパク質の全量と比較して、少なくとも1.1倍増加する、請求項1～11のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項13】

ASOが、配列番号72、73、76、181、220、432、433、436、541、及び580から成る群より選択される配列から成る、請求項1～12のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項14】

ASOが、2'-O-メトキシエチル部分を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項15】

アンチセンスオリゴマーの各ヌクレオチドが、2'-O-メトキシエチル部分を含む、請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項16】

アンチセンスオリゴマーの長さが18～50ヌクレオ塩基である、請求項1～15のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項17】

治療薬剤を含む医薬組成物であって、

治療薬剤は、ナンセンス変異依存性mRNA分解誘導エクソン(NMDエクソン)を含有しかつNav1.1タンパク質をコードするプレmRNAの標的化部分に結合し、

治療薬剤は、Nav1.1をコードするプレmRNAからのNMDエクソンの排除を促進し、

標的化部分は：

NMDエクソンの5'端から約1000ヌクレオチド上流～NMDエクソンの5'端から約100ヌクレオチド上流；又は

NMDエクソンの3'端の約100ヌクレオチド下流～NMDエクソンの3'端の約1000ヌクレオチド下流、

であり、

治療薬剤はアンチセンスオリゴマー(ASO)を含み、そして

NMDエクソンは、配列番号7に対して少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、

前記医薬組成物。

【請求項18】

標的領域が：

- (a) NMDエクソンの5'端の最大でも500ヌクレオチド上流；
- (b) NMDエクソンの5'端の少なくとも500ヌクレオチド上流；
- (c) NMDエクソンの3'端の最大でも500ヌクレオチド下流；又は
- (d) NMDエクソンの3'端の少なくとも500ヌクレオチド下流、

にある、請求項17に記載の医薬組成物。

【請求項19】

10

20

30

40

50

標的領域が、配列番号 6 に対して少なくとも 95% の配列同一性がある配列の内部に含まれる、請求項 17 又は 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

ASO が、配列番号 72、73、76、181、220、432、433、436、541、及び 580 から成る群より選択される配列から成る、請求項 17 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

ASO が 2' - O - メトキシエチル部分を含む、請求項 7 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

アンチセンスオリゴマーの各ヌクレオチドが、2' - O - メトキシエチル部分を含む、請求項 21 に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

アンチセンスオリゴマーの長さが 18 ~ 50 ヌクレオ塩基である、請求項 17 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

[0001] 本出願は、その全体が本明細書に援用される、米国仮特許出願第 62 / 811, 511 号 (2019 年 2 月 27 日出願) の利益を請求する。

【背景技術】

【0002】

[0002] 神経系障害は、神経細胞の興奮性、神経細胞の相互作用、及び脳機能全般に媒介するイオンチャネルの機能障害を特徴とする、イオンチャネル異常症 (channelopathy) にしばしば関連する。ニューロン電位依存性ナトリウムチャネルの細孔形成サブユニットをコードする SCN1A - SCN2A - SCN3A 遺伝子クラスターの一部である SCN1A 遺伝子における突然変異は、ドラベ症候群 (DS) のような、疾患及び病態の疾病分類番号にある疾患の発症に関連している (Miller, et al., 1993-2015, GeneReviews, Eds. Pagon RA, et al. シアトル (ワシントン州) : ワシントン大学、シアトル, Bookshelf ID: NBK1318, 及び Mulley, et al., 2005, Hum. Mutat. 25: 535-542)。

【発明の概要】

【0003】

[0003] 本発明のある態様において開示されるのは、ナンセンス変異依存性 RNA 分解誘導エクソンを含有する mRNA (NMD エクソン mRNA) であって SCN1A タンパク質をコードする mRNA を有する細胞において、SCN1A タンパク質の発現を調節する方法であって、該方法は、該細胞へ治療薬剤を接触させ、それにより治療薬剤は、SCN1A タンパク質をコードする NMD エクソン mRNA からの NMD エクソンのスプライシングを調節し、それにより SCN1A タンパク質をコードするプロセシングされた mRNA のレベルを調節し、そして、該細胞における SCN1A タンパク質の発現を調節することを含んでなり、ここで該治療薬剤は、SCN1A をコードする NMD エクソン mRNA の標的化部分へ結合し、そして該標的化部分は、NMD 誘導エクソン (NIE) の 5' 端から約 1000 ヌクレオチド上流 ~ NIE の 5' 端から約 100 ヌクレオチド上流; 又は NIE の 3' 端の約 100 ヌクレオチド下流 ~ NIE の 3' 端の約 1000 ヌクレオチド下流にある。いくつかの態様では、治療薬剤は、標的化部分の領域からの NMD エクソンのスプライシングに関与する因子の結合に干渉する。いくつかの態様では、標的化部分は、NIE の 5' 端の最大でも約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド上流にある。いくつかの態様では、標的化部分は

10

20

30

40

50

、N I Eの5'端の少なくとも約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約5ヌクレオチド、約4ヌクレオチド、約2ヌクレオチド、約1ヌクレオチド上流にある。いくつかの態様では、標的化部分は、N I Eの3'端の最大でも約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド下流にある。いくつかの態様では、標的化部分は、N I Eの3'端の少なくとも約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約5ヌクレオチド、約4ヌクレオチド、約2ヌクレオチド、約1ヌクレオチド下流にある。いくつかの態様では、治療薬剤は、アンチセンスオリゴマー（A S O）である。いくつかの態様では、A S Oは、配列番号12～731のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%同一である配列を含む。いくつかの態様では、治療薬剤は、S C N 1 Aタンパク質をコードするプロセシングされたm R N AからのN M Dエクソンの排除を促進させる。いくつかの態様では、治療薬剤と接触した細胞における、S C N 1 Aタンパク質をコードするプロセシングされたm R N AからのN M Dエクソンの排除が、対照細胞における、S C N 1 Aタンパク質をコードするプロセシングされたm R N AからのN M Dエクソンの排除と比較して、約1.1～約10倍、約1.5～約10倍、約2～約10倍、約3～約10倍、約4～約10倍、約1.1～約5倍、約1.1～約6倍、約1.1～約7倍、約1.1～約8倍、約1.1～約9倍、約2～約5倍、約2～約6倍、約2～約7倍、約2～約8倍、約2～約9倍、約3～約6倍、約3～約7倍、約3～約8倍、約3～約9倍、約4～約7倍、約4～約8倍、約4～約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、又は少なくとも約10倍増加する。いくつかの態様では、治療薬剤は、S C N 1 Aタンパク質をコードするプロセシングされたm R N Aの該細胞中のレベルを増加させる。いくつかの態様では、治療薬剤と接触した細胞における、S C N 1 Aタンパク質をコードするプロセシングされたm R N Aの量が、対照細胞における、S C N 1 Aタンパク質をコードするプロセシングされたm R N Aの全量と比較して、約1.1～約10倍、約1.5～約10倍、約2～約10倍、約3～約10倍、約4～約10倍、約1.1～約5倍、約1.1～約6倍、約1.1～約7倍、約1.1～約8倍、約1.1～約9倍、約2～約5倍、約2～約6倍、約2～約7倍、約2～約8倍、約2～約9倍、約3～約6倍、約3～約7倍、約3～約8倍、約3～約9倍、約4～約7倍、約4～約8倍、約4～約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、又は少なくとも約10倍増加する。

#### 【0004】

[0004] 本発明のある態様において開示されるのは、疾患又は病態を治療することが必要な被験者の細胞においてS C N 1 Aタンパク質の発現を調節することによって、該被験者においてそれを治療する方法であって、該方法は、該細胞中のN M Dエクソンを含有してS C N 1 Aをコードするm R N Aからのナンセンス変異依存性m R N A分解誘導エクソン（N M Dエクソン）のスプライシングを調節する治療薬剤と該被験者の該細胞とを接触させ、それによりS C N 1 Aタンパク質をコードするプロセシングされたm R N Aのレベルを調節し、そして、該被験者の該細胞におけるS C N 1 Aタンパク質の発現を調節することを含んでなり；ここで該治療薬剤は、S C N 1 AをコードするN M Dエクソンm R

NAの標的化部分へ結合し、そして該標的化部分は、NMD誘導エクソン(NIE)の5'端から約1000ヌクレオチド上流~NIEの5'端から約100ヌクレオチド上流;又はNIEの3'端の約100ヌクレオチド下流~NIEの3'端の約1000ヌクレオチド下流にある。いくつかの態様では、治療薬剤は、標的化部分の領域からのNMDエクソンのスプライシングに関与する因子の結合に干渉する。いくつかの態様では、標的化部分は、NIEの5'端の最大でも約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド上流にある。いくつかの態様では、標的化部分は、NIEの5'端の少なくとも約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約5ヌクレオチド、約4ヌクレオチド、約2ヌクレオチド、約1ヌクレオチド上流にある。いくつかの態様では、標的化部分は、NIEの3'端の最大でも約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド下流にある。いくつかの態様では、標的化部分は、NIEの3'端の少なくとも約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約5ヌクレオチド、約4ヌクレオチド、約2ヌクレオチド、約1ヌクレオチド下流にある。いくつかの態様では、治療薬剤は、アンチセンスオリゴマー(ASO)である。いくつかの態様では、ASOは、配列番号12~731のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%同一である配列を含む。いくつかの態様では、治療薬剤は、SCN1Aタンパク質をコードするプロセシングされたmRNAからのNMDエクソンの排除を促進させる。いくつかの態様では、治療薬剤と接触した細胞における、SCN1Aタンパク質をコードするプロセシングされたmRNAからのNMDエクソンの排除が、対照細胞における、SCN1Aタンパク質をコードするプロセシングされたmRNAからのNMDエクソンの排除と比較して、約1.1~約10倍、約1.5~約10倍、約2~約10倍、約3~約10倍、約4~約10倍、約1.1~約5倍、約1.1~約6倍、約1.1~約7倍、約1.1~約8倍、約1.1~約9倍、約2~約5倍、約2~約6倍、約2~約7倍、約2~約8倍、約2~約9倍、約3~約6倍、約3~約7倍、約3~約8倍、約3~約9倍、約4~約7倍、約4~約8倍、約4~約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、又は少なくとも約10倍増加する。いくつかの態様では、治療薬剤は、SCN1Aタンパク質をコードするプロセシングされたmRNAの該細胞中のレベルを増加させる。いくつかの態様では、治療薬剤と接触した細胞における、SCN1Aタンパク質をコードするプロセシングされたmRNAの量が、対照細胞における、SCN1Aタンパク質をコードするプロセシングされたmRNAの全量と比較して、約1.1~約10倍、約1.5~約10倍、約2~約10倍、約3~約10倍、約4~約10倍、約1.1~約5倍、約1.1~約6倍、約1.1~約7倍、約1.1~約8倍、約1.1~約9倍、約2~約5倍、約2~約6倍、約2~約7倍、約2~約8倍、約2~約9倍、約3~約6倍、約3~約7倍、約3~約8倍、約3~約9倍、約4~約7倍、約4~約8倍、約4~約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、又は少なくとも約10倍増加する。いくつかの態様

10

20

30

40

50

では、疾患又は病態は、N a v 1 . 1における機能欠失変異によって誘導される。いくつかの態様では、疾患又は病態はS C N 1 A遺伝子のハプロ不全に関連し、ここで該被験者は、機能的S C N 1 Aをコードする第1対立遺伝子と、S C N 1 Aが産生されないか又は低下したレベルで産生される第2対立遺伝子、又は非機能的S C N 1 A又は部分機能的S C N 1 Aをコードする第2対立遺伝子とを有する。いくつかの態様では、疾患又は病態は脳症である。いくつかの態様では、脳症はてんかん性脳症である。いくつかの態様では、疾患又は病態は、ドラベ症候群（D S）；乳児重症ミオクロニーてんかん（S M E I）- 辺縁型（S M E B）；熱性痙攣（F S）；全般性てんかん熱性痙攣プラス（G E F S +）；てんかん性脳症、早期乳児、13；潜在性全般性てんかん；潜在性焦点性てんかん；ミオクロニー失立発作てんかん；レノックス・ガスト症候群；ウェスト症候群；特発性痙攣；早期ミオクロニー脳症；進行性ミオクロニーてんかん；小児交互性片麻痺；分類不能てんかん性脳症；てんかんにおける予期せぬ突然死（S U D E P）；洞不全症候群1；自閉症；又は乳児悪性遊走性部分発作である。いくつかの態様では、G E F S +は、全般性てんかん熱性痙攣プラス2型である。いくつかの態様では、熱性痙攣は、家族性熱性痙攣3Aである。いくつかの態様では、S M E Bは、全般性棘徐波のないS M E B（S M E B - S W）、ミオクロニー発作のないS M E B（S M E B - M）、S M E Iの1より多い特徴を欠いているS M E B（S M E B - O）、又は全身性强直性間代性発作を伴う小児難治性てんかん（I C E G T C）である。

#### 【0005】

【0005】 本発明のある態様において開示されるのは、ナンセンス変異依存性R N A分解誘導エクソンを含有するm R N A（N M Dエクソンm R N A）であってS C N 1 Aタンパク質をコードするm R N Aを有する細胞において、S C N 1 Aタンパク質の発現を調節する方法であって、該方法は、該細胞へ治療薬剤を接触させ、それにより治療薬剤は、S C N 1 Aタンパク質をコードするN M Dエクソンm R N AからのN M Dエクソンのスプライシングを調節し、それによりS C N 1 Aタンパク質をコードするプロセシングされたm R N Aのレベルを調節し、そして、該細胞におけるS C N 1 Aタンパク質の発現を調節する、ことを含んでなり、ここで該治療薬剤は、S C N 1 AをコードするN M Dエクソンm R N Aの標的化部分へ結合し、そして該標的化部分は、N M D誘導エクソン（N I E）の5'端から約1000ヌクレオチド上流～N I Eの3'端の約1000ヌクレオチド下流にある。

#### 【0006】

【0006】 本発明のある態様において開示されるのは、疾患又は病態を治療することが必要な被験者の細胞においてS C N 1 Aタンパク質の発現を調節することによって、該被験者においてそれを治療する方法であって、該方法は、該細胞中のN M Dエクソンを含有してS C N 1 Aをコードするm R N Aからのナンセンス変異依存性m R N A分解誘導エクソン（N M Dエクソン）のスプライシングを調節する治療薬剤と該被験者の該細胞とを接触させ、それによりS C N 1 Aタンパク質をコードするプロセシングされたm R N Aのレベルを調節し、そして、該被験者の該細胞におけるS C N 1 Aタンパク質の発現を調節する、ことを含んでなり；ここで該治療薬剤は、S C N 1 AをコードするN M Dエクソンm R N Aの標的化部分へ結合し、そして該標的化部分は、N M D誘導エクソン（N I E）の5'端から約1000ヌクレオチド上流～N I Eの3'端の約1000ヌクレオチド下流にある。

#### 【0007】

【0007】 本発明のある態様において開示されるのは、配列番号12～731のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%同一である配列を含んでなるアンチセンスオリゴマー（A S O）である。

#### 【0008】

【0008】 本発明のある態様において開示されるのは、配列番号12～731より選択される配列から成るアンチセンスオリゴマー（A S O）である。

【0009】 本発明のある態様において開示されるのは、疾患又は病態を治療することが必

10

20

30

40

50

要な被験者の細胞においてSCN1Aタンパク質の発現を調節することによって、該被験者においてそれを治療する方法であって、該方法は、配列番号12～731のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%同一である配列を含んでなるASO；又は配列番号12～731より選択される配列から成るASOと該被験者の該細胞とを接触させることを含んでなる。

【0009】

[0010] 本発明のある態様において開示されるのは、配列番号12～731のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%同一である配列を含んでなるASO；又は配列番号12～731より選択される配列から成るASOを含んでなるキットである。

【0010】

援用

[0011] 本明細書において言及されるすべての出版物、特許、及び特許出願は、それぞれ個別の出版物、特許、又は特許出願が具体的かつ個別的に援用されると示されるのと同じ程度で、本明細書に援用される。

【0011】

[0012] 本発明の新規な特徴については、付帯の請求項において特に説明される。本発明の原理が活用される例解の態様について説明する以下の詳細な記載と、以下の付帯図面を参照することによって、本発明の特徴及び利点についてのより良い理解が得られよう。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1AB】[0013] 図1は、ナンセンス変異依存性RNA分解誘導エクソンを含有する標的mRNA(NMDエクソンmRNA)と、全長標的タンパク質又は機能的RNAの発現を増加させる、ナンセンス変異依存性mRNA分解誘導エクソンの治療薬剤媒介性排除の概略図を図示する。図1Aは、核分画と細胞質分画へ分割された細胞を示す。核内では、標的遺伝子のプレmRNA転写産物がスプライシングを受けてmRNAを産生し、このmRNAが細胞質へ輸送されて標的タンパク質へ翻訳される。この標的遺伝子について、そのmRNAのある画分は、ナンセンス変異依存性mRNA分解誘導エクソン(NMDエクソンmRNA)を含有してそれが細胞質において分解されるので、標的タンパク質産生をもたらさない。図1Bは、核分画と細胞質分画へ分割された同じ細胞の例を示す。アンチセンスオリゴマー(ASO)のような治療薬剤で処理すると、ナンセンス変異依存性mRNA分解誘導エクソンの排除が促進されてmRNAの増加を生じ、次いでこれがより高いレベルの標的タンパク質へ翻訳される。

【図1C】図1Cは、ナンセンス変異依存性mRNA分解誘導エクソンの治療用ASO媒介性排除の概略図であって、この排除は、非産生性mRNAを減少させて産生性mRNAを増加させ、この産生性mRNAからの全長標的タンパク質の発現を増加させる。

【図2】[0014] 図2は、例示のナンセンス変異依存性mRNA分解(NMD)誘導エクソンのSCN1A遺伝子における同定を図示する。比較ゲノミクスを使用するSCN1A遺伝子中のNMD誘導エクソンの同定は、UCSCゲノムブラウザーにおいて可視化されて示される。上パネルは、SCN1A遺伝子の拡大したグラフを示す。100種の脊椎動物種にわたる保存レベルをピークとして示す。最高のピークがエクソン(黒色のボックス)に対応するのにに対し、大多数のイントロン(矢じりのあるライン)では、ピークが観測されない。保存のピークがイントロン20(NM\_006920)に同定されており、中央パネルに示した。保存された配列の精査により、3'スプライス部位と5'スプライス部位(下線を施した配列)が横にある、64bpのエクソン様配列(下パネル、灰色で強調した配列)を同定し、これをエクソン20xと称する。このエクソンの包含がフレームシフトをもたらすため、エクソン21中に未成熟終止コドンを導入して、この転写産物をNMDの標的とする。図2は配列番号732を記載する。

【図3】[0015] 図3Aは、シクロヘキシミド処理を介したNMD誘導エクソンの確認を図示する。DMSO処理(CHX<sup>-</sup>)又はシクロヘキシミド処理(CHX<sup>+</sup>)したNeu

10

20

30

40

50

ro 2 A (マウス神経前駆細胞)由来の細胞質RNAと、エクソン21と下流エクソンのプライマーを使用するRT-PCR分析によって、NMD誘導エクソン(21x)に対応するバンドの存在を確認した。この産物の独自性について、配列決定によって確認した。このバンドの濃度測定分析を実施して、全SCN1A転写産物のエクソン21x包含%を計算した。Neuro 2 Aをシクロヘキシミドで処理(CHX<sup>+</sup>)してNMDを阻害すると、細胞質画分において、NMD誘導エクソン21xに対応する産物が2倍増加した(薄灰色のバー、CHX<sup>-</sup>と濃灰色のバー、CHX<sup>+</sup>を比較すること)。[0016] 図3 Bは、シクロヘキシミド処理を介したNMD誘導エクソンの確認を図示する。DMSO処理(CHX<sup>-</sup>)又はシクロヘキシミド処理(CHX<sup>+</sup>)したRenCell VM(ヒト神経前駆細胞)由来の細胞質RNAと、エクソン21とエクソン23におけるプライマーを使用するRT-PCR分析によって、NMD誘導エクソン(20x)に対応するバンドの存在を確認した。この産物の独自性について、配列決定によって確認した。このバンドの濃度測定分析を実施して、全SCN1A転写産物のエクソン20x包含%を計算した。RenCell VMをシクロヘキシミドで処理(CHX<sup>+</sup>)してNMDを阻害すると、細胞質画分において、NMD誘導エクソン20xに対応する産物が2倍増加した(薄灰色のバー、CHX<sup>-</sup>と濃灰色のバー、CHX<sup>+</sup>を比較すること)。

10

【図4】[0017] 図4は、エクソン20xの3'スプライス部位の上流にある2つの指定領域(領域1と領域2)とエクソン20xの5'スプライス部位の下流にある2つの指定領域(領域3と領域4)を標的とする、SCN1Aエクソン20x領域について実施したASOウォークの例示のグラフを図示する。1度に5ヌクレオチドをシフトさせることによってこれらの領域を網羅するようにASOを設計した。

20

【図5A】[0018] 図5Aは、RT-PCRによって評価した、伸長ASOウォークより選択されたSCN1Aエクソン20x領域へのASOを図示する。代表的なPAGEは、RenCellにおいて、1μMで24時間のヌクレオフェクションを介して、SCN1Aモック処理、対照ASO処理(NT)、又は伸長ウォーク由来のSCN1Aエクソン20x領域へのASOで処理された、SYBR-安全染色RT-PCR産物を示す。モック=ASO無し;対照NT=非標的化対照;Pos ctrl=陽性対照。

【図5B】[0019] 図5Bは、図5Aのデータからのエクソン20x包含%をプロットするグラフを図示する。

【図5C】[0020] 図5Cは、RPL32内部対照に対して正規化した、図5Aの試料を使用する伸長ASOウォークのqPCR結果のグラフを図示しており、モックに比べたSCN1A mRNAの倍数変化をプロットする。

30

【発明の詳細な説明】

【0013】

#### スプライシングとナンセンス変異依存性mRNA分解

[0021] 介在配列又はイントロンは、スプライセオソーム(これは、1次転写産物、核内低分子RNA(s nRNA)、及び多数のタンパク質の間の相互作用を調整する)と称される大きくてきわめて動的なRNA-タンパク質複合体によって除去される。スプライセオソームは、U1 s nRNAによる5'スプライス部位(5' s s)の認識、又はU2経路による3'スプライス部位(3' s s)の認識から始まって、各イントロンについて秩序だったやり方でその場限りに(ad hoc)組み立てられるが、これにはU2補助因子(U2AF)が3' s s領域へ結合して分岐点配列(BPS)へのU2結合を促進させることが関与する。U2AFは、U2AF2をコードする65 kDサブユニット(U2AF65)(これは、ポリピリミジントラクト(PPT)へ結合する)とU2AF1をコードする35 kDサブユニット(U2AF35)(これは、高度に保存されたAGジヌクレオチドと3' s sにて相互作用し、U2AF65結合を安定化させる)から構成される安定したヘテロ2量体である。このBPS/PPTユニットと3' s s/5' s sに加えて、正確なスプライシングには、イントロン又はエクソンのスプライシングのエンハンサー又はサイレンサーとして知られている、スプライス部位認識を活性化するか又は抑制する、補助的な配列又は構造が必要とされる。これらのエレメントにより、高等真核生物のゲノムにある大過

40

50

剰のクリプティック部位又はシュード部位（真正の部位と同じ配列を有するが、数は1桁多い）の中で真正のスプライス部位が認識されることが可能になる。それらは、しばしば調節機能を有するが、それらの活性化又は抑制の機序についてはほとんど理解されていない。

#### 【0014】

[0022] スプライシングするか又はしないかの決定は、典型的には、決定論的プロセスというより確率論的プロセスとしてモデル化され得るので、どんなに規定されたスプライシングシグナルであっても不正確にスプライシングする場合があります。しかしながら、正常な条件下では、プレmRNAスプライシングが驚くほど高い忠実度で進行するものである。これは、一部は、隣接するシス作用性の補助的なエクソン及びイントロンのスプライシング調節エレメント（ESR又はISR）の活性によるものである。典型的には、これらの機能的エレメントは、スプライシングを促進するか又は阻害するそれらの能力に基づいて、それぞれエクソンスプライシングエンハンサー又はイントロンスプライシングエンハンサー（ESE又はISE）又はサイレンサー（ESS又はISS）のいずれかとして分類される。一部の補助的シス作用性エレメントには、U1 snRNPと5' splice siteとの複合体の配置のように、スプライセオソーム組立ての動力学に影響を及ぼすことによって作用する可能性があるという証拠が今日あるものの、多くのエレメントは、トランス作用性RNA結合タンパク質（RBP）と協調的に機能する可能性がきわめて高いようである。例えば、セリン及びアルギニンリッチのRBPファミリー（SRタンパク質）は、エクソンを規定するのに重要な役割を担っている、保存されたタンパク質ファミリーである。SRタンパク質は、プレスプライセオソームの諸成分を隣接スプライス部位へ動員することによるか又は近傍にあるESSの効果に拮抗することによって、エクソン認識を促進させる。ESSの抑制効果は、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質（hnRNP）ファミリーのメンバーによって媒介され得て、コアなスプライシング因子の隣接スプライス部位への動員を変化させることができる。スプライシング調節におけるそれらの役割に加えて、サイレンサーエレメントは、シュードエクソン（典型的なエクソンの間隔を有するが、機能的なオープンリーディングフレームを有さない、デコイイントロンスプライス部位のセット）の抑制にも役割を有すると示唆されている。ESEとESSは、それらの同系のトランス作用性RBPと共同して、mRNAがそれらの前駆体から組み立てられる方法、場所、及び時機を特性するスプライシング制御のセットにおいて重要な成分となる。

#### 【0015】

[0023] エクソン - イントロン境界の印となる配列は、ヒトの遺伝子内で高頻度に出現し得る、様々な強度の縮重シグナルである。多重エクソン遺伝子では、様々なスプライス部位の対が多く異なる組合せで一緒に連結し得て、単一の遺伝子から多種多様な転写産物を創出する。これは、一般に、選択的プレmRNAスプライシングと呼ばれる。選択的スプライシングによって産生されるほとんどのmRNAアイソフォームは、核から輸送されて機能的なポリペプチドへ翻訳され得るが、単一遺伝子由来の様々なmRNAアイソフォームは、その翻訳効率において多大に変動する可能性がある。未成熟終止コドン（PTC）がエクソン結合複合体の少なくとも50bp上流にあるmRNAアイソフォームは、ナンセンス変異依存性mRNA分解（NMD）経路による分解の標的にされる可能性がある。伝統的（BPS / PPT / 3' splice site / 5' splice site）及び補助的なスプライシングモチーフにおける突然変異は、エクソンスキッピング又はクリプティック（又はシュード）エクソン包含又はスプライス部位活性化といった、異常なスプライシングを引き起して、有意にヒトの罹患と死亡の原因になる可能性がある。異常スプライシングと選択的スプライシングのいずれのパターンも、エクソン及びイントロンにおける天然のDNA変異体によって影響を受ける可能性がある。

#### 【0016】

[0024] エクソン - イントロンの境界がコドンの3つの位置のどこでも生じ得るとすれば、基準の（canonical）オープンリーディングフレームを維持することができるのは、選択的スプライシング事象の1つのサブセットだけである。例えば、リーディングフレー

10

20

30

40

50

ムの改変なしに mRNA においてスキップされるか又は包含され得るのは、3 によって等しく割りきれるエクソンだけである。適合可能な相 (compatible phases) を有さないスプライシング事象は、フレームシフトを誘導する。下流の事象によって元に戻されなければ、フレームシフトは、確実に 1 以上の PTC をもたらし、おそらくは NMD による後続の分解を生じる可能性がある。NMD は、PTC を含有している mRNA を除去する、翻訳に共役した機序である。NMD は、すべての真核生物に存在する監視経路として機能することができる。NMD は、未成熟停止コドンを含む mRNA 転写産物を除去することによって、遺伝子発現におけるエラーを抑制することができる。これらの異常な mRNA の翻訳は、ある場合には、生じるタンパク質の有害な機能獲得又は優勢ネガティブ活性をもたらす可能性がある。NMD は、PTC のある転写産物だけでなく、多くの内因性遺伝子より発現される広範囲の mRNA アイソフォームも標的とするので、NMD は、細胞中の定常状態の RNA レベルの微調整と粗調整とともに推進する主要制御因子であると示唆されている。

10

【0017】

[0025] NMD 誘導エクソン (NIE) は、イントロン内部の領域であって、成熟 RNA 転写産物に含まれる場合に NMD 経路を活性化することができる、エクソン又はシュードエクソンである。恒常的なスプライシング事象において、NIE を含有しているイントロンは、通常はスプライスアウトされるが、そのイントロン又はその一部 (例、NIE) は、選択的又は異常なスプライシング事象の間に保持される可能性がある。そのような NIE を含有している成熟 mRNA 転写産物は、NMD 経路を誘導するフレームシフトの故に非産生性であり得る。成熟 RNA 転写産物における NIE の包含は、遺伝子発現を下方調節する可能性がある。本開示では、NIE を含有している mRNA 転写産物を「NIE 含有 mRNA」又は「NMD エクソン mRNA」と呼ぶことにする。

20

【0018】

[0026] クリプティック (又はシュード) スプライス部位は、真正のスプライス部位と同じスプライシング認識配列を有するが、スプライシング反応には使用されない。それらは、ヒトゲノム中の真正のスプライス部位より 1 桁数多くて、通常は、これまでほとんど理解されていない分子機序によって抑制されている。クリプティック 5' スプライス部位は、コンセンサス NNN / G U N N N N 又は N N N / G C N N N N (ここで N は、あらゆるヌクレオチドであって、/ は、エクソン - イントロンの境界である) を有する。クリプティック 3' スプライス部位は、コンセンサス N A G / N を有する。それらの活性化は、正統なスプライス部位の最適なコンセンサス (即ち、それぞれ、M A G / G U R A G U と Y A G / G、ここで M は、C 又は A であり、R は、G 又は A であり、そして Y は、C 又は U である) により類似させる周囲のヌクレオチドによって、プラスの影響を受ける。

30

【0019】

[0027] スプライス部位とそれらの調節配列は、当業者によって、例えば、Kralovicka, J. and Vorechovsky, I. (2007) 「補助スプライシング配列による異常なスプライス部位活性化の全体制御: エクソン及びイントロンの明確化における勾配の証拠 (Global control of aberrant splice site activation by auxiliary splicing sequences: evidence for a gradient in exon and intron definition)」, *Nucleic Acids Res.*, 35, 6399-6413, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2095810/pdf/gkm680.pdf>) に記載される、公的に利用可能な好適なアルゴリズムを使用して、容易に同定することができる。

40

【0020】

[0028] クリプティックスプライス部位又はスプライシング調節配列は、U2AF のような RNA 結合タンパク質について、NIE のスプライス部位と競合する場合がある。1 つの態様では、クリプティックスプライス部位又はスプライシング調節配列へある薬剤を結合させて RNA 結合タンパク質の結合を妨げて、それによって NIE スプライス部位の利用を有利にし得る。

【0021】

50

【0029】 1つの態様では、クリプティックスプライス部位は、NIEの5'又は3'スプライス部位を含み得ない。クリプティックスプライス部位は、NIE5'スプライス部位の少なくとも10ヌクレオチド上流にあり得る。クリプティックスプライス部位は、NIE5'スプライス部位の少なくとも20ヌクレオチド上流にあり得る。クリプティックスプライス部位は、NIE5'スプライス部位の少なくとも50ヌクレオチド上流にあり得る。クリプティックスプライス部位は、NIE5'スプライス部位の少なくとも100ヌクレオチド上流にあり得る。クリプティックスプライス部位は、NIE5'スプライス部位の少なくとも200ヌクレオチド上流にあり得る。

【0022】

【0030】 クリプティックスプライス部位は、NIE3'スプライス部位の少なくとも10ヌクレオチド下流にあり得る。クリプティックスプライス部位は、NIE3'スプライス部位の少なくとも20ヌクレオチド下流にあり得る。クリプティックスプライス部位は、NIE3'スプライス部位の少なくとも50ヌクレオチド下流にあり得る。クリプティックスプライス部位は、NIE3'スプライス部位の少なくとも100ヌクレオチド下流にあり得る。クリプティックスプライス部位は、NIE3'スプライス部位の少なくとも200ヌクレオチド下流にあり得る。

【0023】

#### 標的転写産物

【0031】 いくつかの態様では、本開示の方法は、SCN1A遺伝子より転写されるプレmRNA中のNIEの存在を利用する。同定されたSCN1A NIEプレmRNA分子種のスプライシングにより機能的な成熟SCN1A mRNAを産生することは、NIEのエクソンスキッピングを促進させる、ASOのような治療薬剤を使用して誘導することができる。エクソンスキッピングの誘導は、NMD経路の阻害を生じる可能性がある。生じる成熟SCN1A mRNAは、通常はNMD経路を活性化することなく翻訳され得て、それによって患者の細胞中のSCN1Aタンパク質の量を増加させて、ドラベ症候群(DS)；全般性てんかん熱性痙攣プラス、2型；家族性熱性痙攣、3A；自閉症；てんかん性脳症、早期乳児、13；洞不全症候群1；アルツハイマー病；又はSUDEPのようなSCN1A欠損症に関連した病態の症状を軽減する。

【0024】

【0032】 様々な態様では、本開示は、SCN1A mRNA転写産物を標的にしてスプライシング又はタンパク質発現レベルを調節する(例、亢進するか又は阻害する)ことができる治療薬剤を提供する。この治療薬剤は、低分子、ポリヌクレオチド、又はポリペプチドであり得る。いくつかの態様では、治療薬剤は、ASOである。SCN1AプレmRNA上の様々な領域又は配列がASOのような治療薬剤によって標的化され得る。いくつかの態様では、ASOは、NIEを含有しているSCN1AプレmRNA転写産物を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、SCN1AプレmRNA転写産物のNIE内部にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、SCN1AプレmRNA転写産物のNIE(3'ss)の5'端より上流(又は5')にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、SCN1AプレmRNA転写産物のNIE(5'ss)の3'端より下流(又は3')にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、SCN1AプレmRNA転写産物のNIEの5'端の横にあるイントロンの内部にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、SCN1AプレmRNA転写産物のNIEの3'端の横にあるイントロンの内部にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、SCN1AプレmRNA転写産物のNIE-イントロン境界を含んでなる配列を標的にする。NIE-イントロン境界は、イントロン配列とNIE領域のジャンクションに言及し得る。このイントロン配列は、NIEの5'端又はNIEの3'端の横にあり得る。いくつかの態様では、ASOは、SCN1AプレmRNA転写産物のエクソンの内部にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、SCN1AプレmRNA転写産物のイントロンの内部にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、イントロンの一部とエクソンの一部をと共に含んでなる配列を標的にする。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 5 】

[0033] いくつかの態様では、本明細書に記載される治療薬剤が、NMDエクソンmRNAのスプライシングに関与する因子の結合を調節する。

[0034] いくつかの態様では、本明細書に記載される治療薬剤が、NMDエクソンmRNAのスプライシングに関与する因子の結合に干渉する。

## 【 0 0 2 6 】

[0035] いくつかの態様では、本明細書に記載される治療薬剤が、NMDエクソンmRNAのスプライシングに関与する因子の結合を妨げる。

[0036] いくつかの態様では、治療薬剤が、SCN1AをコードするNMDエクソンmRNAの2つの基準エクソン領域間のイントロン領域中に位置している標的化部分を標的にして、ここでこのイントロン領域は、NMDエクソンを含有する。

10

## 【 0 0 2 7 】

[0037] いくつかの態様では、治療薬剤が、NMDエクソンと少なくとも一部重なっている標的化部分を標的にする。

[0038] いくつかの態様では、治療薬剤が、NMDエクソンの上流にあるイントロンと少なくとも一部重なっている標的化部分を標的にする。

## 【 0 0 2 8 】

[0039] いくつかの態様では、治療薬剤が、NMDエクソンの内部にある標的化部分を標的にする。

[0040] いくつかの態様では、治療薬剤が、NMDエクソンの少なくとも約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30以上の連続したヌクレオチドを含んでなる標的化部分を標的にする。いくつかの態様では、治療薬剤が、NMDエクソンの最大でも約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30以上の連続したヌクレオチドを含んでなる標的化部分を標的にする。いくつかの態様では、治療薬剤が、NMDエクソンの約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30以上の連続したヌクレオチドを含んでなる標的化部分を標的にする。

20

30

## 【 0 0 2 9 】

[0041] いくつかの態様では、治療薬剤が、NMDエクソンの近位にある標的化部分を標的にする。

[0042] いくつかの態様では、ASOは、NIEを含んでなるイントロンの5'端から約1～約5000ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、NIEを含んでなるイントロンの5'端から約1～約20ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約50～約100ヌクレオチド、約100～約150ヌクレオチド、約150～約200ヌクレオチド、約200～約250ヌクレオチド、約250～約300ヌクレオチド、約300～約350ヌクレオチド、約350～約400ヌクレオチド、約400～約450ヌクレオチド、約450～約500ヌクレオチド、約500～約600ヌクレオチド、約600～約700ヌクレオチド、約700～約800ヌクレオチド、約800～約900ヌクレオチド、約900～約1000ヌクレオチド、約1000～約1100ヌクレオチド、約1100～約1200ヌクレオチド、約1200～約1300ヌクレオチド、約1300～約1400ヌクレオチド、約1400～約1500ヌクレオチド、約1500～約1600ヌクレオチド、約1600～約1700ヌクレオチド、約1700～約1800ヌクレオチド、約1800～約1900ヌクレオチド、約1900～約2000ヌクレオチド、約2000～約3000ヌクレオチド、約3000～約4000ヌクレオチド、又は約4000～約5000ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、NIEを含んでなるイントロンの5'端から約1～約20ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約50～約100ヌクレオチド、約100～約150ヌクレオチド、約150～約200

40

50

ヌクレオチド、約 200 ~ 約 250 ヌクレオチド、約 250 ~ 約 300、約 250 ~ 約 300 ヌクレオチド、約 350 ~ 約 400 ヌクレオチド、約 450 ~ 約 500 ヌクレオチド、約 550 ~ 約 600 ヌクレオチド、約 650 ~ 約 700 ヌクレオチド、約 750 ~ 約 800 ヌクレオチド、約 850 ~ 約 900 ヌクレオチド、又は約 950 ~ 約 1000 ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。

【0030】

[0043] いくつかの態様では、ASOは、NIEを含んでなるイントロンの5'端から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、少なくとも約96ヌクレオチド、少なくとも約97ヌクレオチド、少なくとも約98ヌクレオチド、少なくとも約99ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約101ヌクレオチド、少なくとも約102ヌクレオチド、少なくとも約103ヌクレオチド、少なくとも約104ヌクレオチド、少なくとも約105ヌクレオチド、少なくとも約110ヌクレオチド、少なくとも約120ヌクレオチド、少なくとも約150ヌクレオチド、少なくとも約200ヌクレオチド、少なくとも約300ヌクレオチド、少なくとも約400ヌクレオチド、少なくとも約500ヌクレオチド、少なくとも約600ヌクレオチド、少なくとも約700ヌクレオチド、少なくとも約800ヌクレオチド、少なくとも約900ヌクレオチド、少なくとも約1000ヌクレオチド、少なくとも約1200ヌクレオチド、少なくとも約1400ヌクレオチド、少なくとも約1500ヌクレオチド、少なくとも約1600ヌクレオチド、少なくとも約1800ヌクレオチド、少なくとも約2000ヌクレオチド、少なくとも約3000ヌクレオチド、少なくとも約4000ヌクレオチド、又は少なくとも約5000ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。

【0031】

[0044] いくつかの態様では、ASOは、NIEの5'端から約1 ~ 約2000ヌクレオチド上流（又は5'）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、NIEの5'端から約1 ~ 約20ヌクレオチド、約20 ~ 約50ヌクレオチド、約50 ~ 約100ヌクレオチド、約100 ~ 約150ヌクレオチド、約150 ~ 約200ヌクレオチド、約200 ~ 約250ヌクレオチド、約250 ~ 約300、約250 ~ 約300ヌクレオチド、約350 ~ 約400ヌクレオチド、約450 ~ 約500ヌクレオチド、約550 ~ 約600ヌクレオチド、約650 ~ 約700ヌクレオチド、約750 ~ 約800ヌクレオチド、約850 ~ 約900ヌクレオチド、約950 ~ 約1000ヌクレオチド、約1050 ~ 約1100ヌクレオチド、約1150 ~ 約1200ヌクレオチド、約1250 ~ 約1300ヌクレオチド、約1350 ~ 約1400ヌクレオチド、約1450 ~ 約1500ヌクレオチド、約1550 ~ 約1600ヌクレオチド、約1650 ~ 約1700ヌクレオチド、約1750 ~ 約1800ヌクレオチド、約1850 ~ 約1900ヌクレオチド、又は約1950 ~ 約2000ヌクレオチド上流（又は5'）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、NIEの5'端から約1 ~ 約20ヌクレオチド、約20 ~ 約50ヌクレオチド、約50 ~ 約100ヌクレオチド、約100 ~ 約150ヌクレオチド、約150 ~ 約200ヌクレオチド、約200 ~ 約250ヌクレオチド、約250 ~ 約300、約250 ~ 約300ヌクレオチド、約350 ~ 約400ヌクレオチド、約450 ~ 約500ヌクレオチド、約550 ~ 約600ヌクレオチド、約650 ~ 約700ヌクレオチド、約750 ~ 約800ヌクレオチド、約850 ~ 約900ヌクレオチド、又は約950 ~ 約1000ヌクレオチド上流（又は5'）にある配列を標的にする。

【0032】

[0045] いくつかの態様では、ASOは、NIEの5'端から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、少なくとも約96ヌクレオチド、少なくとも約97ヌクレオチド、少なくとも約98ヌクレオチド、少なくとも約99

ヌクレオチド、少なくとも約 100 ヌクレオチド、少なくとも約 101 ヌクレオチド、少なくとも約 102 ヌクレオチド、少なくとも約 103 ヌクレオチド、少なくとも約 104 ヌクレオチド、少なくとも約 105 ヌクレオチド、少なくとも約 110 ヌクレオチド、少なくとも約 120 ヌクレオチド、少なくとも約 150 ヌクレオチド、少なくとも約 200 ヌクレオチド、少なくとも約 300 ヌクレオチド、少なくとも約 400 ヌクレオチド、少なくとも約 500 ヌクレオチド、少なくとも約 600 ヌクレオチド、少なくとも約 700 ヌクレオチド、少なくとも約 800 ヌクレオチド、少なくとも約 900 ヌクレオチド、少なくとも約 1000 ヌクレオチド、少なくとも約 1200 ヌクレオチド、少なくとも約 1400 ヌクレオチド、少なくとも約 1500 ヌクレオチド、少なくとも約 1600 ヌクレオチド、少なくとも約 1800 ヌクレオチド、又は少なくとも約 2000 ヌクレオチド上流（又は 5'）にある配列を標的にする。

10

#### 【0033】

[0046] いくつかの態様では、ASOは、NIEの5'端から約1～約500ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、NIE領域の5'端から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、少なくとも約96ヌクレオチド、少なくとも約97ヌクレオチド、少なくとも約98ヌクレオチド、少なくとも約99ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約101ヌクレオチド、少なくとも約102ヌクレオチド、少なくとも約103ヌクレオチド、少なくとも約104ヌクレオチド、少なくとも約105ヌクレオチド、少なくとも約110ヌクレオチド、少なくとも約120ヌクレオチド、少なくとも約150ヌクレオチド、少なくとも約200ヌクレオチド、少なくとも約300ヌクレオチド、少なくとも約400ヌクレオチド、又は少なくとも約500ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。

20

#### 【0034】

[0047] いくつかの態様では、ASOは、NIEの3'端から約1～約500ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、NIE領域の3'端から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、少なくとも約96ヌクレオチド、少なくとも約97ヌクレオチド、少なくとも約98ヌクレオチド、少なくとも約99ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約101ヌクレオチド、少なくとも約102ヌクレオチド、少なくとも約103ヌクレオチド、少なくとも約104ヌクレオチド、少なくとも約105ヌクレオチド、少なくとも約110ヌクレオチド、少なくとも約120ヌクレオチド、少なくとも約150ヌクレオチド、少なくとも約200ヌクレオチド、少なくとも約300ヌクレオチド、少なくとも約400ヌクレオチド、又は少なくとも約500ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。

30

#### 【0035】

[0048] いくつかの態様では、ASOは、NIEの3'端から約1～約2000ヌクレオチド下流（又は3'）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、NIEの3'端から約1～約20ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約50～約100ヌクレオチド、約100～約150ヌクレオチド、約150～約200ヌクレオチド、約200～約250ヌクレオチド、約250～約300、約250～約300ヌクレオチド、約350～約400ヌクレオチド、約450～約500ヌクレオチド、約550～約600ヌクレオチド、約650～約700ヌクレオチド、約750～約800ヌクレオチド、約850～約900ヌクレオチド、約950～約1000ヌクレオチド、約1050～約1100ヌクレオチド、約1150～約1200ヌクレオチド、約1250～約1300ヌクレオチド、約1350～約1400ヌクレオチド、約1450～約1500ヌクレオ

40

50

チド、約 1 5 5 0 ~ 約 1 6 0 0 ヌクレオチド、約 1 6 5 0 ~ 約 1 7 0 0 ヌクレオチド、約 1 7 5 0 ~ 約 1 8 0 0 ヌクレオチド、約 1 8 5 0 ~ 約 1 9 0 0 ヌクレオチド、又は約 1 9 5 0 ~ 約 2 0 0 0 ヌクレオチド下流（又は 3'）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S O は、N I E の 3' 端から約 1 ~ 約 2 0 ヌクレオチド、約 2 0 ~ 約 5 0 ヌクレオチド、約 5 0 ~ 約 1 0 0 ヌクレオチド、約 1 0 0 ~ 約 1 5 0 ヌクレオチド、約 1 5 0 ~ 約 2 0 0 ヌクレオチド、約 2 0 0 ~ 約 2 5 0 ヌクレオチド、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0 ヌクレオチド、約 3 5 0 ~ 約 4 0 0 ヌクレオチド、約 4 5 0 ~ 約 5 0 0 ヌクレオチド、約 5 5 0 ~ 約 6 0 0 ヌクレオチド、約 6 5 0 ~ 約 7 0 0 ヌクレオチド、約 7 5 0 ~ 約 8 0 0 ヌクレオチド、約 8 5 0 ~ 約 9 0 0 ヌクレオチド、又は約 9 5 0 ~ 約 1 0 0 0 ヌクレオチド下流（又は 3'）にある配列を標的にする。

10

## 【0036】

[0049] いくつかの態様では、A S O は、N I E の 3' 端から少なくとも約 1 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 ヌクレオチド、少なくとも約 2 0 ヌクレオチド、少なくとも約 5 0 ヌクレオチド、少なくとも約 8 0 ヌクレオチド、少なくとも約 8 5 ヌクレオチド、少なくとも約 9 0 ヌクレオチド、少なくとも約 9 5 ヌクレオチド、少なくとも約 9 6 ヌクレオチド、少なくとも約 9 7 ヌクレオチド、少なくとも約 9 8 ヌクレオチド、少なくとも約 9 9 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 1 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 2 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 3 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 4 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 5 ヌクレオチド、少なくとも約 1 1 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 2 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 5 0 ヌクレオチド、少なくとも約 2 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 3 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 4 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 5 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 6 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 7 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 8 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 9 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 2 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 4 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 5 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 6 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 8 0 0 ヌクレオチド、又は少なくとも約 2 0 0 0 ヌクレオチド下流（又は 3'）にある配列を標的にする。

20

## 【0037】

[0050] いくつかの態様では、A S O は、N I E を含んでなるイントロンの 3' 端から約 1 ~ 約 5 0 0 0 ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S O は、N I E を含んでなるイントロンの 3' 端から約 1 ~ 約 2 0 ヌクレオチド、約 2 0 ~ 約 5 0 ヌクレオチド、約 5 0 ~ 約 1 0 0 ヌクレオチド、約 1 0 0 ~ 約 1 5 0 ヌクレオチド、約 1 5 0 ~ 約 2 0 0 ヌクレオチド、約 2 0 0 ~ 約 2 5 0 ヌクレオチド、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0 ヌクレオチド、約 3 5 0 ~ 約 4 0 0 ヌクレオチド、約 4 5 0 ~ 約 5 0 0 ヌクレオチド、約 5 5 0 ~ 約 6 0 0 ヌクレオチド、約 6 5 0 ~ 約 7 0 0 ヌクレオチド、約 7 5 0 ~ 約 8 0 0 ヌクレオチド、約 8 5 0 ~ 約 9 0 0 ヌクレオチド、約 9 5 0 ~ 約 1 0 0 0 ヌクレオチド、約 1 0 5 0 ~ 約 1 1 0 0 ヌクレオチド、約 1 1 5 0 ~ 約 1 2 0 0 ヌクレオチド、約 1 2 5 0 ~ 約 1 3 0 0 ヌクレオチド、約 1 3 5 0 ~ 約 1 4 0 0 ヌクレオチド、約 1 4 5 0 ~ 約 1 5 0 0 ヌクレオチド、約 1 5 5 0 ~ 約 1 6 0 0 ヌクレオチド、約 1 6 5 0 ~ 約 1 7 0 0 ヌクレオチド、約 1 7 5 0 ~ 約 1 8 0 0 ヌクレオチド、約 1 8 5 0 ~ 約 1 9 0 0 ヌクレオチド、約 1 9 5 0 ~ 約 2 0 0 0 ヌクレオチド、約 2 0 0 0 ~ 約 3 0 0 0 ヌクレオチド、約 3 0 0 0 ~ 約 4 0 0 0 ヌクレオチド、又は約 4 0 0 0 ~ 約 5 0 0 0 ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S O は、N I E を含んでなるイントロンの 3' 端から約 1 ~ 約 2 0 ヌクレオチド、約 2 0 ~ 約 5 0 ヌクレオチド、約 5 0 ~ 約 1 0 0 ヌクレオチド、約 1 0 0 ~ 約 1 5 0 ヌクレオチド、約 1 5 0 ~ 約 2 0 0 ヌクレオチド、約 2 0 0 ~ 約 2 5 0 ヌクレオチド、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0 ヌクレオチド、約 3 5 0 ~ 約 4 0 0 ヌクレオチド、約 4 5 0 ~ 約 5 0 0 ヌクレオチド、約 5 5 0 ~ 約 6 0 0 ヌクレオチド、約 6 5 0 ~ 約 7 0 0 ヌクレオチド、約 7 5 0 ~ 約 8 0 0 ヌクレオチド、約 8 5 0 ~ 約 9 0 0 ヌクレオチド、又は約 9 5 0 ~ 約 1 0 0 0 ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。

30

40

50

## 【 0 0 3 8 】

[0051] いくつかの態様では、A S Oは、N I Eを含んでなるイントロンの3'端から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、少なくとも約96ヌクレオチド、少なくとも約97ヌクレオチド、少なくとも約98ヌクレオチド、少なくとも約99ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約101ヌクレオチド、少なくとも約102ヌクレオチド、少なくとも約103ヌクレオチド、少なくとも約104ヌクレオチド、少なくとも約105ヌクレオチド、少なくとも約110ヌクレオチド、少なくとも約120ヌクレオチド、少なくとも約150ヌクレオチド、少なくとも約200ヌクレオチド、少なくとも約300ヌクレオチド、少なくとも約400ヌクレオチド、少なくとも約500ヌクレオチド、少なくとも約600ヌクレオチド、少なくとも約700ヌクレオチド、少なくとも約800ヌクレオチド、少なくとも約900ヌクレオチド、少なくとも約1000ヌクレオチド、少なくとも約1200ヌクレオチド、少なくとも約1400ヌクレオチド、少なくとも約1500ヌクレオチド、少なくとも約1600ヌクレオチド、少なくとも約1800ヌクレオチド、少なくとも約2000ヌクレオチド、少なくとも約3000ヌクレオチド、少なくとも約4000ヌクレオチド、又は少なくとも約5000ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。

10

## 【 0 0 3 9 】

[0052] いくつかの態様では、A S Oは、N I Eの5'端から約4～約300ヌクレオチド上流(又は5')にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S Oは、N I E領域の5'端から約1～約20ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約50～約100ヌクレオチド、約100～約150ヌクレオチド、約150～約200ヌクレオチド、約200～約250ヌクレオチド、約250～約300、約250～約300ヌクレオチド、約350～約400ヌクレオチド、約450～約500ヌクレオチド、約550～約600ヌクレオチド、約650～約700ヌクレオチド、約750～約800ヌクレオチド、約850～約900ヌクレオチド、約950～約1000ヌクレオチド、約1050～約1100ヌクレオチド、約1150～約1200ヌクレオチド、約1250～約1300ヌクレオチド、約1350～約1400ヌクレオチド、又は約1450～約1500ヌクレオチド上流(又は5')にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S Oは、N I Eの5'端から300ヌクレオチドより多く上流にある配列を標的にし得る。いくつかの態様では、A S Oは、N I Eの3'端から約4～約300ヌクレオチド下流(又は3')にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S Oは、N I Eの3'端から約1～約20ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約50～約100ヌクレオチド、約100～約150ヌクレオチド、約150～約200ヌクレオチド、約200～約250ヌクレオチド、約250～約300ヌクレオチド、約350～約400ヌクレオチド、約450～約500ヌクレオチド、約550～約600ヌクレオチド、約650～約700ヌクレオチド、約750～約800ヌクレオチド、約850～約900ヌクレオチド、約950～約1000ヌクレオチド、約1050～約1100ヌクレオチド、約1150～約1200ヌクレオチド、約1250～約1300ヌクレオチド、約1350～約1400ヌクレオチド、又は約1450～約1500ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S Oは、N I Eの3'端から300ヌクレオチドより多く下流にある配列を標的にする。

20

30

40

## 【 0 0 4 0 】

[0053] いくつかの態様では、A S Oは、N I Eの5'端から約4～約300ヌクレオチド上流(又は5')にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S Oは、N I E領域の5'端から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、少なくとも約96ヌクレオチド、少なくとも約97ヌクレオチド、少なくとも約

50

9 8ヌクレオチド、少なくとも約9 9ヌクレオチド、少なくとも約1 0 0ヌクレオチド、  
 少なくとも約1 0 1ヌクレオチド、少なくとも約1 0 2ヌクレオチド、少なくとも約1 0  
 3ヌクレオチド、少なくとも約1 0 4ヌクレオチド、少なくとも約1 0 5ヌクレオチド、  
 少なくとも約1 1 0ヌクレオチド、少なくとも約1 2 0ヌクレオチド、少なくとも約1 5  
 0ヌクレオチド、少なくとも約2 0 0ヌクレオチド、少なくとも約3 0 0ヌクレオチド、  
 少なくとも約4 0 0ヌクレオチド、少なくとも約5 0 0ヌクレオチド、少なくとも約6 0  
 0ヌクレオチド、少なくとも約7 0 0ヌクレオチド、少なくとも約8 0 0ヌクレオチド、  
 少なくとも約9 0 0ヌクレオチド、又は少なくとも約1 0 0 0ヌクレオチド上流（又は5 '）  
 ）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S Oは、N I Eの3 '端から約4 ~ 約  
 3 0 0ヌクレオチド下流（又は3 '）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S  
 Oは、N I Eの3 '端から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約1 0ヌクレオチド、  
 少なくとも約2 0ヌクレオチド、少なくとも約5 0ヌクレオチド、少なくとも約8 0ヌク  
 レオチド、少なくとも約8 5ヌクレオチド、少なくとも約9 0ヌクレオチド、少なくとも  
 約9 5ヌクレオチド、少なくとも約9 6ヌクレオチド、少なくとも約9 7ヌクレオチド、  
 少なくとも約9 8ヌクレオチド、少なくとも約9 9ヌクレオチド、少なくとも約1 0 0ヌ  
 クレオチド、少なくとも約1 0 1ヌクレオチド、少なくとも約1 0 2ヌクレオチド、少な  
 くとも約1 0 3ヌクレオチド、少なくとも約1 0 4ヌクレオチド、少なくとも約1 0 5ヌ  
 クレオチド、少なくとも約1 1 0ヌクレオチド、少なくとも約1 2 0ヌクレオチド、少な  
 くとも約1 5 0ヌクレオチド、少なくとも約2 0 0ヌクレオチド、少なくとも約3 0 0ヌ  
 クレオチド、少なくとも約4 0 0ヌクレオチド、少なくとも約5 0 0ヌクレオチド、少な  
 くとも約6 0 0ヌクレオチド、少なくとも約7 0 0ヌクレオチド、少なくとも約8 0 0ヌ  
 クレオチド、少なくとも約9 0 0ヌクレオチド、又は少なくとも約1 0 0 0ヌクレオチド  
 下流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S Oは、N I Eの3 '端から3 0 0  
 ヌクレオチドより多く下流にある配列を標的にする。

【0 0 4 1】

[0054] いくつかの態様では、A S Oは、N I Eの5 '端から約4 ~ 約3 0 0ヌクレオチ  
 ド上流（又は5 '）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S Oは、N I E領域  
 の5 '端から最大でも約1 0ヌクレオチド、最大でも約2 0ヌクレオチド、最大でも約5 0  
 ヌクレオチド、最大でも約8 0ヌクレオチド、最大でも約8 5ヌクレオチド、最大でも約  
 9 0ヌクレオチド、最大でも約9 5ヌクレオチド、最大でも約9 6ヌクレオチド、最大で  
 も約9 7ヌクレオチド、最大でも約9 8ヌクレオチド、最大でも約9 9ヌクレオチド、最  
 大でも約1 0 0ヌクレオチド、最大でも約1 0 1ヌクレオチド、最大でも約1 0 2ヌクレ  
 オチド、最大でも約1 0 3ヌクレオチド、最大でも約1 0 4ヌクレオチド、最大でも約1  
 0 5ヌクレオチド、最大でも約1 1 0ヌクレオチド、最大でも約1 2 0ヌクレオチド、最  
 大でも約1 5 0ヌクレオチド、最大でも約2 0 0ヌクレオチド、最大でも約3 0 0ヌクレ  
 オチド、最大でも約4 0 0ヌクレオチド、最大でも約5 0 0ヌクレオチド、最大でも約6  
 0 0ヌクレオチド、最大でも約7 0 0ヌクレオチド、最大でも約8 0 0ヌクレオチド、最  
 大でも約9 0 0ヌクレオチド、最大でも約1 0 0 0ヌクレオチド、最大でも約1 1 0 0ヌ  
 クレオチド、最大でも約1 2 0 0ヌクレオチド、最大でも約1 3 0 0ヌクレオチド、最大  
 でも約1 4 0 0ヌクレオチド、又は最大でも約1 5 0 0ヌクレオチド上流（又は5 '）にあ  
 る配列を標的にする。いくつかの態様では、A S Oは、N I Eの3 '端から約4 ~ 約3 0 0  
 ヌクレオチド下流（又は3 '）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S Oは、  
 N I Eの3 '端から最大でも約1 0ヌクレオチド、最大でも約2 0ヌクレオチド、最大でも  
 約5 0ヌクレオチド、最大でも約8 0ヌクレオチド、最大でも約8 5ヌクレオチド、最大  
 でも約9 0ヌクレオチド、最大でも約9 5ヌクレオチド、最大でも約9 6ヌクレオチド、  
 最大でも約9 7ヌクレオチド、最大でも約9 8ヌクレオチド、最大でも約9 9ヌクレオチ  
 ド、最大でも約1 0 0ヌクレオチド、最大でも約1 0 1ヌクレオチド、最大でも約1 0 2  
 ヌクレオチド、最大でも約1 0 3ヌクレオチド、最大でも約1 0 4ヌクレオチド、最大で  
 も約1 0 5ヌクレオチド、最大でも約1 1 0ヌクレオチド、最大でも約1 2 0ヌクレオチ  
 ド、最大でも約1 5 0ヌクレオチド、最大でも約2 0 0ヌクレオチド、最大でも約3 0 0

10

20

30

40

50

ヌクレオチド、最大でも約 400 ヌクレオチド、最大でも約 500 ヌクレオチド、最大でも約 600 ヌクレオチド、最大でも約 700 ヌクレオチド、最大でも約 800 ヌクレオチド、最大でも約 900 ヌクレオチド、又は最大でも約 1000 ヌクレオチド、最大でも約 1100 ヌクレオチド、最大でも約 1200 ヌクレオチド、最大でも約 1300 ヌクレオチド、最大でも約 1400 ヌクレオチド、又は最大でも約 1500 ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、NIEの3'端から300ヌクレオチドより多く下流にある配列を標的にする。

#### 【0042】

[0055] いくつかの態様では、本明細書に記載されるようなNIE（エクソン23）は、GRCh38/hg38:chr2:166007230とchr2:166007293の間に位置している。いくつかの態様では、NIEの5'端は、GRCh38/hg38:chr2:166007230に位置している。いくつかの態様では、NIEの3'端は、GRCh38/hg38:chr2:166007293に位置している。

10

#### 【0043】

[0056] いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh38/hg38:chr2:166007230から約1～約2000ヌクレオチド上流（又は5'）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh38/hg38:chr2:166007230から約1～約20ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約50～約100ヌクレオチド、約100～約150ヌクレオチド、約150～約200ヌクレオチド、約200～約250ヌクレオチド、約250～約300、約250～約300ヌクレオチド、約350～約400ヌクレオチド、約450～約500ヌクレオチド、約550～約600ヌクレオチド、約650～約700ヌクレオチド、約750～約800ヌクレオチド、約850～約900ヌクレオチド、約950～約1000ヌクレオチド、約1050～約1100ヌクレオチド、約1150～約1200ヌクレオチド、約1250～約1300ヌクレオチド、約1350～約1400ヌクレオチド、約1450～約1500ヌクレオチド、約1550～約1600ヌクレオチド、約1650～約1700ヌクレオチド、約1750～約1800ヌクレオチド、約1850～約1900ヌクレオチド、又は約1950～約2000ヌクレオチド上流（又は5'）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh38/hg38:chr2:166007230から約1～約20ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約50～約100ヌクレオチド、約100～約150ヌクレオチド、約150～約200ヌクレオチド、約200～約250ヌクレオチド、約250～約300、約250～約300ヌクレオチド、約350～約400ヌクレオチド、約450～約500ヌクレオチド、約550～約600ヌクレオチド、約650～約700ヌクレオチド、約750～約800ヌクレオチド、約850～約900ヌクレオチド、又は約950～約1000ヌクレオチド上流（又は5'）にある配列を標的にする。

20

30

#### 【0044】

[0057] いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh38/hg38:chr2:166007230から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、少なくとも約96ヌクレオチド、少なくとも約97ヌクレオチド、少なくとも約98ヌクレオチド、少なくとも約99ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約101ヌクレオチド、少なくとも約102ヌクレオチド、少なくとも約103ヌクレオチド、少なくとも約104ヌクレオチド、少なくとも約105ヌクレオチド、少なくとも約110ヌクレオチド、少なくとも約120ヌクレオチド、少なくとも約150ヌクレオチド、少なくとも約200ヌクレオチド、少なくとも約300ヌクレオチド、少なくとも約400ヌクレオチド、少なくとも約500ヌクレオチド、少なくとも約600ヌクレオチド、少なくとも約700ヌクレオチド、少なくとも約800ヌクレオチド、少なくとも約900ヌクレオチド、少なくとも約1000ヌクレオチ

40

50

ド、少なくとも約1200ヌクレオチド、少なくとも約1400ヌクレオチド、少なくとも約1500ヌクレオチド、少なくとも約1600ヌクレオチド、少なくとも約1800ヌクレオチド、又は少なくとも約2000ヌクレオチド上流（又は5'）にある配列を標的にする。

【0045】

[0058] いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh38/hg38:chr2:166007230から約1～約500ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh38/hg38:chr2:166007230から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、少なくとも約96ヌクレオチド、少なくとも約97ヌクレオチド、少なくとも約98ヌクレオチド、少なくとも約99ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約101ヌクレオチド、少なくとも約102ヌクレオチド、少なくとも約103ヌクレオチド、少なくとも約104ヌクレオチド、少なくとも約105ヌクレオチド、少なくとも約110ヌクレオチド、少なくとも約120ヌクレオチド、少なくとも約150ヌクレオチド、少なくとも約200ヌクレオチド、少なくとも約300ヌクレオチド、少なくとも約400ヌクレオチド、又は少なくとも約500ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。

10

【0046】

[0059] いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh38/hg38:chr2:166007293から約1～約500ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh38/hg38:chr2:166007293から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、少なくとも約96ヌクレオチド、少なくとも約97ヌクレオチド、少なくとも約98ヌクレオチド、少なくとも約99ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約101ヌクレオチド、少なくとも約102ヌクレオチド、少なくとも約103ヌクレオチド、少なくとも約104ヌクレオチド、少なくとも約105ヌクレオチド、少なくとも約110ヌクレオチド、少なくとも約120ヌクレオチド、少なくとも約150ヌクレオチド、少なくとも約200ヌクレオチド、少なくとも約300ヌクレオチド、少なくとも約400ヌクレオチド、又は少なくとも約500ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。

20

30

【0047】

[0060] いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh38/hg38:chr2:166007293から約1～約2000ヌクレオチド下流（又は3'）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh38/hg38:chr2:166007293から約1～約20ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約50～約100ヌクレオチド、約100～約150ヌクレオチド、約150～約200ヌクレオチド、約200～約250ヌクレオチド、約250～約300、約250～約300ヌクレオチド、約350～約400ヌクレオチド、約450～約500ヌクレオチド、約550～約600ヌクレオチド、約650～約700ヌクレオチド、約750～約800ヌクレオチド、約850～約900ヌクレオチド、約950～約1000ヌクレオチド、約1050～約1100ヌクレオチド、約1150～約1200ヌクレオチド、約1250～約1300ヌクレオチド、約1350～約1400ヌクレオチド、約1450～約1500ヌクレオチド、約1550～約1600ヌクレオチド、約1650～約1700ヌクレオチド、約1750～約1800ヌクレオチド、約1850～約1900ヌクレオチド、又は約1950～約2000ヌクレオチド下流（又は3'）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh38/hg38:chr

40

50

r 2 : 1 6 6 0 0 7 2 9 3 から約 1 ~ 約 2 0 ヌクレオチド、約 2 0 ~ 約 5 0 ヌクレオチド、約 5 0 ~ 約 1 0 0 ヌクレオチド、約 1 0 0 ~ 約 1 5 0 ヌクレオチド、約 1 5 0 ~ 約 2 0 0 ヌクレオチド、約 2 0 0 ~ 約 2 5 0 ヌクレオチド、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0 ヌクレオチド、約 3 5 0 ~ 約 4 0 0 ヌクレオチド、約 4 5 0 ~ 約 5 0 0 ヌクレオチド、約 5 5 0 ~ 約 6 0 0 ヌクレオチド、約 6 5 0 ~ 約 7 0 0 ヌクレオチド、約 7 5 0 ~ 約 8 0 0 ヌクレオチド、約 8 5 0 ~ 約 9 0 0 ヌクレオチド、又は約 9 5 0 ~ 約 1 0 0 0 ヌクレオチド下流（又は 3'）にある配列を標的にする。

#### 【 0 0 4 8 】

[0061] いくつかの態様では、A S O は、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 7 2 9 3 から少なくとも約 1 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 ヌクレオチド、少なくとも約 2 0 ヌクレオチド、少なくとも約 5 0 ヌクレオチド、少なくとも約 8 0 ヌクレオチド、少なくとも約 8 5 ヌクレオチド、少なくとも約 9 0 ヌクレオチド、少なくとも約 9 5 ヌクレオチド、少なくとも約 9 6 ヌクレオチド、少なくとも約 9 7 ヌクレオチド、少なくとも約 9 8 ヌクレオチド、少なくとも約 9 9 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 1 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 2 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 3 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 4 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 5 ヌクレオチド、少なくとも約 1 1 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 2 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 5 0 ヌクレオチド、少なくとも約 2 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 3 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 4 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 5 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 6 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 7 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 8 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 9 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 2 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 4 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 5 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 6 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 8 0 0 ヌクレオチド、又は少なくとも約 2 0 0 0 ヌクレオチド下流（又は 3'）にある配列を標的にする。

#### 【 0 0 4 9 】

[0062] いくつかの態様では、N I E を含んでなるイントロンは、G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 2 7 5 4 と c h r 2 : 1 6 6 0 0 9 7 1 8 の間に位置している。いくつかの態様では、N I E を含んでなるイントロンの 5' 端は、G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 2 7 5 4 に位置している。いくつかの態様では、N I E を含んでなるイントロンの 3' 端は、G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 9 7 1 8 に位置している。

#### 【 0 0 5 0 】

[0063] いくつかの態様では、A S O は、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 2 7 5 4 から約 1 ~ 約 5 0 0 0 ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S O は、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 2 7 5 4 から約 1 ~ 約 2 0 ヌクレオチド、約 2 0 ~ 約 5 0 ヌクレオチド、約 5 0 ~ 約 1 0 0 ヌクレオチド、約 1 0 0 ~ 約 1 5 0 ヌクレオチド、約 1 5 0 ~ 約 2 0 0 ヌクレオチド、約 2 0 0 ~ 約 2 5 0 ヌクレオチド、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0 ヌクレオチド、約 3 5 0 ~ 約 4 0 0 ヌクレオチド、約 4 5 0 ~ 約 5 0 0 ヌクレオチド、約 5 5 0 ~ 約 6 0 0 ヌクレオチド、約 6 5 0 ~ 約 7 0 0 ヌクレオチド、約 7 5 0 ~ 約 8 0 0 ヌクレオチド、約 8 5 0 ~ 約 9 0 0 ヌクレオチド、約 9 5 0 ~ 約 1 0 0 0 ヌクレオチド、約 1 0 5 0 ~ 約 1 1 0 0 ヌクレオチド、約 1 1 5 0 ~ 約 1 2 0 0 ヌクレオチド、約 1 2 5 0 ~ 約 1 3 0 0 ヌクレオチド、約 1 3 5 0 ~ 約 1 4 0 0 ヌクレオチド、約 1 4 5 0 ~ 約 1 5 0 0 ヌクレオチド、約 1 5 5 0 ~ 約 1 6 0 0 ヌクレオチド、約 1 6 5 0 ~ 約 1 7 0 0 ヌクレオチド、約 1 7 5 0 ~ 約 1 8 0 0 ヌクレオチド、約 1 8 5 0 ~ 約 1 9 0 0 ヌクレオチド、約 1 9 5 0 ~ 約 2 0 0 0 ヌクレオチド、約 2 0 0 0 ~ 約 3 0 0 0 ヌクレオチド、約 3 0 0 0 ~ 約 4 0 0 0 ヌクレオチド、又は約 4 0 0 0 ~ 約 5 0 0 0 ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S O は、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 2 7 5 4 から約 1 ~ 約 2 0 ヌクレオチド、約 2 0 ~ 約 5 0 ヌク

10

20

30

40

50

レオチド、約 50 ~ 約 100ヌクレオチド、約 100 ~ 約 150ヌクレオチド、約 150 ~ 約 200ヌクレオチド、約 200 ~ 約 250ヌクレオチド、約 250 ~ 約 300、約 250 ~ 約 300ヌクレオチド、約 350 ~ 約 400ヌクレオチド、約 450 ~ 約 500ヌクレオチド、約 550 ~ 約 600ヌクレオチド、約 650 ~ 約 700ヌクレオチド、約 750 ~ 約 800ヌクレオチド、約 850 ~ 約 900ヌクレオチド、又は約 950 ~ 約 1000ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。

# 【0051】

[0064] いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 2 7 5 4から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、少なくとも約96ヌクレオチド、少なくとも約97ヌクレオチド、少なくとも約98ヌクレオチド、少なくとも約99ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約101ヌクレオチド、少なくとも約102ヌクレオチド、少なくとも約103ヌクレオチド、少なくとも約104ヌクレオチド、少なくとも約105ヌクレオチド、少なくとも約110ヌクレオチド、少なくとも約120ヌクレオチド、少なくとも約150ヌクレオチド、少なくとも約200ヌクレオチド、少なくとも約300ヌクレオチド、少なくとも約400ヌクレオチド、少なくとも約500ヌクレオチド、少なくとも約600ヌクレオチド、少なくとも約700ヌクレオチド、少なくとも約800ヌクレオチド、少なくとも約900ヌクレオチド、少なくとも約1000ヌクレオチド、少なくとも約1200ヌクレオチド、少なくとも約1400ヌクレオチド、少なくとも約1500ヌクレオチド、少なくとも約1600ヌクレオチド、少なくとも約1800ヌクレオチド、少なくとも約2000ヌクレオチド、少なくとも約3000ヌクレオチド、少なくとも約4000ヌクレオチド、又は少なくとも約5000ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。

# 【0052】

[0065] いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 7 2 2 9から約1 ~ 約5000ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 7 2 2 9から約1 ~ 約20ヌクレオチド、約20 ~ 約50ヌクレオチド、約50 ~ 約100ヌクレオチド、約100 ~ 約150ヌクレオチド、約150 ~ 約200ヌクレオチド、約200 ~ 約250ヌクレオチド、約250 ~ 約300、約250 ~ 約300ヌクレオチド、約350 ~ 約400ヌクレオチド、約450 ~ 約500ヌクレオチド、約550 ~ 約600ヌクレオチド、約650 ~ 約700ヌクレオチド、約750 ~ 約800ヌクレオチド、約850 ~ 約900ヌクレオチド、約950 ~ 約1000ヌクレオチド、約1050 ~ 約1100ヌクレオチド、約1150 ~ 約1200ヌクレオチド、約1250 ~ 約1300ヌクレオチド、約1350 ~ 約1400ヌクレオチド、約1450 ~ 約1500ヌクレオチド、約1550 ~ 約1600ヌクレオチド、約1650 ~ 約1700ヌクレオチド、約1750 ~ 約1800ヌクレオチド、約1850 ~ 約1900ヌクレオチド、約1950 ~ 約2000ヌクレオチド、約2000 ~ 約3000ヌクレオチド、約3000 ~ 約4000ヌクレオチド、又は約4000 ~ 約5000ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 7 2 2 9から約1 ~ 約20ヌクレオチド、約20 ~ 約50ヌクレオチド、約50 ~ 約100ヌクレオチド、約100 ~ 約150ヌクレオチド、約150 ~ 約200ヌクレオチド、約200 ~ 約250ヌクレオチド、約250 ~ 約300、約250 ~ 約300ヌクレオチド、約350 ~ 約400ヌクレオチド、約450 ~ 約500ヌクレオチド、約550 ~ 約600ヌクレオチド、約650 ~ 約700ヌクレオチド、約750 ~ 約800ヌクレオチド、約850 ~ 約900ヌクレオチド、又は約950 ~ 約1000ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。

# 【0053】

【0066】 いくつかの態様では、A S Oは、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 7 2 2 9 から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、少なくとも約96ヌクレオチド、少なくとも約97ヌクレオチド、少なくとも約98ヌクレオチド、少なくとも約99ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約101ヌクレオチド、少なくとも約102ヌクレオチド、少なくとも約103ヌクレオチド、少なくとも約104ヌクレオチド、少なくとも約105ヌクレオチド、少なくとも約110ヌクレオチド、少なくとも約120ヌクレオチド、少なくとも約150ヌクレオチド、少なくとも約200ヌクレオチド、少なくとも約300ヌクレオチド、少なくとも約400ヌクレオチド、少なくとも約500ヌクレオチド、少なくとも約600ヌクレオチド、少なくとも約700ヌクレオチド、少なくとも約800ヌクレオチド、少なくとも約900ヌクレオチド、少なくとも約1000ヌクレオチド、少なくとも約1200ヌクレオチド、少なくとも約1400ヌクレオチド、少なくとも約1500ヌクレオチド、少なくとも約1600ヌクレオチド、少なくとも約1800ヌクレオチド、少なくとも約2000ヌクレオチド、少なくとも約3000ヌクレオチド、少なくとも約4000ヌクレオチド、又は少なくとも約5000ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。

10

#### 【0054】

【0067】 いくつかの態様では、A S Oは、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 7 2 9 4 から約1～約5000ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S Oは、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 7 2 9 4 から約1～約20ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約50～約100ヌクレオチド、約100～約150ヌクレオチド、約150～約200ヌクレオチド、約200～約250ヌクレオチド、約250～約300、約250～約300ヌクレオチド、約350～約400ヌクレオチド、約450～約500ヌクレオチド、約550～約600ヌクレオチド、約650～約700ヌクレオチド、約750～約800ヌクレオチド、約850～約900ヌクレオチド、約950～約1000ヌクレオチド、約1050～約1100ヌクレオチド、約1150～約1200ヌクレオチド、約1250～約1300ヌクレオチド、約1350～約1400ヌクレオチド、約1450～約1500ヌクレオチド、約1550～約1600ヌクレオチド、約1650～約1700ヌクレオチド、約1750～約1800ヌクレオチド、約1850～約1900ヌクレオチド、約1950～約2000ヌクレオチド、約2000～約3000ヌクレオチド、約3000～約4000ヌクレオチド、又は約4000～約5000ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、A S Oは、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 7 2 9 4 から約1～約20ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約50～約100ヌクレオチド、約100～約150ヌクレオチド、約150～約200ヌクレオチド、約200～約250ヌクレオチド、約250～約300、約250～約300ヌクレオチド、約350～約400ヌクレオチド、約450～約500ヌクレオチド、約550～約600ヌクレオチド、約650～約700ヌクレオチド、約750～約800ヌクレオチド、約850～約900ヌクレオチド、又は約950～約1000ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。

20

30

40

#### 【0055】

【0068】 いくつかの態様では、A S Oは、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 7 2 9 4 から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、少なくとも約96ヌクレオチド、少なくとも約97ヌクレオチド、少なくとも約98ヌクレオチド、少なくとも約99ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約101ヌクレオチド、少なくとも約102ヌクレオチド

50

、少なくとも約 1 0 3 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 4 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 5 ヌクレオチド、少なくとも約 1 1 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 2 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 5 0 ヌクレオチド、少なくとも約 2 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 3 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 4 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 5 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 6 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 7 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 8 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 9 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 2 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 4 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 5 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 6 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 8 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 2 0 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 3 0 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 4 0 0 0 ヌクレオチド、又は少なくとも約 5 0 0 0 ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。

10

# 【 0 0 5 6 】

[0069] いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 9 7 1 8 から約 1 ~ 約 5 0 0 0 ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 9 7 1 8 から約 1 ~ 約 2 0 ヌクレオチド、約 2 0 ~ 約 5 0 ヌクレオチド、約 5 0 ~ 約 1 0 0 ヌクレオチド、約 1 0 0 ~ 約 1 5 0 ヌクレオチド、約 1 5 0 ~ 約 2 0 0 ヌクレオチド、約 2 0 0 ~ 約 2 5 0 ヌクレオチド、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0 、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0 ヌクレオチド、約 3 5 0 ~ 約 4 0 0 ヌクレオチド、約 4 5 0 ~ 約 5 0 0 ヌクレオチド、約 5 5 0 ~ 約 6 0 0 ヌクレオチド、約 6 5 0 ~ 約 7 0 0 ヌクレオチド、約 7 5 0 ~ 約 8 0 0 ヌクレオチド、約 8 5 0 ~ 約 9 0 0 ヌクレオチド、約 9 5 0 ~ 約 1 0 0 0 ヌクレオチド、約 1 0 5 0 ~ 約 1 1 0 0 ヌクレオチド、約 1 1 5 0 ~ 約 1 2 0 0 ヌクレオチド、約 1 2 5 0 ~ 約 1 3 0 0 ヌクレオチド、約 1 3 5 0 ~ 約 1 4 0 0 ヌクレオチド、約 1 4 5 0 ~ 約 1 5 0 0 ヌクレオチド、約 1 5 5 0 ~ 約 1 6 0 0 ヌクレオチド、約 1 6 5 0 ~ 約 1 7 0 0 ヌクレオチド、約 1 7 5 0 ~ 約 1 8 0 0 ヌクレオチド、約 1 8 5 0 ~ 約 1 9 0 0 ヌクレオチド、約 1 9 5 0 ~ 約 2 0 0 0 ヌクレオチド、約 2 0 0 0 ~ 約 3 0 0 0 ヌクレオチド、約 3 0 0 0 ~ 約 4 0 0 0 ヌクレオチド、又は約 4 0 0 0 ~ 約 5 0 0 0 ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 9 7 1 8 から約 1 ~ 約 2 0 ヌクレオチド、約 2 0 ~ 約 5 0 ヌクレオチド、約 5 0 ~ 約 1 0 0 ヌクレオチド、約 1 0 0 ~ 約 1 5 0 ヌクレオチド、約 1 5 0 ~ 約 2 0 0 ヌクレオチド、約 2 0 0 ~ 約 2 5 0 ヌクレオチド、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0 、約 2 5 0 ~ 約 3 0 0 ヌクレオチド、約 3 5 0 ~ 約 4 0 0 ヌクレオチド、約 4 5 0 ~ 約 5 0 0 ヌクレオチド、約 5 5 0 ~ 約 6 0 0 ヌクレオチド、約 6 5 0 ~ 約 7 0 0 ヌクレオチド、約 7 5 0 ~ 約 8 0 0 ヌクレオチド、約 8 5 0 ~ 約 9 0 0 ヌクレオチド、又は約 9 5 0 ~ 約 1 0 0 0 ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。

20

30

# 【 0 0 5 7 】

[0070] いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 2 : 1 6 6 0 0 9 7 1 8 から少なくとも約 1 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 ヌクレオチド、少なくとも約 2 0 ヌクレオチド、少なくとも約 5 0 ヌクレオチド、少なくとも約 8 0 ヌクレオチド、少なくとも約 8 5 ヌクレオチド、少なくとも約 9 0 ヌクレオチド、少なくとも約 9 5 ヌクレオチド、少なくとも約 9 6 ヌクレオチド、少なくとも約 9 7 ヌクレオチド、少なくとも約 9 8 ヌクレオチド、少なくとも約 9 9 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 1 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 2 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 3 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 4 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 5 ヌクレオチド、少なくとも約 1 1 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 2 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 5 0 ヌクレオチド、少なくとも約 2 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 3 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 4 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 5 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 6 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 7 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 8 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 9 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 0 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 2 0 0 ヌクレオチド、少なくとも約 1 4 0 0 ヌクレオチド、少なくと

40

50

も約1500ヌクレオチド、少なくとも約1600ヌクレオチド、少なくとも約1800ヌクレオチド、少なくとも約2000ヌクレオチド、少なくとも約3000ヌクレオチド、少なくとも約4000ヌクレオチド、又は少なくとも約5000ヌクレオチド上流にある配列を標的にする。

【0058】

[0071] いくつかの態様では、本明細書に記載されるようなNIEは、図2に図示されるように、GRCh37/hg19:chr2:166,863,740とGRCh37/hg19:chr2:166,863,803の間に位置している。いくつかの態様では、NIEの5'端は、GRCh37/hg19:chr2:166,863,803に位置している。いくつかの態様では、NIEの3'端は、GRCh37/hg19:chr2:166,863,740に位置している。

10

【0059】

[0072] いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh37/hg19:chr2:166,863,803から約4～約300ヌクレオチド上流（又は5'）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh37/hg19:chr2:166,863,803から約1～約20ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約50～約100ヌクレオチド、約100～約150ヌクレオチド、約150～約200ヌクレオチド、約200～約250ヌクレオチド、約250～約300、約250～約300ヌクレオチド、約350～約400ヌクレオチド、約450～約500ヌクレオチド、約550～約600ヌクレオチド、約650～約700ヌクレオチド、約750～約800ヌクレオチド、約850～約900ヌクレオチド、約950～約1000ヌクレオチド、約1050～約1100ヌクレオチド、約1150～約1200ヌクレオチド、約1250～約1300ヌクレオチド、約1350～約1400ヌクレオチド、又は約1450～約1500ヌクレオチド上流（又は5'）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh37/hg19:chr2:166,863,803から300ヌクレオチドより多く上流にある配列を標的にし得る。いくつかの態様では、ASOは、GRCh37/hg19:chr2:166,863,740から約4～約300ヌクレオチド下流（又は3'）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、GRCh37/hg19:chr2:166,863,740から約1～約20ヌクレオチド、約20～約50ヌクレオチド、約50～約100ヌクレオチド、約100～約150ヌクレオチド、約150～約200ヌクレオチド、約200～約250ヌクレオチド、約250～約300ヌクレオチド、約350～約400ヌクレオチド、約450～約500ヌクレオチド、約550～約600ヌクレオチド、約650～約700ヌクレオチド、約750～約800ヌクレオチド、約850～約900ヌクレオチド、約950～約1000ヌクレオチド、約1050～約1100ヌクレオチド、約1150～約1200ヌクレオチド、約1250～約1300ヌクレオチド、約1350～約1400ヌクレオチド、又は約1450～約1500ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、GRCh37/hg19:chr2:166,863,740から300ヌクレオチドより多く下流にある配列を標的にする。

20

30

【0060】

[0073] いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh37/hg19:chr2:166,863,803から約4～約300ヌクレオチド上流（又は5'）にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、ゲノム部位：GRCh37/hg19:chr2:166,863,803から少なくとも約1ヌクレオチド、少なくとも約10ヌクレオチド、少なくとも約20ヌクレオチド、少なくとも約50ヌクレオチド、少なくとも約80ヌクレオチド、少なくとも約85ヌクレオチド、少なくとも約90ヌクレオチド、少なくとも約95ヌクレオチド、少なくとも約96ヌクレオチド、少なくとも約97ヌクレオチド、少なくとも約98ヌクレオチド、少なくとも約99ヌクレオチド、少なくとも約100ヌクレオチド、少なくとも約101ヌクレオチド、少なくとも約102ヌクレオチド、少なくとも約103ヌクレオチド、少なくとも約104ヌクレオチド、少な

40

50

20

## 50

レオチド、最大でも約 120ヌクレオチド、最大でも約 150ヌクレオチド、最大でも約 200ヌクレオチド、最大でも約 300ヌクレオチド、最大でも約 400ヌクレオチド、最大でも約 500ヌクレオチド、最大でも約 600ヌクレオチド、最大でも約 700ヌクレオチド、最大でも約 800ヌクレオチド、最大でも約 900ヌクレオチド、又は最大でも約 1000ヌクレオチド、最大でも約 1100ヌクレオチド、最大でも約 1200ヌクレオチド、最大でも約 1300ヌクレオチド、最大でも約 1400ヌクレオチド、又は最大でも約 1500ヌクレオチド下流にある配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、GRCh37/hg19:chr2:166,863,740から300ヌクレオチドより多く下流にある配列を標的にする。

#### 【0062】

[0075] 本明細書の実施例に記載されるように、SCN1A遺伝子(配列番号1)についてNIEを分析して、イントロン20(イントロン20プレmRNAをコードする配列番号6を参照のこと)の一部(本開示を通して、この部分をエクソン23又はエクソン20xと呼ぶ)の包含について観測した。いくつかの態様では、本明細書に開示されるASOは、SCN1Aゲノム配列より転写されるNIE含有プレmRNA(配列番号2)を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、イントロン20の一部を含んでなる、SCN1Aゲノム配列由来のNIE含有プレmRNA転写産物を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、エクソン23(又はエクソン20x)(配列番号4)を含んでなる、SCN1Aゲノム配列由来のNIE含有プレmRNA転写産物を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、配列番号2又は9のNIE含有プレmRNA転写産物を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、NIEを含んでなる、配列番号2又は9のNIE含有プレmRNA転写産物を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、エクソン23(又はエクソン20x)(配列番号7)を含んでなる、配列番号2のNIE含有プレmRNA転写産物を標的にする。いくつかの態様では、本明細書に開示されるASOは、SCN1AプレmRNA配列(配列番号2又は9)を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、NIE(配列番号7又は11)を含んでなるSCN1AプレmRNA配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、配列番号6、7、10、又は11のいずれか1つによるSCN1AプレmRNA配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、配列番号12~731のいずれか1つによる配列を有する。いくつかの態様では、ASOは、配列番号12~371のいずれか1つによる配列を有する。いくつかの態様では、ASOは、配列番号372~731のいずれか1つによる配列を有する。

#### 【0063】

[0076] いくつかの態様では、SCN1A NIE含有プレmRNA転写産物は、配列番号1又は8に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性がある遺伝子配列によってコードされる。いくつかの態様では、SCN1A NIEプレmRNA転写産物は、配列番号2~7及び9~11のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性がある配列を含む。

#### 【0064】

[0077] いくつかの態様では、SCN1A NIE含有プレmRNA転写産物(又はNMDエクソンmRNA)は、配列番号2、6、7、9、10、及び12に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性がある配列を含む。いくつかの態様では、SCN1A NIE含有プレmRNA転写産物(又はNMDエクソンmRNA)は、配列番号1及び8に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性がある配列によってコードされる。いくつかの態様では、NMDエクソンmRNAの標的化部分は、配列番号2、6、7、9、10、及び12の少なくとも8個の連続した核酸を含んでなる領域に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性がある配列を含む。

#### 【0065】

[0078] いくつかの態様では、ASOは、NIEの5'端から上流にある配列を標的にす

10

20

30

40

50

る。例えば、NIEの5'端から上流にある配列(例、ヒトSCN1A中のエクソン23(又はエクソン20x)、又はマウスSCN1A中のエクソン21x)を標的にするASOは、配列番号12~191又は372~551のいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性がある配列を含み得る。別の例では、NIEの5'端から上流にある配列(例、ヒトSCN1A中のエクソン23(又はエクソン20x)、又はマウスSCN1A中のエクソン21x)を標的にするASOは、配列番号12~191のいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性がある配列を含み得る。追加の例では、NIEの5'端から上流にある配列(例、ヒトSCN1A中のエクソン23(又はエクソン20x)、又はマウスSCN1A中のエクソン21x)を標的にするASOは、配列番号372~551のいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性がある配列を含み得る。

10

#### 【0066】

【0079】いくつかの態様では、ASOは、エクソン23を含んでなる、SCN1A NIE含有プレmRNA中のエクソン23(又はエクソン20x)を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、SCN1AプレmRNAのエクソン23の5'端から下流(又は3')にあるエクソン23配列を標的にする。いくつかの態様では、ASOは、SCN1AプレmRNAのエクソン20xの3'端から上流(又は5')にあるエクソン23配列を標的にする。

#### 【0067】

20

【0080】いくつかの態様では、ASOは、NIEの3'端から下流にある配列を標的にする。例えば、NIEの3'端から下流にある配列(例、ヒトSCN1A中のエクソン23(又はエクソン20x)、又はマウスSCN1A中のエクソン21x)を標的にするASOは、配列番号192~371又は552~731のいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性がある配列を含み得る。別の例では、NIEの3'端から下流にある配列(例、ヒトSCN1A中のエクソン23(又はエクソン20x)、又はマウスSCN1A中のエクソン21x)を標的にするASOは、配列番号192~371のいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性がある配列を含み得る。追加の例では、NIEの3'端から下流にある配列(例、ヒトSCN1A中のエクソン23(又はエクソン20x)、又はマウスSCN1A中のエクソン21x)を標的にするASOは、配列番号552~731のいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性がある配列を含み得る。

30

#### 【0068】

【0081】いくつかの態様では、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分は、イントロン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25(イントロン番号付けは、NM\_006920でのmRNA配列に対応する)中にある。いくつかの態様では、NIEプレmRNAの標的化部分へのASOのハイブリダイゼーションがイントロン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25の内部にあるNIEの少なくとも1つのエクソンスキッピングを生じて、引き続きSCN1Aタンパク質産生を増加させる。いくつかの態様では、NIEプレmRNAの標的化部分へのASOのハイブリダイゼーションがイントロン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25の内部にあるNIEの少なくとも1つのエクソンスキッピングを阻害するか又は妨害して、引き続きSCN1Aタンパク質産生を減少させる。いくつかの態様では、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分は、イントロン20中にある。当業者は、本明細書に提供されるイントロン配列に基づくか又はNM\_006920、NM\_001202435、NM\_001165964、又はNM\_001165963でのmRNA配列に関連し

40

50

て提供される番号を使用して、どのアイソフォームにおいても対応するイントロン番号を決定することができる。当業者はまた、本明細書に提供されるイントロン配列に基づくか又はNM\_\_006920、NM\_\_001202435、NM\_\_001165964、又はNM\_\_001165963でのmRNA配列に関連して提供される番号を使用して、本発明の方法を使用して標的化するための、どのSCN1Aアイソフォームにおいても横にあるエクソンの配列を決定することができる。

#### 【0069】

[0082] いくつかの態様では、本開示の方法及び組成物は、SCN1A NIE含有ブレムRNAのシュードエクソンのエクソンスキッピングを誘導するか又は阻害することによってSCN1Aの発現を調節する（例えば、増加させるか又は減少させる）ために使用される。いくつかの態様では、シュードエクソンは、イントロン1～イントロン25のいずれの内部にもある配列である。いくつかの態様では、シュードエクソンは、イントロン2、4、6、13、14、15、16、17、18、20、21、22、23、24、及び25のいずれの内部にもある配列である。いくつかの態様では、シュードエクソンは、イントロン15、イントロン18、及びイントロン19いずれの内部にもある配列である。いくつかの態様では、シュードエクソンは、どのSCN1Aイントロンでもその一部でもあり得る。いくつかの態様では、シュードエクソンは、イントロン20の内部にある。本明細書において使用されるSCN1Aイントロン番号付けは、NM\_\_006920でのRNA配列に対応する。このイントロン番号付けは、異なるSCN1Aアイソフォーム配列に関連して変更し得ると理解される。

#### 【0070】

##### SCN1Aタンパク質

[0083] SCN1A遺伝子は、SCN1A（ナトリウムチャネル、電位依存性、I型、サブユニット）タンパク質（これは、電位依存性ナトリウムチャネルNav1.1のサブユニットとしても言及され得る）をコードし得る。また上記に記載されるように、DSにおけるSCN1A突然変異は、このタンパク質全体に広がっている。この遺伝子全体で100より多い新規突然変異が同定されていて、より衰弱化させるものが新たに生じている。これらは、短縮化（47%）、ミスセンス（43%）、欠失（3%）、及びスプライス部位変異（7%）を含む。SCN1A突然変異を担っている被験者の百分率は、33%と100%の間で変動する。大多数の突然変異（88%）は、新規の変化である。

#### 【0071】

[0084] いくつかの態様では、本明細書に記載される方法は、機能的SCN1Aタンパク質の産生を調節する（例えば、増加させるか又は減少させる）ために使用される。本明細書に使用されるように、「機能的」という用語は、治療される病態（例、ドラベ症候群；全般性てんかん熱性痙攣プラス、2型；家族性熱性痙攣、3A；自閉症；てんかん性脳症、早期乳児、13；洞不全症候群1；アルツハイマー病；又はSUDEP）のどの1以上の症状も消失させるのに必要であるSCN1Aタンパク質の活性又は機能の量に言及する。いくつかの態様では、本方法は、部分機能的SCN1Aタンパク質の産生を増加させるために使用される。本明細書に使用されるように、「部分機能的」という用語は、疾患又は病態のどの1以上の症状も消失させるか又は予防するのに必要である活性又は機能の量未満である、SCN1Aタンパク質の活性又は機能のあらゆる量に言及する。いくつかの態様では、部分機能的なタンパク質又はRNAは、完全機能的なタンパク質又はRNAに比べて、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%少ない活性を有するものである。

#### 【0072】

[0085] いくつかの態様では、本方法は、SCN1Aタンパク質をコードするNIE含有ブレムRNAを有している被験者の細胞によるSCN1Aタンパク質の発現を増加させる方法であって、ここで該被験者は、SCN1Aタンパク質の活性の不足量によって引き

起こされるドラベ症候群を有して、ここでその S C N 1 A タンパク質の不足量は、S C N 1 A タンパク質のハプロ不全によって引き起こされる。このような態様では、該被験者は、機能的 S C N 1 A タンパク質をコードする第 1 対立遺伝子と、S C N 1 A タンパク質が産生されない第 2 対立遺伝子を有する。別のこのような態様では、該被験者は、機能的 S C N 1 A タンパク質をコードする第 1 対立遺伝子と、非機能的 S C N 1 A タンパク質をコードする第 2 対立遺伝子を有する。別のこのような態様では、該被験者は、機能的 S C N 1 A タンパク質をコードする第 1 対立遺伝子と、部分機能的 S C N 1 A タンパク質をコードする第 2 対立遺伝子を有する。これらの態様のいずれにおいても、当該アンチセンスオリゴマーは、第 2 対立遺伝子より転写される N I E 含有プレ m R N A の標的化部分へ結合して、それによってプレ m R N A 由来のシュードエクソンのエクソンスキッピングを誘導して、機能的 S C N 1 A タンパク質をコードする成熟 m R N A のレベルの増加と、該被験者の該細胞における S C N 1 A タンパク質の発現の増加を引き起こす。

10

#### 【 0 0 7 3 】

[0086] 関連した態様では、本方法は、A S O を使用して、タンパク質又は機能的 R N A の発現を増加させる方法である。いくつかの態様では、A S O を使用して、S C N 1 A タンパク質をコードする N I E 含有プレ m R N A を有している被験者の細胞における S C N 1 A タンパク質の発現を増加させるが、ここで該被験者は、S C N 1 A タンパク質の量又は機能における欠損症、例えば、ドラベ症候群 ( D S ) ( S M E I としても知られている) ; 乳児重症ミオクロニーてんかん ( S M E I ) - 辺縁型 ( S M E B ) ; 熱性痙攣 ( F S ) ; 全般性てんかん熱性痙攣プラス ( G E F S + ) ; てんかん性脳症、早期乳児、1 3 ; 潜在性全般性てんかん ; 潜在性焦点性てんかん ; ミオクロニー失立発作てんかん ; レノックス・ガスト症候群 ; ウェスト症候群 ; 特発性痙攣 ; 早期ミオクロニー脳症 ; 進行性ミオクロニーてんかん ; 小児交互性片麻痺 ; 分類不能てんかん性脳症 ; てんかんにおける予期せぬ突然死 ( S U D E P ) ; 洞不全症候群 1 ; 早期乳児 S C N 1 A 脳症 ; 早期乳児てんかん性脳症 ( E I E E ) ; 又は自閉症を有している。いくつかの態様では、A S O を使用して、被験者の細胞における S C N 1 A タンパク質の発現を増加させるが、ここで該被験者は、S C N 8 A タンパク質の量又は機能における欠損症、例えば、てんかん性脳症、早期乳児、1 3 を有している。いくつかの態様では、A S O を使用して、被験者の細胞における S C N 1 A タンパク質の発現を増加させるが、ここで該被験者は、S C N 5 A タンパク質の量又は機能における欠損症、例えば洞不全症候群 1 を有している。

20

30

#### 【 0 0 7 4 】

[0087] いくつかの態様では、疾患又は病態の原因であるタンパク質をコードする N I E 含有プレ m R N A 転写産物は、本明細書に記載される A S O の標的になる。いくつかの態様では、該疾患の原因ではないタンパク質をコードする N I E 含有プレ m R N A 転写産物が A S O の標的になる。例えば、特別な経路における第 1 タンパク質の突然変異又は欠損の結果である疾患が、第 2 タンパク質をコードする N I E 含有プレ m R N A を標的にして第 2 タンパク質の産生を増加させることによって、改善される場合がある。いくつかの態様では、第 2 タンパク質の機能は、第 1 タンパク質 ( 疾患又は病態の原因である ) の突然変異又は欠損を相殺することができる。

#### 【 0 0 7 5 】

[0088] いくつかの態様では、被験者は :

- ( a ) 第 1 の突然変異対立遺伝子 [ それにより :
- ( i ) S C N 1 A タンパク質は、野生型対立遺伝子からの産生に比較して低下したレベルで産生される、
- ( i i ) S C N 1 A タンパク質は、同等の野生型タンパク質に比較して低下した機能を有する形態で産生される、又は
- ( i i i ) S C N 1 A タンパク質も機能的 R N A も、産生されない ]、及び
- ( b ) 第 2 の突然変異対立遺伝子 [ それにより :
- ( i ) S C N 1 A タンパク質は、野生型対立遺伝子からの産生に比較して低下したレベルで産生される、

40

50

( i i ) S C N 1 A タンパク質は、同等の野生型タンパク質に比較して低下した機能を有する形態で産生される、又は

( i i i ) S C N 1 A タンパク質は、産生されない]を有して、ここでN I E 含有プレm R N A は、第 1 対立遺伝子及び/又は第 2 対立遺伝子より転写される。これらの態様では、A S O は、第 1 対立遺伝子又は第 2 対立遺伝子より転写されるN I E 含有プレm R N A の標的化部分へ結合して、それによってN I E 含有プレm R N A 由来のシュードエクソンのエクソンスキッピングを誘導して、S C N 1 A タンパク質をコードするm R N A のレベルの増加と、該被験者の該細胞における標的タンパク質又は機能的R N A の発現の増加を引き起こす。これらの態様では、N I E 含有プレm R N A 由来のシュードエクソンのエクソンスキッピングより生じる、発現レベルの増加を有している標的タンパク質又は機能的R N A は、同等の野生型タンパク質に比較して低下した機能を有している形態(部分機能的)、又は同等の野生型タンパク質に比較して完全な機能を有している形態(完全機能的)のいずれかである。

10

【 0 0 7 6 】

[0089] いくつかの態様では、S C N 1 A タンパク質をコードするm R N A のレベルは、対照細胞(例、アンチセンスオリゴマーで処理されない細胞、又はS C N 1 A N I E 含有プレm R N A の標的化部分へ結合しないアンチセンスオリゴマーで処理される細胞)において産生される、S C N 1 A タンパク質をコードするm R N A の量に比較されるとき、1 . 1 ~ 1 0 倍増加する。

【 0 0 7 7 】

20

[0090] いくつかの態様では、本開示の方法を使用して治療される被験者が、一方の対立遺伝子より部分機能的S C N 1 A タンパク質を発現して、ここで部分機能的S C N 1 A タンパク質は、フレームシフト突然変異、ナンセンス突然変異、ミスセンス突然変異、又は部分的な遺伝子欠失によって引き起こされる。いくつかの態様では、本発明の方法を使用して治療される被験者が、一方の対立遺伝子より非機能的S C N 1 A タンパク質を発現して、ここで非機能的S C N 1 A タンパク質は、一方の対立遺伝子における、フレームシフト突然変異、ナンセンス突然変異、ミスセンス突然変異、部分的な遺伝子欠失によって引き起こされる。いくつかの態様では、本発明の方法を使用して治療される被験者が、一方の対立遺伝子において、S C N 1 A 全遺伝子の欠失を有する。

【 0 0 7 8 】

30

[0091] いくつかの態様では、本方法は、S C N 1 A タンパク質をコードするN I E 含有プレm R N A を有している被験者の細胞によるS C N 1 A タンパク質の発現を減少させる方法であって、ここで該被験者は、N a v 1 . 1 において機能獲得変異を有する。このような態様では、該被験者は、S C N 1 A タンパク質が上昇量で産生される対立遺伝子、又はN a v 1 . 1 の増加した活性を該細胞において誘導する突然変異S C N 1 A をコードする対立遺伝子を有する。いくつかの態様では、N a v 1 . 1 の増加した活性を特徴付けるのは、突然変異N a v 1 . 1 チャンネルによって媒介される長期的又はほぼ永続的なナトリウム電流、迅速な不活性化の遅延、定常状態の不活性化における正シフト、反復刺激の間のより高いチャンネル利用度、非不活性化脱分極誘発性の持続的なナトリウム電流の増加、不活性化へのエントリーの遅延、迅速不活性化からの回復の加速化、及び/又は低温でのインキュベーション又は相互作用するタンパク質の同時発現による、フォールディング障害の救出である。これら態様のいずれにおいても、当該アンチセンスオリゴマーは、第 2 対立遺伝子より転写されるN I E 含有プレm R N A の標的化部分へ結合して、それによってプレm R N A 由来のシュードエクソンのエクソンスキッピングを阻害するか又は妨害して、機能的S C N 1 A タンパク質をコードする成熟m R N A のレベルの減少と、該被験者の該細胞におけるS C N 1 A タンパク質の発現の減少を引き起こす。

40

【 0 0 7 9 】

[0092] 関連した態様では、本方法は、A S O を使用して、タンパク質又は機能的R N A の発現を減少させる方法である。いくつかの態様では、A S O を使用して、S C N 1 A タンパク質をコードするN I E 含有プレm R N A を有している被験者の細胞におけるS C

50

N 1 A タンパク質の発現を減少させる。いくつかの態様では、該被験者は、N a v 1 . 1 における機能獲得変異（例、偏頭痛）を有する。いくつかの態様では、A S O を使用して、被験者の細胞における S C N 1 A タンパク質の発現を減少させるが、該被験者は、N a v 1 . 1 における機能獲得変異（例、家族性片麻痺性偏頭痛、3）を有する。

【0080】

[0093] いくつかの態様では、S C N 1 A タンパク質をコードする m R N A のレベルは、対照細胞（例、アンチセンスオリゴマーで処理されない細胞、又は S C N 1 A N I E 含有プレ m R N A の標的化部分へ結合しないアンチセンスオリゴマーで処理される細胞）において産生され、S C N 1 A タンパク質をコードする m R N A の量に比較されるとき、1 . 1 ~ 1 0 倍減少する。

10

【0081】

[0094] いくつかの態様では、本開示の方法を使用して治療される被験者が、一方の対立遺伝子より突然変異 S C N 1 A タンパク質を発現して、ここで突然変異 S C N 1 A タンパク質は、フレームシフト突然変異、ナンセンス突然変異、ミスセンス突然変異、又は部分的な遺伝子欠失によって引き起こされ、そしてここで突然変異 S C N 1 A タンパク質は、N a v 1 . 1 の上昇した活性レベルを引き起こす。いくつかの態様では、本開示の方法を使用して治療される被験者が、一方の対立遺伝子より、フレームシフト突然変異、ナンセンス突然変異、ミスセンス突然変異、又は部分的な遺伝子欠失によって、上昇量の S C N 1 A タンパク質を発現する。

【0082】

20

[0095] 本発明の態様（複数）では、被験者が S C N 1 A 遺伝子中に突然変異を有する可能性がある。S C N 1 A 中の突然変異は、前記遺伝子全体に広がる可能性がある。S C N 1 A タンパク質は、4 個のドメインからなり得る。前記 S C N 1 A ドメインは、膜貫通セグメントを有し得る。前記 S C N 1 A タンパク質における突然変異は、前記タンパク質全体で生じる場合がある。前記 S C N 1 A タンパク質は、少なくとも 2 つのアイソフォームからなり得る。S C N 1 A における突然変異は、R 9 3 1 C、R 9 4 6 C、M 9 3 4 I、R 1 6 4 8 C、又は R 1 6 4 8 H を含み得る。いくつかの事例では、S C N 1 A タンパク質の C 末端に突然変異が観測される場合がある。前記 S C N 1 A タンパク質の最初の 3 個のドメインのセグメント 5 とセグメント 6 の間のループにも S C N 1 A タンパク質中の突然変異が見出される場合がある。いくつかの事例では、S C N 1 A タンパク質の N 末端に突然変異が観測される場合がある。S C N 1 A 内にある例示の突然変異には、限定されないが、R 2 2 2 X、R 7 1 2 X、I 2 2 7 S、R 1 8 9 2 X、W 9 5 2 X、R 1 2 4 5 X、R 1 4 0 7 X、W 1 4 3 4 R、c . 4 3 3 8 + 1 G > A、S 1 5 1 6 X、L 1 6 7 0 f s X 1 6 7 8、又は K 1 8 4 6 f s X 1 8 5 6 が含まれる。本発明で標的化され得る突然変異がイオンチャネルの細孔をコードする場合もある。

30

【0083】

[0096] いくつかの態様では、本明細書に記載される方法と組成物は、D S を治療するために使用することができる。他の態様では、本明細書に記載される方法と組成物は、乳児重症ミオクロニーてんかん（S M E I）を治療するために使用することができる。他の態様では、本明細書に記載される方法と組成物は、辺縁型ドラベ症候群；全般性てんかん熱性痙攣プラス、2 型；家族性熱性痙攣、3 A；家族性片麻痺性偏頭痛、3；自閉症；てんかん性脳症、早期乳児、1 3；洞不全症候群 1；アルツハイマー病又は S U D E P を治療するために使用することができる。本明細書に記載される方法と組成物は、辺縁型 S M E I を治療するためにも使用することができる。加えて、本明細書に記載される方法と組成物は、熱性痙攣プラス（G E F S +）を伴う全般性てんかんを治療するために使用することができる。G E F S + は、S C N 1 B 又は G A B R G 2 のような、てんかん関連のイオンチャネルサブユニット中の突然変異に関連している場合がある。本明細書に記載される方法と組成物は、ナトリウムチャネルパチーを治療するために使用することもできる。ナトリウムチャネルパチーは、S C N 1 A 中の突然変異に関連している場合がある。ナトリウムチャネルパチーはまた、サブユニットの S C N 1 B のような、S C N 1 A のサ

40

50

ブユニットに関連している場合がある。いくつかの事例では、SCN1A突然変異に関連した追加の疾患も、本開示で治療し得る。SCN1A突然変異に関連した、関連のSCN1A疾患には、限定されないが、先天性非定型ミオトニー、高カリウム性周期性四肢麻痺、及び先天性パラミオトニアが含まれる。

【0084】

[0097] いくつかの態様では、本明細書に記載される方法と組成物を使用して、当該技術分野で知られていて上記の参考文献において（例えば、Hamdan, et al., 2009, Mulley, et al., 2005 によって）記載されているSCN1A突然変異を有している被験者を治療することができる。いくつかの態様では、この突然変異は、SCN1Aのイントロン又はエクソンの内部にある。

10

【0085】

エクソン包含

[0098] 本明細書に使用されるように、「NIE含有プレmRNA」は、少なくとも1つのシュードエクソンを含有するプレmRNA転写産物である。選択的又は異常なスプライシングは、少なくとも1つのシュードエクソンの成熟mRNA転写産物中の包含を生じる可能性がある。「成熟mRNA」と「完全にスプライスされたmRNA」という用語は、本明細書において、完全にプロセシングされたmRNAについて記載するために交換可能的使用される。少なくとも1つのシュードエクソンの包含は、非産生性mRNAになり得て、成熟mRNAのNMDにつながる可能性がある。NIE含有成熟mRNAは、時々異常なタンパク質発現をもたらす場合がある。

20

【0086】

[0099] いくつかの態様では、包含されたシュードエクソンは、標的タンパク質をコードする遺伝子より細胞において転写されるNIE含有プレmRNAの集団において最も豊富なシュードエクソンである。いくつかの態様では、包含されたシュードエクソンは、標的タンパク質をコードする遺伝子より細胞において転写されるNIE含有プレmRNAの集団において最も豊富なシュードエクソンであって、ここでNIE含有プレmRNAの集団は、2個以上の包含されたシュードエクソンを含む。いくつかの態様では、標的タンパク質をコードするNIE含有プレmRNAの集団において最も豊富なシュードエクソンを標的にするアンチセンスオリゴマーが該集団中の1個又は2個以上のシュードエクソン（アンチセンスオリゴマーが標的にするか又は結合するシュードエクソンが含まれる）のエクソンスキッピングを誘導する。態様（複数）において、標的化領域は、SCN1Aタンパク質をコードするNIE含有プレmRNAにおいて最も豊富なシュードエクソンであるシュードエクソン中にある。

30

【0087】

[0100] エクソン包含の度合いは、エクソン包含%（例えば、所与のシュードエクソンが包含されている転写産物の百分率）として表すことができる。簡潔には、エクソン包含のあるRNA転写産物の量の平均+エクソン排除のあるRNA転写産物の量の平均の合計に対する、当該エクソン包含のあるRNA転写産物の量の百分率としてエクソン包含%を計算することができる。

【0088】

40

[0101] いくつかの態様では、包含されたシュードエクソンが、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、又は少なくとも約50%の包含の決定に基づいて包含されたシュードエクソンとして同定されるエクソンである。態様（複数）では、包含されたシュードエクソンが、約5%～約100%、約5%～約95%、約5%～約90%、約5%～約85%、約5%～約80%、約5%～約75%、約5%～約70%、約5%～約65%、約5%～約60%、約5%～約55%、約5%～約50%、約5%～約45%、約5%～約40%、約5%～約35%、約5%～約30%、約5%～約25%、約5%～約20%、約5%～約15%、約10%～約100%、約10%～約95%、約10%～約90%、約10%～約85%、約

50

10%～約80%、約10%～約75%、約10%～約70%、約10%～約65%、約10%～約60%、約10%～約55%、約10%～約50%、約10%～約45%、約10%～約40%、約10%～約35%、約10%～約30%、約10%～約25%、約10%～約20%、約15%～約100%、約15%～約95%、約15%～約90%、約15%～約85%、約15%～約80%、約15%～約75%、約15%～約70%、約15%～約65%、約15%～約60%、約15%～約55%、約15%～約50%、約15%～約45%、約15%～約40%、約15%～約35%、約15%～約30%、約15%～約25%、約20%～約100%、約20%～約95%、約20%～約90%、約20%～約85%、約20%～約80%、約20%～約75%、約20%～約70%、約20%～約65%、約20%～約60%、約20%～約55%、約20%～約50%、約20%～約45%、約20%～約40%、約20%～約35%、約20%～約30%、約25%～約100%、約25%～約95%、約25%～約90%、約25%～約85%、約25%～約80%、約25%～約75%、約25%～約70%、約25%～約65%、約25%～約60%、約25%～約55%、約25%～約50%、約25%～約45%、約25%～約40%、又は約25%～約35%の包含の決定に基づいて包含されたシュードエクソンとして同定されるエクソンである。ENCODEデータ(例えば、Tilgner, et al., 2012, 「Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs (細胞内RNA画分のディープシーケンシングは、スプライシングがヒトゲノムにおいて圧倒的に同時転写性であるが、lncRNAに対しては非効率であることを示す)」Genome Research 22(9): 1616-25 によって記載される)を使用して、エクソン包含を同定するのに役立てることができる。

#### 【0089】

[00102] いくつかの態様では、SCN1AプレmRNA転写産物の標的化部分に相補的であるASOと細胞を接触させることが、産生されるSCN1Aタンパク質の量において、ASOの非存在/処理の非存在時の細胞によって産生されるタンパク質の量に比較して、少なくとも10、20、30、40、50、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、500、又は1000%の増加を生じる。いくつかの態様では、アンチセンスオリゴマーが接触する細胞によって産生されるSCN1Aタンパク質の全量は、対照化合物によって産生される標的タンパク質の量に比較して、約1.1～約10倍、約1.5～約10倍、約2～約10倍、約3～約10倍、約4～約10倍、約1.1～約5倍、約1.1～約6倍、約1.1～約7倍、約1.1～約8倍、約1.1～約9倍、約2～約5倍、約2～約6倍、約2～約7倍、約2～約8倍、約2～約9倍、約3～約6倍、約3～約7倍、約3～約8倍、約3～約9倍、約4～約7倍、約4～約8倍、約4～約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、又は少なくとも約10倍増加する。対照化合物は、例えば、プレmRNAの標的化部分へ相補的でないオリゴヌクレオチドであり得る。

#### 【0090】

[00103] いくつかの態様では、SCN1AプレmRNA転写産物の標的化部分に相補的であるASOと細胞を接触させることが、産生されるSCN1Aタンパク質の量において、ASOの非存在/処理の非存在時の細胞によって産生されるタンパク質の量に比較して、少なくとも10、20、30、40、50、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、500、又は1000%の減少を生じる。いくつかの態様では、アンチセンスオリゴマーが接触する細胞によって産生されるSCN1Aタンパク質の全量は、対照化合物によって産生される標的タンパク質の量に比較して、約1.1～約10倍、約1.5～約10倍、約2～約10倍、約3～約10倍、約4～約10倍、約1.1～約5倍、約1.1～約6倍、約1.1～約7倍、約1.1～約8倍、約1.1～約9倍、約2～約5倍、約2～約6倍、約2～約7倍、約2～約8倍、約2～約9倍、約3～約6倍、約3～約7倍、約3～約8倍、約3～約9倍、約4～約7倍、約

4 ～ 約 8 倍、約 4 ～ 約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3 . 5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、又は少なくとも約 1 0 倍減少する。対照化合物は、例えば、プレ m R N A の標的化部分へ相補的でないオリゴヌクレオチドであり得る。

#### 【 0 0 9 1 】

【 00104 】 いくつかの態様では、S C N 1 A プレ m R N A 転写産物の標的化部分に相補的である A S O と細胞を接触させることが、標的タンパク質をコードする成熟 m R N A が含まれる、S C N 1 A をコードする m R N A の量の増加を生じる。いくつかの態様では、S C N 1 A タンパク質をコードする m R N A 、又は S C N 1 A タンパク質をコードする成熟 m R N A の量は、A S O の非存在 / 処理の非存在時の細胞によって産生されるタンパク質の量に比較して、少なくとも 1 0 、2 0 、3 0 、4 0 、5 0 、6 0 、8 0 、1 0 0 、1 5 0 、2 0 0 、2 5 0 、3 0 0 、3 5 0 、4 0 0 、4 5 0 、5 0 0 、又は 1 0 0 0 % 増加する。いくつかの態様では、アンチセンスオリゴマーが接触した細胞において産生される、S C N 1 A タンパク質をコードする m R N A 、又は S C N 1 A タンパク質をコードする成熟 m R N A の全量は、未処理細胞（例えば、未処理細胞、又は対照化合物で処理された細胞）において産生される成熟 R N A の量に比較して、約 1 . 1 ～ 約 1 0 倍、約 1 . 5 ～ 約 1 0 倍、約 2 ～ 約 1 0 倍、約 3 ～ 約 1 0 倍、約 4 ～ 約 1 0 倍、約 1 . 1 ～ 約 5 倍、約 1 . 1 ～ 約 6 倍、約 1 . 1 ～ 約 7 倍、約 1 . 1 ～ 約 8 倍、約 1 . 1 ～ 約 9 倍、約 2 ～ 約 5 倍、約 2 ～ 約 6 倍、約 2 ～ 約 7 倍、約 2 ～ 約 8 倍、約 2 ～ 約 9 倍、約 3 ～ 約 6 倍、約 3 ～ 約 7 倍、約 3 ～ 約 8 倍、約 3 ～ 約 9 倍、約 4 ～ 約 7 倍、約 4 ～ 約 8 倍、約 4 ～ 約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3 . 5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、又は少なくとも約 1 0 倍増加する。対照化合物は、例えば、S C N 1 A N I E 含有プレ m R N A の標的化部分へ相補的でないオリゴヌクレオチドであり得る。

#### 【 0 0 9 2 】

【 00105 】 いくつかの態様では、S C N 1 A プレ m R N A 転写産物の標的化部分に相補的である A S O と細胞を接触させることが、標的タンパク質をコードする成熟 m R N A が含まれる、S C N 1 A をコードする m R N A の量の減少を生じる。いくつかの態様では、S C N 1 A タンパク質をコードする m R N A 、又は S C N 1 A タンパク質をコードする成熟 m R N A の量は、A S O の非存在 / 処理の非存在時の細胞によって産生されるタンパク質の量に比較して、少なくとも 1 0 、2 0 、3 0 、4 0 、5 0 、6 0 、8 0 、1 0 0 、1 5 0 、2 0 0 、2 5 0 、3 0 0 、3 5 0 、4 0 0 、4 5 0 、5 0 0 、又は 1 0 0 0 % 減少する。いくつかの態様では、アンチセンスオリゴマーが接触した細胞において産生される、S C N 1 A タンパク質をコードする m R N A 、又は S C N 1 A タンパク質をコードする成熟 m R N A の全量は、未処理細胞（例えば、未処理細胞、又は対照化合物で処理された細胞）において産生される成熟 R N A の量に比較して、約 1 . 1 ～ 約 1 0 倍、約 1 . 5 ～ 約 1 0 倍、約 2 ～ 約 1 0 倍、約 3 ～ 約 1 0 倍、約 4 ～ 約 1 0 倍、約 1 . 1 ～ 約 5 倍、約 1 . 1 ～ 約 6 倍、約 1 . 1 ～ 約 7 倍、約 1 . 1 ～ 約 8 倍、約 1 . 1 ～ 約 9 倍、約 2 ～ 約 5 倍、約 2 ～ 約 6 倍、約 2 ～ 約 7 倍、約 2 ～ 約 8 倍、約 2 ～ 約 9 倍、約 3 ～ 約 6 倍、約 3 ～ 約 7 倍、約 3 ～ 約 8 倍、約 3 ～ 約 9 倍、約 4 ～ 約 7 倍、約 4 ～ 約 8 倍、約 4 ～ 約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3 . 5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、又は少なくとも約 1 0 倍減少する。対照化合物は、例えば、S C N 1 A N I E 含有プレ m R N A の標的化部分へ相補的でないオリゴヌクレオチドであり得る。

#### 【 0 0 9 3 】

【 00106 】 N I E は、あらゆる長さであり得る。いくつかの態様では、N I E は、イントロンの全長配列を含み、この場合、それは、イントロン保持と呼ぶことができる。いくつかの態様では、N I E は、そのイントロンの一部であり得る。いくつかの態様では、N I E は、5 ' s s 配列が含まれるイントロンの 5 ' 端部分であり得る。いくつかの態様では、N I E は、3 ' s s 配列が含まれるイントロンの 3 ' 端部分であり得る。いくつかの態様

10

20

30

40

50

では、N I E は、5' s s 配列を包含しないイントロン内の部分であり得る。いくつかの態様では、N I E は、3' s s 配列を包含しないイントロン内の部分であり得る。いくつかの態様では、N I E は、5' s s 配列も 3' s s 配列も包含しないイントロン内の部分であり得る。いくつかの態様では、N I E は、5ヌクレオチド～10ヌクレオチドの長さ、10ヌクレオチド～15ヌクレオチドの長さ、15ヌクレオチド～20ヌクレオチドの長さ、20ヌクレオチド～25ヌクレオチドの長さ、25ヌクレオチド～30ヌクレオチドの長さ、30ヌクレオチド～35ヌクレオチドの長さ、35ヌクレオチド～40ヌクレオチドの長さ、40ヌクレオチド～45ヌクレオチドの長さ、45ヌクレオチド～50ヌクレオチドの長さ、50ヌクレオチド～55ヌクレオチドの長さ、55ヌクレオチド～60ヌクレオチドの長さ、60ヌクレオチド～65ヌクレオチドの長さ、65ヌクレオチド～70ヌクレオチドの長さ、70ヌクレオチド～75ヌクレオチドの長さ、75ヌクレオチド～80ヌクレオチドの長さ、80ヌクレオチド～85ヌクレオチドの長さ、85ヌクレオチド～90ヌクレオチドの長さ、90ヌクレオチド～95ヌクレオチドの長さ、又は95ヌクレオチド～100ヌクレオチドの長さであり得る。いくつかの態様では、N I E は、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチドの長さ、少なくとも90ヌクレオチド、又は少なくとも100ヌクレオチドの長さであり得る。いくつかの態様では、N I E は、100～200ヌクレオチドの長さ、200～300ヌクレオチドの長さ、300～400ヌクレオチドの長さ、400～500ヌクレオチドの長さ、500～600ヌクレオチドの長さ、600～700ヌクレオチドの長さ、700～800ヌクレオチドの長さ、800～900ヌクレオチドの長さ、900～1,000ヌクレオチドの長さであり得る。いくつかの態様では、N I E は、1,000ヌクレオチドの長さより長い場合がある。

#### 【00094】

【00107】 シュードエクソンの包含がフレームシフトをもたらし得るので、未成熟終止コドン (P I C) の成熟 m R N A 転写産物中の導入は、この転写産物を N M D の標的とする。N I E を含有している成熟 m R N A 転写産物は、タンパク質発現をもたらさない非産生性 m R N A 転写産物であり得る。P I C は、N I E の下流のどの位置にも存在し得る。いくつかの態様では、P I C は、N I E の下流にあるどのエクソン中にも存在し得る。いくつかの態様では、P I C は、N I E の内部に存在し得る。例えば、S C N 1 A 遺伝子によってコードされる m R N A 転写産物にエクソン 20 x が包含されると、m R N A 転写産物中に P I C を誘導する可能性がある (例えば、m R N A 転写産物のエクソン 21 中の P I C)。

#### 【00095】

##### 治療薬剤

【00108】 本開示の様々な態様では、治療薬剤を含んでなる組成物と方法が S C N 1 A のタンパク質発現レベルを調節するために提供される。いくつかの態様では、本発明で提供されるのは、S C N A 1 プレ m R N A の選択的スプライシングを調節するための組成物と方法である。いくつかの態様では、本発明で提供されるのは、S C N 1 A プレ m R N A のスプライシングにおいてエクソンスキッピングを誘導する (例えば、S C N 1 A プレ m R N A のスプライシングの間にシュードエクソンのスキッピングを誘導する) ための組成物と方法である。他の態様では、そのタンパク質発現レベルを減少させるために、治療薬剤を使用してエクソンの包含を誘導し得る。

#### 【00096】

【00109】 ある態様では、本明細書に開示される治療薬剤が、低分子、ポリペプチド、又はポリ核酸ポリマーである。いくつかの事例において、治療薬剤は、低分子である。いくつかの事例において、治療薬剤は、ポリペプチドである。いくつかの事例において、治療薬剤は、ポリ核酸ポリマーである。いくつかの場合において、治療薬剤は、レプレッサー剤である。追加の場合において、治療薬剤は、エンハンサー剤である。

## 【 0 0 9 7 】

[00110] 本明細書に開示される治療薬剤は、N I E レプレッサー剤であり得る。治療薬剤は、ポリ核酸ポリマーを含む場合がある。

[00111] 本開示の1つの側面によれば、本発明で提供されるのは、機能的 S C N 1 A タンパク質のレベルを増加させるために被験者へN I E レプレッサー剤を投与することを含んでなる、機能的 S C N 1 A タンパク質欠損症に関連した病態の治療又は予防の方法であって、ここで該薬剤は、プレmRNA転写産物のある領域へ結合して、N I E の成熟転写産物中の包含を減少させる。例えば、本発明で提供されるのは、機能的 S C N 1 A タンパク質のレベルを増加させるために被験者へN I E レプレッサー剤を投与することを含んでなる、機能的 S C N 1 A タンパク質欠損症に関連した病態の治療又は予防の方法であって、ここで該薬剤は、プレmRNA転写産物のN I E を含有しているイントロン（例、ヒト S C N 1 A 遺伝子中のイントロン20）のある領域へ、又は同じイントロン中のN I E 活性化調節配列へ結合する。

10

## 【 0 0 9 8 】

[00112] 成熟mRNA中のN I E 包含を抑制することに言及する場合、この抑制は、完全（例、100%）であっても、一部であってもよい。この抑制は、臨床的に重要であり得る。この抑制/是正は、治療無しの被験者におけるN I E 包含のレベルに対するものであっても、同様の被験者の集団におけるN I E 包含の量に対するものであってもよい。この抑制/是正は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも10%未満のN I E 包含であり得る。この抑制は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも20%未満のN I E 包含であり得る。この抑制は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも40%未満のN I E 包含であり得る。この抑制は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも50%未満のN I E 包含であり得る。この抑制は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも60%未満のN I E 包含であり得る。この抑制は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも80%未満のN I E 包含であり得る。この抑制は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも90%未満のN I E 包含であり得る。

20

## 【 0 0 9 9 】

[00113] 活性 S C N 1 A タンパク質レベルを増加させることに言及する場合、この増加は、臨床的に重要であり得る。この増加は、治療無しの被験者における活性 S C N 1 A タンパク質レベルに対するものであっても、同様の被験者の集団における活性 S C N 1 A タンパク質の量に対するものであってもよい。この増加は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも10%より多い活性 S C N 1 A タンパク質であり得る。この増加は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも20%より多い活性 S C N 1 A タンパク質であり得る。この増加は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも40%より多い活性 S C N 1 A タンパク質であり得る。この増加は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも50%より多い活性 S C N 1 A タンパク質であり得る。この増加は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも80%より多い活性 S C N 1 A タンパク質であり得る。この増加は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも100%より多い活性 S C N 1 A タンパク質であり得る。この増加は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも200%より多い活性 S C N 1 A タンパク質であり得る。この増加は、平均的な被験者、又は治療前の被験者に対して少なくとも500%より多い活性 S C N 1 A タンパク質であり得る。

30

40

## 【 0 1 0 0 】

[00114] N I E レプレッサー剤がポリ核酸ポリマーを含む態様（複数）において、このポリ核酸ポリマーは、約50ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約45ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約40ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約35ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約30ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約24ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約25ヌクレオチド

50

の長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 20ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 19ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 18ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 17ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 16ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 15ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 14ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 13ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 12ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 11ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 10ヌクレオチドの長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 10ヌクレオチドと約 50ヌクレオチドの間の長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 10ヌクレオチドと約 45ヌクレオチドの間の長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 10ヌクレオチドと約 40ヌクレオチドの間の長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 10ヌクレオチドと約 35ヌクレオチドの間の長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 10ヌクレオチドと約 30ヌクレオチドの間の長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 10ヌクレオチドと約 25ヌクレオチドの間の長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 10ヌクレオチドと約 20ヌクレオチドの間の長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 15ヌクレオチドと約 25ヌクレオチドの間の長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 15ヌクレオチドと約 30ヌクレオチドの間の長さであり得る。このポリ核酸ポリマーは、約 12ヌクレオチドと約 30ヌクレオチドの間の長さであり得る。

10

【0101】

20

[00115] このポリ核酸ポリマーの配列は、mRNA転写産物（例、部分的にプロセシングされたmRNA転写産物）の標的配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は99.5%相補的であり得る。

【0102】

[00116] このポリ核酸ポリマーの配列は、プレmRNA転写産物の標的配列に対して4個以下のミスマッチを有し得る。このポリ核酸ポリマーの配列は、プレmRNA転写産物の標的配列に対して3個以下のミスマッチを有し得る。このポリ核酸ポリマーの配列は、プレmRNA転写産物の標的配列に対して2個以下のミスマッチを有し得る。このポリ核酸ポリマーの配列は、プレmRNA転写産物の標的配列に対して1個以下のミスマッチを有し得る。このポリ核酸ポリマーの配列は、プレmRNA転写産物の標的配列に対してミスマッチを有さない場合がある。

30

【0103】

[00117] このポリ核酸ポリマーは、プレmRNA転写産物の標的配列へ特異的にハイブリダイズし得る。例えば、このポリ核酸ポリマーは、プレmRNA転写産物の標的配列に対して91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、又は100%の配列相補性を有し得る。このハイブリダイゼーションは、高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下であり得る。

【0104】

[00118] このポリ核酸ポリマーは、配列配列番号12~731から成る群より選択される配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は99.5%の配列同一性がある配列を有し得る。このポリ核酸ポリマーは、配列番号12~731から成る群より選択される配列に対して100%の配列同一性がある配列を有し得る。いくつかの事例において、このポリ核酸ポリマーは、配列番号12~371から成る群より選択される配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は99.5%の配列同一性がある配列を有し得る。いくつかの場合において、このポリ核酸ポリマーは、配列番号12~371から成る群より選択される配列に対して100%の配列同一性がある配列を有し得る。いくつか

40

50

の事例において、このポリ核酸ポリマーは、配列番号 3 7 2 ~ 7 3 1 から成る群より選択される配列に対して少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 9 9 . 5 % の配列同一性がある配列を有し得る。いくつかの場合において、このポリ核酸ポリマーは、配列番号 3 7 2 ~ 7 3 1 から成る群より選択される配列に対して 1 0 0 % の配列同一性がある配列を有し得る。

#### 【 0 1 0 5 】

[00119] ポリ核酸ポリマー配列に言及する場合、当業者は、標的配列へハイブリダイズする能力、又は（置換が標的配列中にある場合は）標的配列として認識される能力をそれが維持すれば、その配列において、1 以上の置換が許容され得て、場合によっては 2 個の置換が許容され得ることを理解されよう。配列同一性への参照は、標準 / デフォルト変数を使用する B L A S T 配列アライメントによって決定され得る。例えば、該配列は、9 9 % の同一性を有しても、本開示に従って機能し得る。他の態様では、該配列は、9 8 % の同一性を有しても、本開示に従って機能し得る。別の態様では、該配列は、9 5 % の同一性を有しても、本開示に従って機能し得る。別の態様では、該配列は、9 0 % の同一性を有しても、本開示に従って機能し得る。

#### 【 0 1 0 6 】

#### アンチセンスオリゴマー

[00120] 本発明で提供されるのは、S C N 1 A N I E 含有プレ m R N A の標的化部分へ結合することによってエクソスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴマーを含んでなる組成物である。本明細書に使用されるように、「A S O」及び「アンチセンスオリゴマー」という用語は、交換可能的に使用されて、ワトソン・クリック塩基対合又はゆらぎ塩基対合（G - U）によって標的核酸（例、S C N 1 A N I E 含有プレ m R N A）配列へハイブリダイズするヌクレオ塩基を含んでなる、ポリヌクレオチドのようなオリゴマーに言及する。この A S O は、標的配列に対して相補的な正確な配列、又は近い相補性（例えば、標的配列へ結合してスプライス部位でのスプライシングを高めるのに十分な相補性）を有し得る。A S O は、標的核酸（例えば、プレ m R N A 転写産物の標的化部分）へ結合（ハイブリダイズ）して、生理学的条件の下でハイブリダイズしたままであるように設計される。典型的には、それらが企図された（標的化）核酸配列以外の部位へハイブリダイズするならば、それらは、標的核酸ではない限られた数の配列へ（標的核酸以外の数少ない部位へ）ハイブリダイズする。A S O の設計では、A S O が他の部位へ結合して「標的外」効果を引き起こす可能性が限定されるように、プレ m R N A 転写産物の標的化部分の核酸配列、又はゲノム又は細胞のプレ m R N A 又はトランスクリプトーム中の他の位置にある十分に類似した核酸配列の出現を考慮に容れることができる、当該技術分野で知られている、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、P C T 出願番号：P C T / U S 2 0 1 4 / 0 5 4 1 5 1（「Reducing Nonsense-Mediated mRNA Decay（ナンセンス変異依存性 m R N A 分解を抑制する方法）」と題して、W O 2 0 1 5 / 0 3 5 0 9 1 として公開されている）中のどのアンチセンスオリゴマーも、本明細書に記載される方法を実践するのに使用することができる。

#### 【 0 1 0 7 】

[00121] いくつかの態様では、A S O が標的核酸又は N I E 含有プレ m R N A の標的化部分へ「特異的にハイブリダイズする」か又は「特異的」である。典型的には、そのようなハイブリダイゼーションは、3 7 より実質的に高い  $T_m$  で、好ましくは少なくとも 5 0 で、そして典型的には 6 0 ~ 概ね 9 0 の間で起こる。そのようなハイブリダイゼーションは、好ましくは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に対応する。所与のイオン強度と p H で、 $T_m$  は、標的配列の 5 0 % が相補的なオリゴヌクレオチドへハイブリダイズする温度である。

#### 【 0 1 0 8 】

[00122] オリゴヌクレオチドのようなオリゴマーが互いに対して「相補的」であるのは、2 本の 1 本鎖ポリヌクレオチドの間で、逆平行配置でハイブリダイゼーションが起こ

るときである。2本鎖ポリヌクレオチドが別のポリヌクレオチドに対して「相補的」になり得るのは、第1ポリヌクレオチドの鎖の一方と第2ポリヌクレオチドの鎖の一方の間でハイブリダイゼーションが起こり得る場合である。相補性（一方のポリヌクレオチドが他方のポリヌクレオチドに対して相補的である度合い）は、一般的に受容された塩基対合ルールに従って、互いと水素結合を形成することが予測される、対合する鎖中の塩基の比率（例、百分率）を単位として定量可能である。アンチセンスオリゴマー（ASO）の配列は、ハイブリダイズするその標的核酸の配列に対して100%相補的である必要はない。ある態様では、ASOが、それらが標的とする標的核酸配列内の標的領域に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列相補性を含む可能性がある。例えば、そのオリゴマー化合物の20個のヌクレオ塩基のうち18個が標的領域に対して相補的であって、それ故に特異的にハイブリダイズするASOは、90%の相補性を表すことになる。この例において、残りの非相補的なヌクレオ塩基は、一緒にまとまっても、相補的なヌクレオ塩基で分断されていてもよくて、互いに対しても、相補的なヌクレオ塩基に対しても連続してなくてよい。標的核酸の領域とASOの%相補性は、当該技術分野で知られているBLASTプログラム（基本的な局所アライメント検索ツール）及びPowerBLASTプログラム（Altschul, et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656）を使用して定型的に決定することができる。

10

## 【0109】

20

[00123] ASOは、標的配列中のすべてのヌクレオ塩基へハイブリダイズする必要はなく、それが実際にハイブリダイズするヌクレオ塩基は、連続していても不連続であってもよい。ASOは、介在又は隣接セグメントがハイブリダイゼーション事象に関与しないように、プレmRNA転写産物の1以上のセグメントにわたってハイブリダイズする場合がある（例えば、ループ構造又はヘアピン構造が形成される場合がある）。ある態様には、ASOが標的プレmRNA転写産物中の不連続なヌクレオ塩基へハイブリダイズする。例えば、ASOがハイブリダイズしない1以上のヌクレオ塩基（複数）によって分離されている、プレmRNA転写産物中のヌクレオ塩基に対してASOがハイブリダイズすることができる。

## 【0110】

30

[00124] 本明細書に記載されるASOは、NIE含有プレmRNAの標的化部分に存在するヌクレオ塩基に対して相補的であるヌクレオ塩基を含む。ASOという用語は、標的mRNA上の相補的なヌクレオ塩基へハイブリダイズすることが可能なヌクレオ塩基を含むが、ペプチド核酸（PNA）のような糖部分を含まない、オリゴヌクレオチドと他のオリゴマー分子を具現化する。ASOは、天然に存在するヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、修飾ヌクレオチド、又はこれら2項又は3項のあらゆる組合せを含み得る。「天然に存在するヌクレオチド」という用語には、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドが含まれる。「修飾ヌクレオチド」という用語には、糖基が修飾されたか又は置換されたヌクレオチド、及び/又は修飾された骨格を有するヌクレオチドが含まれる。いくつかの態様では、ASOのヌクレオチドのすべてが修飾ヌクレオチドである。当業者には、本明細書に記載される方法及び組成物と適合可能である、ASO又はASOの成分の化学修飾が明らかであろうし、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,258,109 B2号、米国特許第5,656,612号、米国特許公開番号2012/0190728、及びDias and Stein, Mol. Cancer Ther. 2002, 347-355に見出すことができる。

40

## 【0111】

[00125] ASOの1以上のヌクレオ塩基は、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、及びウラシルのような、天然に存在するどの非修飾ヌクレオ塩基であっても、標的プレmRNA上に存在するヌクレオ塩基と水素結合することが可能であるほどに非修飾ヌクレオ塩基に十分類似しているどの合成又は修飾ヌクレオ塩基でもよい。修飾ヌクレオ塩基の

50

例には、限定無しに、ヒポキサンチン、キサンチン、7 - メチルグアニン、5 , 6 - ジヒドロウラシル、5 - メチルシトシン、及び5 - ヒドロキシメトイルシトシンが含まれる。

【 0 1 1 2 】

[00126] 本明細書に記載される A S O はまた、オリゴマーの諸成分を連結する骨格構造を含む。「骨格構造」及び「オリゴマー連結」という用語は、交換可能的に使用し得て、A S O のモノマー間の連結に言及する。天然に存在するオリゴヌクレオチドにおいて、骨格は、オリゴマーの糖部分を連結している 3' - 5' ホスホジエステル連結を含む。本明細書に記載される、A S O の骨格構造又はオリゴマー連結には、(限定されないが) ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニラデート、ホスホロアミデート、等が含まれ得る。例えば、La Planche, et al., Nucleic Acids Res. 14: 9081 (1986); Stec, et al., J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1984), Stein, et al., Nucleic Acids Res. 16: 3209 (1988), Zon, et al., Anti-Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon, et al., 「Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach (オリゴヌクレオチドと類似体、実践アプローチ)」, 87-108 頁 (F. Eckstein 監修、オックスフォード大学出版、オックスフォード、イギリス (1991)); Stec, et al., 米国特許第 5 , 1 5 1 , 5 1 0 号 ; Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews 90: 543 (1990) を参照のこと。いくつかの態様では、A S O の骨格構造は、リンを含有せず、代わりに、ペプチド結合 (例えば、ペプチド核酸 (P N A ) において)、又はカルバメート、アミド、並びに線状及び環状の炭化水素基が含まれる連結基を含有する。いくつかの態様では、骨格修飾は、ホスホロチオエート連結である。いくつかの態様では、骨格修飾は、ホスホロアミデート連結である。

【 0 1 1 3 】

[00127] 態様 (複数) において、A S O 骨格のリン - ヌクレオチド間連結のそれぞれの立体化学は、ランダムである。態様 (複数) において、A S O 骨格のリン - ヌクレオチド間連結のそれぞれの立体化学は、制御されていて、ランダムではない。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開番号 2 0 1 4 / 0 1 9 4 6 1 0、「Methods for the Synthesis of Functionalized Nucleic Acids (機能化核酸の合成法)」は、核酸オリゴマー中の各リン原子でのキラリティーの掌性を独立的に選択するための方法について記載する。態様 (複数) では、本発明の方法において使用される A S O (限定されないが、表 5 と表 6 において本明細書に示される A S O のいずれも含まれる) が、ランダムではないリン - ヌクレオチド間連結を有している A S O を含む。態様 (複数) では、本発明の方法において使用される組成物が純粋なジアステレオマーの A S O を含む。態様 (複数) では、本発明の方法において使用される組成物が、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、約 1 0 0 %、約 9 0 % ~ 約 1 0 0 %、約 9 1 % ~ 約 1 0 0 %、約 9 2 % ~ 約 1 0 0 %、約 9 3 % ~ 約 1 0 0 %、約 9 4 % ~ 約 1 0 0 %、約 9 5 % ~ 約 1 0 0 %、約 9 6 % ~ 約 1 0 0 %、約 9 7 % ~ 約 1 0 0 %、約 9 8 % ~ 約 1 0 0 %、又は約 9 9 % ~ 約 1 0 0 % のジアステレオマー純度を有する A S O を含む。

【 0 1 1 4 】

[00128] 態様 (複数) において、A S O は、そのリン - ヌクレオチド間連結で R p 配置と S p 配置の非ランダム混合物を有する。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドにおける R p と S p の混合には、良好な活性とヌクレアーゼ安定性の間で均衡を達成することが必要であると示唆されてきた (参照により本明細書に組み込まれる、Wan, et al., 2 0 1 4, 「Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages (キラルなホスホロチオエート連結を含有する第 2 世代アンチセンスオリゴヌクレオチドの合成、生物物理学的特性、及び生理活性)」 Nucleic Acids Research 42 (22): 13 456-13468 )。態様 (複数) では、本発明の方法において使用される A S O (限定され

ないが、本明細書において配列番号 12 ~ 731 に示される A S O のいずれも含まれる) が、約 5 ~ 100 % R p、少なくとも約 5 % R p、少なくとも約 10 % R p、少なくとも約 15 % R p、少なくとも約 20 % R p、少なくとも約 25 % R p、少なくとも約 30 % R p、少なくとも約 35 % R p、少なくとも約 40 % R p、少なくとも約 45 % R p、少なくとも約 50 % R p、少なくとも約 55 % R p、少なくとも約 60 % R p、少なくとも約 65 % R p、少なくとも約 70 % R p、少なくとも約 75 % R p、少なくとも約 80 % R p、少なくとも約 85 % R p、少なくとも約 90 % R p、又は少なくとも約 95 % R p を残りの S p とともに含むか又は約 100 % R p を含む。態様 (複数) では、本発明の方法において使用される A S O (限定されないが、本明細書において配列番号 12 ~ 731 に示される A S O のいずれも含まれる) が、約 10 % ~ 約 100 % R p、約 15 % ~ 約 100 % R p、約 20 % ~ 約 100 % R p、約 25 % ~ 約 100 % R p、約 30 % ~ 約 100 % R p、約 35 % ~ 約 100 % R p、約 40 % ~ 約 100 % R p、約 45 % ~ 約 100 % R p、約 50 % ~ 約 100 % R p、約 55 % ~ 約 100 % R p、約 60 % ~ 約 100 % R p、約 65 % ~ 約 100 % R p、約 70 % ~ 約 100 % R p、約 75 % ~ 約 100 % R p、約 80 % ~ 約 100 % R p、約 85 % ~ 約 100 % R p、約 90 % ~ 約 100 % R p、又は約 95 % ~ 約 100 % R p、約 20 % ~ 約 80 % R p、約 25 % ~ 約 75 % R p、約 30 % ~ 約 70 % R p、約 40 % ~ 約 60 % R p、又は約 45 % ~ 約 55 % R p を残りの S p とともに含む。

#### 【0115】

[00129] 態様 (複数) では、本発明の方法において使用される A S O (限定されないが、本明細書において配列番号 12 ~ 731 に示される A S O のいずれも含まれる) が、約 5 ~ 100 % S p、少なくとも約 5 % S p、少なくとも約 10 % S p、少なくとも約 15 % S p、少なくとも約 20 % S p、少なくとも約 25 % S p、少なくとも約 30 % S p、少なくとも約 35 % S p、少なくとも約 40 % S p、少なくとも約 45 % S p、少なくとも約 50 % S p、少なくとも約 55 % S p、少なくとも約 60 % S p、少なくとも約 65 % S p、少なくとも約 70 % S p、少なくとも約 75 % S p、少なくとも約 80 % S p、少なくとも約 85 % S p、少なくとも約 90 % S p、又は少なくとも約 95 % S p を残りの R p とともに含むか又は約 100 % S p を含む。態様 (複数) では、本発明の方法において使用される A S O (限定されないが、本明細書において配列番号 12 ~ 731 に示される A S O のいずれも含まれる) が、約 10 % ~ 約 100 % S p、約 15 % ~ 約 100 % S p、約 20 % ~ 約 100 % S p、約 25 % ~ 約 100 % S p、約 30 % ~ 約 100 % S p、約 35 % ~ 約 100 % S p、約 40 % ~ 約 100 % S p、約 45 % ~ 約 100 % S p、約 50 % ~ 約 100 % S p、約 55 % ~ 約 100 % S p、約 60 % ~ 約 100 % S p、約 65 % ~ 約 100 % S p、約 70 % ~ 約 100 % S p、約 75 % ~ 約 100 % S p、約 80 % ~ 約 100 % S p、約 85 % ~ 約 100 % S p、約 90 % ~ 約 100 % S p、又は約 95 % ~ 約 100 % S p、約 20 % ~ 約 80 % S p、約 25 % ~ 約 75 % S p、約 30 % ~ 約 70 % S p、約 40 % ~ 約 60 % S p、又は約 45 % ~ 約 55 % S p を残りの R p とともに含む。

#### 【0116】

[00130] 本明細書に記載される A S O のいずれも、天然に存在するヌクレオチド中に存在するような、リボース又はデオキシリボースを含む糖部分、又は修飾糖部分又は糖類似体 (モルホリン環が含まれる) を含有し得る。修飾糖部分の非限定的な例には、2' - O - メチル (2' - O - Me)、2' - O - メトキシエチル (2' MOE)、2' - O - アミノエチル、2' F のような 2' 置換; N3' - > P5' ホスホロアミデート、2' ジメチルアミノオキシエトキシ、2' ジメチルアミノエトキシエトキシ、2' - グアニジニウム、2' - O - グアニジニウムエチル、カルバメート修飾糖、及び 2 環式修飾糖が含まれる。いくつかの態様では、糖部分修飾は、2' - O - Me、2' F、及び 2' MOE より選択される。いくつかの態様では、糖部分修飾は、ロックト (locked) 核酸 (LNA) にあるような、余分の架橋結合である。いくつかの態様では、糖類似体は、ホスホロジアミデートモルホリノ (PMO) のようなモルホリン環を含有する。いくつかの態様では、糖部分は、リボフラノシル

又は 2' デオキシリボフラノシル修飾を含む。いくつかの態様では、糖部分は、2', 4' - 制約化 (constrained) 2' O - メチルオキシエチル (cMOE) 修飾を含む。いくつかの態様では、糖部分は、cEt 2', 4' 制約化 2' - OエチルBNA修飾を含む。いくつかの態様では、糖部分は、トリシクロDNA (tcDNA) 修飾を含む。いくつかの態様では、糖部分は、エチレン核酸 (ENA) 修飾を含む。いくつかの態様では、糖部分は、MCE修飾を含む。当該技術分野では修飾について知られていて、例えば、この目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Jarver, et al., 2014, 「A Chemical View of Oligonucleotides for Exon Skipping and Related Drug Applications (エクソンスキッピングと関連した医薬応用のためのオリゴヌクレオチドについての化学的視点)」 Nucleic Acid Therapeutics 24(1): 37-47 による文献に記載されている。

10

#### 【0117】

[00131] いくつかの態様では、ASOの各モノマーが同じやり方で修飾され、例えばASOの骨格の各連結がホスホロチオエート連結を含むか又は各リボース糖部分が2' O - メチル修飾を含む。ASOのモノマー成分のそれぞれに存在するそのような修飾は、「均一な修飾」と呼ばれる。いくつかの実施例では、異なる修飾の組合せが望まれる場合があり、例えば、ASOがホスホロジアミデート連結とモルホリン環 (モルホリノ) を含んでなる糖部分の組合せを含む場合がある。ASOへの様々な修飾の組合せは、「混合修飾」又は「混合化学」と呼ばれる。

#### 【0118】

[00132] いくつかの態様では、ASOは、1以上の骨格修飾を含む。いくつかの態様では、ASOは、1以上の糖部分修飾を含む。いくつかの態様では、ASOは、1以上の骨格修飾と1以上の糖部分修飾を含む。いくつかの態様では、ASOは、2' MOE修飾とホスホロチオエート骨格を含む。いくつかの態様では、ASOは、ホスホロジアミデートモルホリノ (PMO) を含む。いくつかの態様では、ASOは、ペプチド核酸 (PNA) を含む。本明細書に記載されるASOのいずれも、又はASOのどの成分 (例、ヌクレオ塩基、糖部分、骨格) も、ASOの所望される特性又は活性を達成するために、又はASOの所望されない特性又は活性を抑制するために修飾され得る。例えば、ASO又はどのASOの1以上の成分も、プレmRNA転写産物上の標的配列に対する結合親和性を高めるために；非標的配列への結合を抑制するために；細胞ヌクレアーゼ (即ち、RNAアーゼH) による分解を抑制するために；ASOの細胞中への取込み、及び/又は細胞の核中への取込みを改善するために；ASOの薬物動態又は薬力学を変化させるために；及び/又はASOの半減期を調節するために修飾され得る。

20

30

#### 【0119】

[00133] いくつかの態様では、ASOは、2' - O - (2 - メトキシエチル) (MOE) ホスホロチオエート - 修飾ヌクレオチドから構成される。そのようなヌクレオチドから構成されるASOは、本明細書に開示される方法に特によく適して、そのような修飾を有しているオリゴマーでは、ヌクレアーゼ分解に対して有意に亢進された抵抗性と増加したバイオアベイラビリティを有して、例えば、本明細書に記載されるいくつかの態様では、経口送達に適したものになることが示されてきた。例えば、Geary, et al., J Pharmacol Exp Ther. 2001; 296(3): 890-7; Geary, et al., J Pharmacol Exp Ther. 2001; 296(3): 898-904 を参照のこと。

40

#### 【0120】

[00134] 当業者には、ASOを合成する方法が知られていよう。あるいは、又は追加して、市販の供給元よりASOを入手し得る。

[00135] 特に断らなければ、1本鎖核酸 (例、プレmRNA転写産物、オリゴヌクレオチド、ASO、等) 配列の左端は5' 端であって、1本鎖又は2本鎖核酸配列の左手方向は、5' 方向と言及される。同様に、核酸配列 (1本鎖又は2本鎖) の右端又は右方向は、3' 端又は3' 方向と言及される。一般に、核酸中の基準点に対して5' にある領域又は配列は、「上流」と言及されて、核酸中の基準点に対して3' にある領域又は配列は、「下流」と言及さる。一般に、mRNAの5' 方向又は5' 端には開始又は出発コドンが位置するの

50

に対し、その3'端又は3'方向には、終止コドンが位置する。いくつかの側面では、核酸中の基準点の上流にあるヌクレオチドが負数によって明記され得る一方で、核酸中の基準点の下流にあるヌクレオチドが正数によって明記され得る。例えば、基準点（例、mRNA中のエクソン-エクソン結合点）を「ゼロ」位と明記し得て、その基準点に直接隣接して上流にあるヌクレオチドを「マイナス1」、例えば「-1」と明記するのに対し、その基準点に直接隣接して下流にあるヌクレオチドを「プラス1」、例えば「+1」と明記する。

#### 【0121】

[00136] いくつかの態様では、ASOは、SCN1A NIE含有プレmRNA（例えば、5'スプライス部位に対して正数によって明記される方向）中の包含されたエクソンの5'スプライス部位（又はNIEの3'端）の下流（3'方向）にあるSCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分に対して相補的である（そしてそれへ結合する）。いくつかの態様では、ASOは、包含されたエクソンの5'スプライス部位（又は3'端）に対して約+1～約+500の領域内にある、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分に対して相補的である。いくつかの態様では、ASOは、包含されたエクソンの5'スプライス部位（又は3'端）に対して+6のヌクレオチドと+496のヌクレオチドの間の領域内にある、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分に対して相補的であり得る。いくつかの側面において、ASOは、包含されたエクソンの5'スプライス部位（又は3'端）に対して約+1～約+500、約+1～約+490、約+1～約+480、約+1～約+470、約+1～約+460、約+1～約+450、約+1～約+440、約+1～約+430、約+1～約+420、約+1～約+410、約+1～約+400、約+1～約+390、約+1～約+380、約+1～約+370、約+1～約+360、約+1～約+350、約+1～約+340、約+1～約+330、約+1～約+320、約+1～約+310、約+1～約+300、約+1～約+290、約+1～約+280、約+1～約+270、約+1～約+260、約+1～約+250、約+1～約+240、約+1～約+230、約+1～約+220、約+1～約+210、約+1～約+200、約+1～約+190、約+1～約+180、約+1～約+170、約+1～約+160、約+1～約+150、約+1～約+140、約+1～約+130、約+1～約+120、約+1～約+110、約+1～約+100、約+1～約+90、約+1～約+80、約+1～約+70、約+1～約+60、約+1～約+50、約+1～約+40、約+1～約+30、又は約+1～約+20の領域内にある標的化部分に対して相補的である。いくつかの側面において、ASOは、包含されたエクソンの5'スプライス部位（又は3'端）に対して約+1～約+100、約+100～約+200、約+200～約+300、約+300～約+400、又は約+400～約+500の領域内にある標的化部分に対して相補的である。

#### 【0122】

[00137] いくつかの態様では、ASOは、SCN1A NIE含有プレmRNA（例えば、5'スプライス部位に対して負数によって明記される方向）中の包含されたエクソンの5'スプライス部位（又は3'端）の上流（5'方向）にある、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分に対して相補的である（そしてそれへ結合する）。いくつかの態様では、ASOは、包含されたエクソンの5'スプライス部位（又は3'端）に対して約-4～約-270の領域内にある、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分に対して相補的である。いくつかの態様では、ASOは、包含されたエクソンの5'スプライス部位（又は3'端）に対して-1のヌクレオチドと-264のヌクレオチドの間の領域内にある、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分に対して相補的であり得る。いくつかの側面において、ASOは、包含されたエクソンの5'スプライス部位（又は3'端）に対して約-1～約-270、約-1～約-260、約-1～約-250、約-1～約-240、約-1～約-230、約-1～約-220、約-1～約-210、約-1～約-200、約-1～約-190、約-1～約-180、約-1～約-170、約-1～約-160、約-1～約-150、約-1～約-140、約-1～約-130、約-1～約-120、約-1～約-110、約-1～約-100、約-1～約-90、約-1～約-

80、約 - 1 ~ 約 - 70、約 - 1 ~ 約 - 60、約 - 1 ~ 約 - 50、約 - 1 ~ 約 - 40、約 - 1 ~ 約 - 30、又は約 - 1 ~ 約 - 20の領域内にある標的化部分に対して相補的である。いくつかの側面において、ASOは、包含されたエクソンの5'スプライス部位(又は3'端)に対して約 - 1 ~ 約 - 50、約 - 50 ~ 約 - 100、約 - 100 ~ 約 - 150、約 - 150 ~ 約 - 200、又は約 - 200 ~ 約 - 250の領域内にある標的化部分に対して相補的である。

#### 【0123】

[00138] いくつかの態様では、ASOは、SCN1A NIE含有プレmRNA(例えば、負数によって明記される方向)中の包含されたエクソンの3'スプライス部位(又は5'端)の上流(5'方向)にある、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分に対して相補的である。いくつかの態様では、ASOは、包含されたエクソンの3'スプライス部位(又は5'端)に対して約 - 1 ~ 約 - 500の領域内にある、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分に対して相補的である。いくつかの態様では、ASOは、包含されたエクソンの3'スプライス部位に対して - 1 ~ - 496の領域内にある、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分に対して相補的である。いくつかの側面において、ASOは、包含されたエクソンの3'スプライス部位に対して約 - 1 ~ 約 - 500、約 - 1 ~ 約 - 490、約 - 1 ~ 約 - 480、約 - 1 ~ 約 - 470、約 - 1 ~ 約 - 460、約 - 1 ~ 約 - 450、約 - 1 ~ 約 - 440、約 - 1 ~ 約 - 430、約 - 1 ~ 約 - 420、約 - 1 ~ 約 - 410、約 - 1 ~ 約 - 400、約 - 1 ~ 約 - 390、約 - 1 ~ 約 - 380、約 - 1 ~ 約 - 370、約 - 1 ~ 約 - 360、約 - 1 ~ 約 - 350、約 - 1 ~ 約 - 340、約 - 1 ~ 約 - 330、約 - 1 ~ 約 - 320、約 - 1 ~ 約 - 310、約 - 1 ~ 約 - 300、約 - 1 ~ 約 - 290、約 - 1 ~ 約 - 280、約 - 1 ~ 約 - 270、約 - 1 ~ 約 - 260、約 - 1 ~ 約 - 250、約 - 1 ~ 約 - 240、約 - 1 ~ 約 - 230、約 - 1 ~ 約 - 220、約 - 1 ~ 約 - 210、約 - 1 ~ 約 - 200、約 - 1 ~ 約 - 190、約 - 1 ~ 約 - 180、約 - 1 ~ 約 - 170、約 - 1 ~ 約 - 160、約 - 1 ~ 約 - 150、約 - 1 ~ 約 - 140、約 - 1 ~ 約 - 130、約 - 1 ~ 約 - 120、約 - 1 ~ 約 - 110、約 - 1 ~ 約 - 100、約 - 1 ~ 約 - 90、約 - 1 ~ 約 - 80、約 - 1 ~ 約 - 70、約 - 1 ~ 約 - 60、約 - 1 ~ 約 - 50、約 - 1 ~ 約 - 40、又は約 - 1 ~ 約 - 30の領域内にある標的化部分に対して相補的である。いくつかの側面において、ASOは、包含されたエクソンの3'スプライス部位に対して約 - 1 ~ 約 - 100、約 - 100 ~ 約 - 200、約 - 200 ~ 約 - 300、約 - 300 ~ 約 - 400、又は約 - 400 ~ 約 - 500の領域内にある標的化部分に対して相補的である。

#### 【0124】

[00139] いくつかの態様では、ASOは、SCN1A NIE含有プレmRNA(例えば、正数によって明記される方向)中の包含されたエクソンの3'スプライス部位(又は5'端)の下流(3'方向)にある、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分に対して相補的である。いくつかの態様では、ASOは、包含されたエクソンの3'スプライス部位に対して約 + 1 ~ 約 + 100の領域内にある、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分に対して相補的である。いくつかの側面において、ASOは、包含されたエクソンの3'スプライス部位に対して約 + 1 ~ 約 + 90、約 + 1 ~ 約 + 80、約 + 1 ~ 約 + 70、約 + 1 ~ 約 + 60、約 + 1 ~ 約 + 50、約 + 1 ~ 約 + 40、約 + 1 ~ 約 + 30、約 + 1 ~ 約 + 20、又は約 + 1 ~ 約 + 10の領域内にある標的化部分に対して相補的である。

#### 【0125】

[00140] いくつかの態様では、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分は、包含されたエクソンの5'スプライス部位(3'端)に対して+100~包含されたエクソンの3'スプライス部位(5'端)に対して-100の領域内にある。いくつかの態様では、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分は、NIE内にある。いくつかの態様では、SCN1A NIE含有プレmRNAの標的化部分は、シュードエクソンとイントロンの境界を含む。

#### 【0126】

【00141】 A S O は、特異的な結合とスプライシングの効果的な亢進に適した、どの長さであってもよい。いくつかの態様では、A S O は、8 ~ 50 のヌクレオ塩基から成る。例えば、A S O は、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、40、45、又は50ヌクレオ塩基の長さであり得る。いくつかの態様では、A S O は、50 より多いヌクレオ塩基から成る。いくつかの態様では、A S O は、8 ~ 50ヌクレオ塩基、8 ~ 40ヌクレオ塩基、8 ~ 35ヌクレオ塩基、8 ~ 30ヌクレオ塩基、8 ~ 25ヌクレオ塩基、8 ~ 20ヌクレオ塩基、8 ~ 15ヌクレオ塩基、9 ~ 50ヌクレオ塩基、9 ~ 40ヌクレオ塩基、9 ~ 35ヌクレオ塩基、9 ~ 30ヌクレオ塩基、9 ~ 25ヌクレオ塩基、9 ~ 20ヌクレオ塩基、9 ~ 15ヌクレオ塩基、10 ~ 50ヌクレオ塩基、10 ~ 40ヌクレオ塩基、10 ~ 35ヌクレオ塩基、10 ~ 30ヌクレオ塩基、10 ~ 25ヌクレオ塩基、10 ~ 20ヌクレオ塩基、10 ~ 15ヌクレオ塩基、11 ~ 50ヌクレオ塩基、11 ~ 40ヌクレオ塩基、11 ~ 35ヌクレオ塩基、11 ~ 30ヌクレオ塩基、11 ~ 25ヌクレオ塩基、11 ~ 20ヌクレオ塩基、11 ~ 15ヌクレオ塩基、12 ~ 50ヌクレオ塩基、12 ~ 40ヌクレオ塩基、12 ~ 35ヌクレオ塩基、12 ~ 30ヌクレオ塩基、12 ~ 25ヌクレオ塩基、12 ~ 20ヌクレオ塩基、12 ~ 15ヌクレオ塩基、13 ~ 50ヌクレオ塩基、13 ~ 40ヌクレオ塩基、13 ~ 35ヌクレオ塩基、13 ~ 30ヌクレオ塩基、13 ~ 25ヌクレオ塩基、13 ~ 20ヌクレオ塩基、14 ~ 50ヌクレオ塩基、14 ~ 40ヌクレオ塩基、14 ~ 35ヌクレオ塩基、14 ~ 30ヌクレオ塩基、14 ~ 25ヌクレオ塩基、14 ~ 20ヌクレオ塩基、15 ~ 50ヌクレオ塩基、15 ~ 40ヌクレオ塩基、15 ~ 35ヌクレオ塩基、15 ~ 30ヌクレオ塩基、15 ~ 25ヌクレオ塩基、15 ~ 20ヌクレオ塩基、20 ~ 50ヌクレオ塩基、20 ~ 40ヌクレオ塩基、20 ~ 35ヌクレオ塩基、20 ~ 30ヌクレオ塩基、20 ~ 25ヌクレオ塩基、25 ~ 50ヌクレオ塩基、25 ~ 40ヌクレオ塩基、25 ~ 35ヌクレオ塩基、又は25 ~ 30ヌクレオ塩基の長さである。いくつかの態様では、A S O は、18ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様では、A S O は、15ヌクレオチドの長さである。いくつかの態様では、A S O は、25ヌクレオチドの長さである。

【0127】

【00142】 いくつかの態様では、化学的に異なるがN I E 含有プレm R N A の同じ標的化部分に対して相補的な2個以上のA S O を使用する。いくつかの態様では、N I E 含有プレm R N A の異なる標的化部分に対して相補的である2個以上のA S O を使用する。

【0128】

【00143】 態様（複数）において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、1以上の部分又はコンジュゲート（例えば、当該オリゴヌクレオチドの活性又は細胞取込みを高める、標的指向性の部分又は他のコンジュゲート）へ化学的に連結される。そのような部分には、限定されないが、脂質部分（例えば、コレステロール部分、コレステリル部分のような）、脂肪族鎖（例えば、ドデカンジオール又はウンデシル残基）、ポリアミン又はポリエチレングリコール鎖、又はアダマンタン酢酸が含まれる。親油性部分を含んでなるオリゴヌクレオチドと製造法については、公知の文献に記載されてきた。態様（複数）において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定されないが、非塩基性ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、例えば、N - アセチルガラクトサミン（G a l N A c）、N - A c - グルコサミン（G l u N A c）、又はマンノース（例、マンノース - 6 - リン酸）、脂質、又はポリ炭化水素化合物が含まれる部分とコンジュゲートされる。当該技術分野で理解されて文献に記載されているように、例えばリンカーを使用して、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含んでなるヌクレオチドの1以上に対して、糖、塩基、又はリン酸基上のいくつかの位置のいずれでも、コンジュゲートを連結させることができる。リンカーには、2価又は3価の分岐鎖リンカーが含まれ得る。態様（複数）において、コンジュゲートは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの3'端へ付く。オリゴヌクレオチドコンジュゲートを製造する方法については、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,450,467号「Carbohydrate conj

gates as delivery agents for oligonucleotides (オリゴヌクレオチドの送達剤としての炭水化物コンジュゲート)」に記載されている。

【0129】

[00144] いくつかの態様では、ASOの標的になるべき核酸は、真核細胞のような細胞において発現される、SCN1A NIE含有プレmRNAである。いくつかの態様では、「細胞」という用語は、細胞の集団に言及する場合がある。いくつかの態様では、細胞は、被験者中にある。いくつかの態様では、細胞は、被験者から単離される。いくつかの態様では、細胞は、体外(ex vivo)にある。いくつかの態様では、細胞は、病態又は疾患に関連した細胞又は細胞系である。いくつかの態様では、細胞は、試験管内(in vitro) (例えば、細胞培養物中)にある。

10

【0130】

医薬組成物

[00145] 記載される組成物の薬剤(例、アンチセンスオリゴヌクレオチド)を含んでなり、記載される方法のいずれにも使用のための医薬組成物又は製剤は、製薬業界においてよく知られていて公知の文献に記載されている慣用の技術に従って調製することができる。態様(複数)では、被験者を治療するための医薬組成物又は製剤が本明細書に記載されるようなアンチセンスオリゴマー、又はその医薬的に許容される塩、溶媒和物、水和物、又はエステルの有効量を含む。アンチセンスオリゴマーを含んでなる医薬製剤は、医薬的に許容される賦形剤、希釈剤、又は担体をさらに含み得る。

【0131】

[00146] 医薬的に許容される塩は、不当な毒性、刺激、アレルギー反応、等を伴うことなく、ヒト及び低級動物の組織との接触における使用に適していて、妥当な利益/リスク比に見合っている(例えば、この目的のために参照により本明細書に組み込まれる、S. M. Berge, et al., J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977)を参照のこと)。その塩は、該化合物の最終単離及び精製の間にその場で、又はその遊離塩基の官能基を好適な有機酸と反応させることによって別々に製造することができる。医薬的に許容される、無害な酸付加塩の例は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸、及び過塩素酸のような無機酸とともに、又は酢酸、シュウ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸、又はマロン酸のような有機酸とともに生成されるか又はイオン交換のような他の文書化された方法論を使用することによる、アミノ基の塩である。他の医薬的に許容される塩には、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシ-エタンスルホン酸塩、ラクチン酸塩、乳酸塩、ラウリル酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩、等が含まれる。代表的なアルカリ又はアルカリ土類金属塩には、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、等の塩が含まれる。さらなる医薬的に許容される塩には、ハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、低級アルキルスルホン酸塩、及びアリールスルホン酸塩のような対イオンを使用して生成される、無害のアンモニウム、四級アンモニウム、及びアミンカチオンの塩が適宜含まれる。

20

30

40

【0132】

[00147] 態様(複数)において、該組成物は、限定されないが、錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、液体シロップ剤、ソフトゲル剤、坐剤、及び浣腸剤のような、多くの可能な剤形のいずれにも製剤化される。態様(複数)において、該組成物は、水性、非水性

50

、又は混合した媒体中の懸濁液剤として製剤化される。水性懸濁液剤は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、及び/又はデキストランが含まれる、該懸濁液剤の粘稠性を増加させる物質をさらに含有し得る。該懸濁液剤は、安定化剤も含有し得る。態様（複数）では、本発明の医薬製剤又は組成物には、限定されないが、溶液剤、乳剤、ミクロ乳剤、フォーム剤、又はリボソーム含有製剤（例、カチオン性又は非カチオン性のリボソーム剤）が含まれる。

#### 【0133】

[00148] 本明細書に記載される医薬組成物又は製剤は、適正であって、当業者によく知られているか又は公知の文献に記載されているような、1以上の浸透エンハンサー、担体、賦形剤、又は他の活性又は不活性成分を含み得る。態様（複数）では、立体的に安定したリボソーム剤（例、1以上の特殊化脂質を含んでなるリボソーム剤）もリボソーム剤に含まれる、これらの特殊化脂質は、循環寿命が亢進されたリボソーム剤を生じる。態様（複数）では、立体的に安定したリボソーム剤が1以上の糖脂質を含むか又はポリエチレングリコール（PEG）部分のような1以上の親水性ポリマーで誘導体化される。態様（複数）では、界面活性剤が医薬製剤又は組成物に含まれる。医薬品、製剤、及び乳剤における界面活性剤の使用については当該技術分野でよく知られている。態様（複数）において、本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの効率的な送達を有効にするために（例えば、細胞膜を通過する拡散に役立つために、及び/又は親油性薬物の透過性を高めるために）浸透エンハンサーを利用する。態様（複数）において、浸透エンハンサーは、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート形成剤、又は非キレート形成性の非界面活性剤である。

#### 【0134】

[00149] 態様（複数）において、当該医薬製剤は、多数のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。態様（複数）において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、別の薬物又は治療薬剤と併用して投与される。

#### 【0135】

##### 併用療法

[00150] いくつかの態様では、本開示に開示されるASOは、1以上の追加治療薬剤と併用して使用することができる。いくつかの態様では、1以上の追加治療薬剤は、低分子を含み得る。例えば、1以上の追加治療薬剤は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、WO2016128343A1、WO2017053982A1、WO2016196386A1、WO201428459A1、WO201524876A2、WO2013119916A2、及びWO2014209841A2に記載される低分子を含み得る。いくつかの態様では、この1以上の追加治療薬剤は、イントロン保持を是正するために使用し得るASOを含む。いくつかの態様では、この1以上の他剤は、表4に収載されたASOより選択される。

#### 【0136】

##### 被験者の治療

[00151] 本発明で提供される組成物のいずれも、個体へ投与し得る。「個体」は、「被験者」又は「患者」と交換可能的に使用し得る。個体は、哺乳動物、例えば、ヒト又は非ヒト霊長動物のような動物、齧歯動物、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ロバ、ヤギ、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、又はヒツジである。態様（複数）において、個体は、ヒトである。態様（複数）において、個体は、胎児、胚、又は小児である。他の態様では、個体は、植物のような、別の真核生物であり得る。いくつかの態様では、本発明で提供される組成物は、体外細胞へ投与される。

#### 【0137】

[00152] いくつかの態様では、本発明で提供される組成物は、疾患又は障害を治療する方法として個体へ投与される。いくつかの態様では、個体は、本明細書に記載される疾患のいずれかのような、遺伝性疾患を有する。いくつかの態様では、個体は、本明細書に記載される疾患のいずれかのような疾患を有するリスク状態にある。いくつかの態様では

、個体は、あるタンパク質の不十分な量又はあるタンパク質の不十分な活性によって引き起こされる疾患又は障害を有するリスクが増加した状態にある。個体があるタンパク質の不十分な量又はあるタンパク質の不十分な活性によって引き起こされる疾患又は障害を有する「リスクが増加した状態」にあるならば、本方法は、防止的又は予防的な治療に関わる。例えば、ある個体は、そのような疾患又は障害を該疾患の家族歴の故に有するリスクが増加した状態にあり得る。典型的には、そのような疾患又は障害を有するリスクが増加した状態にある個体は、予防的治療より（例えば、該疾患又は障害の発現を防ぐか又はその進行を遅らせることによって）利益を得る。態様（複数）では、例えば、A S O 組成物を胎児へ直接的又は間接的に（例えば、母体を介して）投与することによって、胎児を子宮内で治療する。

10

#### 【0138】

[00153] 本発明のA S Oの投与に適した経路は、A S Oの送達が所望される細胞種に依って変わる場合がある。ドラベ症候群；全般性てんかん熱性痙攣プラス、2型；家族性熱性痙攣、3A；家族性片麻痺性偏頭痛、3；自閉症；てんかん性脳症、早期乳児、13；洞不全症候群1；アルツハイマー病、又はS U D E Pによって多数の組織及び臓器が影響を受けるが、最も有意に影響される組織は、脳である。本発明のA S Oは、患者へ非経口的に、例えば、髄腔内注射、脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、硝子体内注射、又は静脈内注射によって投与し得る。

#### 【0139】

[00154] いくつかの態様では、当該疾患又は病態は、N a v 1 . 1 ( S C N 1 A 遺伝子によってコードされるタンパク質)中の突然変異によって誘導される。いくつかの事例において、突然変異は、N a v 1 . 1中の機能欠失変異である。いくつかの場合において、N a v 1 . 1中の機能欠失変異は、N a v 1 . 1の機能を野生型N a v 1 . 1の機能に比べて（例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は95%以上）減らすか又は損なう1以上の突然変異を含む。いくつかの場合において、N a v 1 . 1中の機能欠失変異は、疾患表現型が生じる1以上の突然変異を含む。例示の機能欠失変異には、限定されないが、R 8 5 9 C、T 8 7 5 M、V 1 3 5 3 L、I 1 6 5 6 M、R 1 6 5 7 C、A 1 6 8 5 V、M 1 8 4 1 T、及びR 1 9 1 6 Gが含まれる。

20

#### 【0140】

[00155] 他の事例において、突然変異は、N a v 1 . 1中の機能獲得変異である。そのような場合において、機能獲得変異は、N a v 1 . 1の活性化を野生型N a v 1 . 1の機能に比べて（例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は95%以上）長くする1以上の突然変異を含む。そのような場合において、N a v 1 . 1中の機能獲得変異は、疾患表現型が生じる1以上の突然変異を含む。例示の機能獲得変異には、限定されないが、D 1 8 8 V、W 1 2 0 4 R、R 1 6 4 8 H、及びD 1 8 6 6 Yが含まれる。

30

#### 【0141】

[00156] いくつかの態様では、疾患又は病態は、脳症である。いくつかの場合において、脳症は、N a v 1 . 1中の機能欠失変異によって誘導される。

40

[00157] いくつかの態様では、脳症は、てんかん性脳症である。例示のてんかん性には、限定されないが、ドラベ症候群（D S）（乳児重症ミオクロニーてんかん又はS M E Iとしても知られている）；乳児重症ミオクロニーてんかん（S M E I）- 辺縁型（S M E B）；熱性痙攣（F S）；全般性てんかん熱性痙攣プラス（G E F S +）；てんかん性脳症、早期乳児、13；潜在性全般性てんかん；潜在性焦点性てんかん；ミオクロニー失立発作てんかん；レノックス・ガスト症候群；ウェスト症候群；特発性痙攣；早期ミオクロニー脳症；進行性ミオクロニーてんかん；小児交互性片麻痺；分類不能てんかん性脳症；てんかんにおける予期せぬ突然死（S U D E P）；早期乳児S C N 1 A脳症；早期乳児てんかん性脳症（E I E E）；又は洞不全症候群1が含まれる。いくつかの態様では、疾患又は病態は、場合によっては、ドラベ症候群（D S）（乳児重症ミオクロニーてんかん

50

又はSMEIとしても知られている)；乳児重症ミオクロニーてんかん(SMEI) - 辺縁型(SMEB)；熱性痙攣(FS)；全般性てんかん熱性痙攣プラス(GEFS+)；てんかん性脳症、早期乳児、13；潜在性全般性てんかん；潜在性焦点性てんかん；ミオクロニー失立発作てんかん；レノックス・ガスト症候群；ウェスト症候群；特発性痙攣；早期ミオクロニー脳症；進行性ミオクロニーてんかん；小児交互性片麻痺；分類不能てんかん性脳症；てんかんにおける予期せぬ突然死(SUDEP)；及び洞不全症候群1より選択されるてんかん性脳症である。

【0142】

【00158】いくつかの事例において、GEFS+は、全般性てんかん熱性痙攣プラス2型である。

【00159】いくつかの事例において、熱性痙攣は、家族性熱性痙攣、3Aである。

【0143】

【00160】いくつかの事例において、SMEBは、全般性棘徐波のないSMEB(SMEB-SW)、ミオクロニー発作のないSMEB(SMEB-M)、SMEIの1より多い特徴を欠いているSMEB(SMEB-O)、又は全身性强直性間代性発作を伴う小児難治性てんかん(ICEGTC)である。

【0144】

【00161】いくつかの態様では、Nav1.1中の機能欠失変異によって誘導される疾患又は病態には、限定されないが、ドラベ症候群(DS)(SMEIとしても知られている)；乳児重症ミオクロニーてんかん(SMEI) - 辺縁型(SMEB)；熱性痙攣(FS)；全般性てんかん熱性痙攣プラス(GEFS+)；てんかん性脳症、早期乳児、13；潜在性全般性てんかん；潜在性焦点性てんかん；ミオクロニー失立発作てんかん；レノックス・ガスト症候群；ウェスト症候群；特発性痙攣；早期ミオクロニー脳症；進行性ミオクロニーてんかん；小児交互性片麻痺；分類不能てんかん性脳症；てんかんにおける予期せぬ突然死(SUDEP)；洞不全症候群1；早期乳児SCN1A脳症；早期乳児てんかん性脳症(EIEE)；自閉症；又は乳児悪性遊走性部分発作が含まれる。

【0145】

【00162】いくつかの態様では、疾患又は病態は、Nav1.1中の機能獲得変異によって誘導される。Nav1.1中の機能獲得変異に関連した例示の疾患又は病態には、限定されないが、偏頭痛が含まれる。いくつかの事例において、Nav1.1中の機能獲得変異によって誘導される疾患又は病態は、偏頭痛である。

【0146】

【00163】いくつかの事例において、偏頭痛は、家族性片麻痺性偏頭痛、3である。

【00164】いくつかの態様では、疾患又は病態は、Nav1.1遺伝性てんかんである。Nav1.1遺伝性てんかんには、Nav1.1中の機能欠失変異又はNav1.1中の機能獲得変異が含まれ得る。いくつかの場合において、Nav1.1遺伝性てんかんには、1以上の遺伝性変異が含まれる。他の場合において、Nav1.1遺伝性てんかんには、1以上の新規(de novo)突然変異が含まれる。いくつかの場合において、Nav1.1遺伝性てんかんには、ドラベ症候群(DS)(乳児重症ミオクロニーてんかん又はSMEIとしても知られている)；乳児重症ミオクロニーてんかん(SMEI) - 辺縁型(SMEB)；熱性痙攣(FS)；全般性てんかん熱性痙攣プラス(GEFS+)；てんかん性脳症、早期乳児、13；潜在性全般性てんかん；潜在性焦点性てんかん；ミオクロニー失立発作てんかん；レノックス・ガスト症候群；ウェスト症候群；特発性痙攣；早期ミオクロニー脳症；進行性ミオクロニーてんかん；小児交互性片麻痺；分類不能てんかん性脳症；早期乳児SCN1A脳症；早期乳児てんかん性脳症(EIEE)；てんかんにおける予期せぬ突然死(SUDEP)；又は乳児悪性遊走性部分発作が含まれる。いくつかの場合において、Nav1.1中の機能欠失変異に関連したNav1.1遺伝性てんかんには、ドラベ症候群(DS)(乳児重症ミオクロニーてんかん又はSMEIとしても知られている)；乳児重症ミオクロニーてんかん(SMEI) - 辺縁型(SMEB)；熱性痙攣(FS)；全般性てんかん熱性痙攣プラス(GEFS+)；てんかん性脳症、早期乳児、1

10

20

30

40

50

3 ; 潜在性全般性てんかん ; 潜在性焦点性てんかん ; ミオクロニー失立発作てんかん ; レノックス・ガスト症候群 ; ウェスト症候群 ; 特発性痙攣 ; 早期ミオクロニー脳症 ; 進行性ミオクロニーてんかん ; 小児交互性片麻痺 ; 分類不能てんかん性脳症 ; 早期乳児 SCN1A 脳症 ; 早期乳児てんかん性脳症 ( E I E E ) ; てんかんにおける予期せぬ突然死 ( S U D E P ) ; 乳児悪性遊走性部分発作が含まれる。

【 0 1 4 7 】

[00165] いくつかの態様では、疾患又は病態は、SCN1A 遺伝子のハプロ不全に関連している。SCN1A 遺伝子のハプロ不全に関連した例示の疾患又は病態には、限定されないが、ドラベ症候群 ( D S ) ( S M E I としても知られている ) ; 乳児重症ミオクロニーてんかん ( S M E I ) - 辺縁型 ( S M E B ) ; 熱性痙攣 ( F S ) ; 全般性てんかん熱性痙攣プラス ( G E F S + ) ; てんかん性脳症、早期乳児、13 ; 潜在性全般性てんかん ; 潜在性焦点性てんかん ; ミオクロニー失立発作てんかん ; レノックス・ガスト症候群 ; ウェスト症候群 ; 特発性痙攣 ; 早期ミオクロニー脳症 ; 進行性ミオクロニーてんかん ; 小児交互性片麻痺 ; 分類不能てんかん性脳症 ; てんかんにおける予期せぬ突然死 ( S U D E P ) ; 洞不全症候群 1 ; 早期乳児 SCN1A 脳症 ; 早期乳児てんかん性脳症 ( E I E E ) ; 又は乳児悪性遊走性部分発作が含まれる。いくつかの場合において、疾患又は病態は、ドラベ症候群 ( D S ) ( S M E I としても知られている ) ; 乳児重症ミオクロニーてんかん ( S M E I ) - 辺縁型 ( S M E B ) ; 熱性痙攣 ( F S ) ; 全般性てんかん熱性痙攣プラス ( G E F S + ) ; てんかん性脳症、早期乳児、13 ; 潜在性全般性てんかん ; 潜在性焦点性てんかん ; ミオクロニー失立発作てんかん ; レノックス・ガスト症候群 ; ウェスト症候群 ; 特発性痙攣 ; 早期ミオクロニー脳症 ; 進行性ミオクロニーてんかん ; 小児交互性片麻痺 ; 分類不能てんかん性脳症 ; てんかんにおける予期せぬ突然死 ( S U D E P ) ; 洞不全症候群 1 ; 早期乳児 SCN1A 脳症 ; 早期乳児てんかん性脳症 ( E I E E ) ; 又は乳児悪性遊走性部分発作である。

【 0 1 4 8 】

[00166] いくつかの場合において、疾患又は病態は、ドラベ症候群 ( D S ) である。

[00167] ドラベ症候群 ( D S ) (あるいは、乳児重症ミオクロニーてんかん ( S M E I ) として知られている) は、生後 1 年目に出現するてんかん性脳症である。ドラベ症候群は、概ね 70 ~ 80 % の患者にあるナトリウムチャネル遺伝子変異の所見によって臨床診断が裏付けられる、ますます認知されているてんかん性脳症である。イオンチャネル遺伝子の突然変異は、広範囲のてんかん症候群の病態発生において重要な役割を担って、チャネルパチーとしてみなされている、いくつかのてんかん症を生じる。電位依存性ナトリウムチャネル ( V G S C ) は、神経細胞の興奮性に必須の役割を担うので、D S に関連した多くの突然変異が V G S C サブユニットをコードする遺伝子中に同定されてきたことは驚きではない。この疾患については、例えば、Mulley, et al., 2005 によって記載されて、この疾患の説明については、OMIM #607208 ( Online Mendelian Inheritance in Man, Johns Hopkins University, 1966-2015 ) に記載されていて、これらはともに参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 1 4 9 】

[00168] 70 % と 80 % の間の患者がナトリウムチャネル 1 サブユニット遺伝子 ( SCN1A ) 異常を保有して、短縮化変異が約 40 % を占めて、より早期の年齢での発作発現と有意な相関性がある。約 70 % の症例で配列変異が見出されて、短縮化変異 ( 40 % ) とミスセンス変異 ( 40 % ) を含み、残りがスプライス部位変化である。ほとんどの突然変異が新規であるが、5 ~ 10 % の症例で家族性変異が発生し、通常、本質はミスセンスである。残りの SCN1A 突然変異は、スプライス部位変異とミスセンス変異を含み、そのほとんどがナトリウムチャネルの細孔形成領域に該当する。現在、500 種を超える突然変異が D S に関連付けられていて、その遺伝子に沿ってランダムに分布している ( Mulley, et al., Neurol. 2006, 67, 1094-1095 ) 。

【 0 1 5 0 】

[00169] SCN1A 遺伝子は、ヒト染色体 2 q 2 4 上のナトリウムチャネル遺伝子の

クラスター中に位置していて、ニューロン電位依存性ナトリウムチャネルの  $Na_v 1.1$  として知られている 細孔形成サブユニットをコードする。SCN1A 遺伝子は、概ね 100 kb のゲノム DNA に拡がって、26 個のエクソンを含む。SCN1A タンパク質は、それぞれが 6 回膜貫通型セグメントを有する、4 つのドメインから成る。ドメイン 1 とドメイン 2 の間にある細胞質ループ中の 11 個のアミノ酸の存在又は非存在において異なる長いアイソフォームと短いアイソフォームを生じる、エクソン 11 における 2 種のスプライス変異体が同定されている (Miller, et al., 1993-2015 及び Mulley, et al., 2005, 25, 535-542、参照により本明細書に組み込まれる)。

#### 【0151】

[00170] SCN1A 遺伝子における選択的スプライシング事象は、非産生性 mRNA 転写産物をもたらす可能性があって、これが次に異常なタンパク質発現をもたらす可能性がある。SCN1A 遺伝子における選択的スプライシング事象を標的にし得る治療薬剤は、DS 患者中の機能的タンパク質の発現レベルを調節する、及び / 又は異常なタンパク質発現を阻害することができる。そのような治療薬剤を使用して、SCN1A タンパク質欠損症によって引き起こされる病態を治療することができる。

10

#### 【0152】

[00171] 非産生性 mRNA 転写産物をもたらす可能性がある選択的スプライシング事象の 1 つは、ナンセンス変異依存性 mRNA 分解を誘導する可能性がある、mRNA 転写産物における余分なエクソンの包含である。本開示は、SCN1A の選択的スプライシングを調節して、タンパク質をコードする成熟 mRNA と、それにより翻訳される機能的 SCN1A タンパク質の産生を増加させるための組成物と方法を提供する。これらの組成物と方法には、エクソンスキッピングを引き起こして、SCN1A プレ mRNA の恒常的なスプライシングを促進させることが可能であるアンチセンスオリゴマー (ASO) が含まれる。様々な態様では、SCN1A タンパク質欠損症によって引き起こされる病態を治療するために本開示の方法を使用して、機能的 SCN1A タンパク質を増加させることができる。

20

#### 【0153】

[00172] いくつかの場合において、疾患又は病態は、SMEB である。

[00173] いくつかの場合において、疾患又は病態は、GEFS+ である。

[00174] いくつかの場合において、疾患又は病態は、熱性痙攣 (例、家族性熱性痙攣、3A) である。

30

#### 【0154】

[00175] いくつかの場合において、疾患又は病態は、自閉症 (自閉症スペクトル障害又は ASD としても知られている) である。

[00176] いくつかの場合において、疾患又は病態は、偏頭痛 (例、家族性片麻痺性偏頭痛、3) である。

#### 【0155】

[00177] いくつかの場合において、疾患又は病態は、アルツハイマー病である。

[00178] いくつかの態様では、疾患又は病態は、SCN2A 脳症である。

[00179] いくつかの態様では、疾患又は病態は、SCN8A 脳症である。

40

#### 【0156】

[00180] いくつかの態様では、疾患又は病態は、SCN5A 不整脈である。

[00181] 態様 (複数) において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当該技術分野で知られているどの方法によっても、当該アンチセンスオリゴヌクレオチドの血液脳関門を通過する浸透を促進させることが可能な 1 以上の薬剤とともに投与される。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 6,632,427 号「Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons (延髄運動ニューロンへのアデノウイルスベクター媒介性の遺伝子導入)」には、アデノウイルスベクターの投与による薬剤の運動ニューロンへの送達について記載されている。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 6,756,523 号「Adenovirus vectors for th

50

e transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain (中枢神経系、特に脳の細胞中へ異種遺伝子を導入するためのアデノウイルスベクター)」には、ベクターの脳(例、線条体、視床、海馬、黒質)への直接的な送達について記載されている。

【0157】

[00182] 態様(複数)において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、望まれる医薬特性又は薬力学的特性を提供する薬剤と連結されるか又はコンジュゲートされる。態様(複数)において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、血液脳関門を通過する浸透又は輸送を促進させることが当該技術分野で知られている物質(例えば、トランスフェリン受容体に対する抗体)へ結合させる。態様(複数)において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、該アンチセンス化合物をより有効にするか又は血液脳関門を通過する輸送を高めるために、ウイルスベクターと連結させる。態様(複数)では、糖(例、メソエリスリトール、キシリトール、D(+ )ガラクトース、D(+ )ラクトース、D(+ )キシロース、ズルシトール、ミオイノシトール、L(- )フルクトース、D(- )マンニトール、D(+ )グルコース、D(+ )アラビノース、D(- )アラビノース、セロビオース、D(+ )マルトース、D(+ )ラフィノース、L(+ )ラムノース、D(+ )メリビオース、D(- )リボース、アドニトール、D(+ )アラビトール、L(- )アラビトール、D(+ )フコース、L(- )フコース、D(- )リキソース、L(+ )リキソース、及びL(- )リキソース)、又はアミノ酸(例、グルタミン、リジン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、チロシン、バリン、及びタウリン)の注入によって、浸透圧血液脳関門破壊に役立てる。例えば、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第9,193,969号「Compositions and methods for selective delivery of oligonucleotide molecules to specific neuron types (特定のニューロン型へのオリゴヌクレオチド分子の選択的送達のための組成物と方法)」、米国特許第4,866,042号「Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier (遺伝物質の血液脳関門を通過する送達のための方法)」、米国特許第6,294,520号「Material for passage through the blood-brain barrier (血液脳関門の通過のための物質)」、及び米国特許第6,936,589号「Parenteral delivery systems (非経口送達システム)」には、血液脳関門浸透を高めるための方法と物質について記載されている。

【0158】

[00183] 態様(複数)では、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第9,193,969号に記載される方法を使用して、本発明のASOをドーパミン再取り込み阻害剤(DRI)、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)、ノルアドレナリン再取り込み阻害剤(NRI)、ノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤(NDRI)、及びセロトニン-ノルエピネフリン-ドーパミン再取り込み阻害剤(SNDRI)へ結合させる。

【0159】

[00184] 態様(複数)では、当該方法及び組成物を使用して治療される被験者について、当該技術分野で知られていて記載されている方法を使用して、病態の改善を評価する。

【0160】

エクソンススキッピングを誘導する追加のASOを同定する方法

[00185] 本開示の範囲内にはまた、SCN1A NIE含有プレmRNAのエクソンススキッピングを誘導するASOを同定又は決定するための方法がある。例えば、ある方法は、SCN1A NIE含有プレmRNAのシュードエクソンススキッピングを誘導するASOを同定又は決定することを含み得る。標的イントロンのスプライシングの割合及び/又は程度を改善するASOを同定又は決定するために、プレmRNAの標的領域内にある様々なヌクレオチドへ特異的にハイブリダイズするASOについてスクリーニングし得る。いくつかの態様では、ASOは、スプライシングレプレッサー(複数)/サイレンサーの結合部位(複数)を遮断するか又はそれに干渉し得る。エクソンの標的領域へハイブリ

10

20

30

40

50

ダイズするときに所望される効果（例、シュードエクソンスキッピング、タンパク質又は機能的RNAの産生）を生じるASOを同定する（決定する）ために、当該技術分野で知られているどの方法も使用し得る。これらの方法は、包含されたエクソンの横にあるイントロン中、又は包含されていないエクソン中の標的化領域へ結合することによって包含されたエクソンのエクソンスキッピングを誘導するASOを同定するために使用することができる。使用し得る方法の1例を以下に提供する。

【0161】

[00186] プレ mRNA の標的領域へハイブリダイズするように設計されたASOを使用して、ASO「ウォーク」と呼ばれる1回目のスクリーニングを実施し得る。例えば、ASOウォークにおいて使用されるASOは、包含されたエクソンの3'スプライス部位の概ね100ヌクレオチド上流（例えば、標的/包含されたエクソンの上流に位置するエクソンの配列の一部）～標的/包含されたエクソンの3'スプライス部位の概ね100ヌクレオチド下流、及び/又は包含されたエクソンの5'スプライス部位の概ね100ヌクレオチド上流～標的/包含されたエクソンの5'スプライス部位の概ね100ヌクレオチド下流（例えば、標的/包含されたエクソンの下流に位置するエクソンの配列の一部）を5個のヌクレオチドごとにタイルする（tile）ことができる。例えば、標的/包含されたエクソンの3'スプライス部位に対して+6～+20にあるヌクレオチドへ特異的にハイブリダイズするように、長さ15ヌクレオチドの第1ASOを設計し得る。標的/包含されたエクソンの3'スプライス部位に対して+11～+25にあるヌクレオチドへ特異的にハイブリダイズするように、第2ASOを設計し得る。ASOは、プレ mRNA の標的領域を網羅するように設計される。態様（複数）において、ASOは、より綿密に、例えば、1、2、3、又は4個のヌクレオチドごとにタイルすることができる。さらに、ASOは、5'スプライス部位の100ヌクレオチド下流～3'スプライス部位の100ヌクレオチド上流までタイルすることができる。いくつかの態様では、ASOは、3'スプライス部位の約1,160ヌクレオチド上流～5'スプライス部位の約500ヌクレオチド下流までタイルすることができる。いくつかの態様では、ASOは、3'スプライス部位の約500ヌクレオチド上流～3'スプライス部位の約1,920ヌクレオチド下流までタイルすることができる。

【0162】

[00187] 1以上のASO又は対照ASO（スクランブル配列、即ち標的領域へハイブリダイズすると予測されない配列のあるASO）を、標的プレ mRNA（例、本明細書に記載されるNIE含有プレ mRNA）を発現する疾患関連細胞系の中へ、例えばトランスフェクションによって送達する。このASOのそれぞれのエクソンスキッピング効果について、当該技術分野で知られているどの方法によっても、実施例4に記載されるように、例えばスプライスジャンクションを網羅するプライマーを使用する逆転写酵素（RT）-PCRによって評価し得る。対照ASO処理細胞に比較して、ASO処理細胞において、包含されたエクソンを含有する領域（例えば、NIEの横にあるエクソンが含まれる）を網羅するプライマーを使用して産生される、より長いRT-PCR産物の低下又は非存在は、標的NIEのスプライシングが亢進されたことを示唆する。いくつかの態様では、エクソンスキッピング効率（又はNIE含有イントロンをスプライシングするスプライシング効率）、スプライスされたプレ mRNA のスプライスされないプレ mRNA に対する比、スプライシングの割合、又はスプライシングの程度は、本明細書に記載されるASOを使用して改善され得る。標的プレ mRNA によってコードされるタンパク質又は機能的RNAの量についても評価して、それぞれのASOが所望される効果（例えば、機能的タンパク質産生の亢進）を達成したかどうかを判定することができる。ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡検査法、及びELISAのような、タンパク質産生について評価する、及び/又はそれを定量するための当該技術分野で知られているどの方法も使用することができる。

【0163】

[00188] プレ mRNA の標的領域へハイブリダイズするように設計されたASOを使用して、ASO「マイクロウォーク」と呼ばれる2回目のスクリーニングを実施し得る。

A S O マイクロウォークにおいて使用される A S O は、1 個のヌクレオチドごとにタイルされて、A S O とハイブリダイズするときにエクソンスキッピング（又は N I E のスプライシング亢進）が生じる、プレ m R N A のヌクレオチド酸配列をさらに精緻化する。

【0164】

[00189] 1 ヌクレオチド刻みに隔てた A S O、並びにより長い A S O（典型的には 18 ~ 25 ヌクレオチド）が関与する A S O「マイクロウォーク」の手段によって、標的イントロンのスプライシングを促進させる、A S O によって明確化される領域をより詳細に探究する。

【0165】

[00190] 上記の A S O ウォークについて記載したように、A S O マイクロウォークは、標的プレ m R N A を発現する疾患関連細胞系の中へ、例えばトランスフェクションによって、1 以上の A S O、又は対照 A S O（スクランブル配列、即ち標的領域へハイブリダイズすると予測されない配列のある A S O）を送達することによって実施される。この A S O のそれぞれのスプライシング誘導効果について、当該技術分野で知られているどの方法によっても、本明細書に記載されるように（例えば、実施例 4 を参照のこと）、例えば、N I E を網羅するプライマーを使用する逆転写酵素（R T）- P C R によって評価し得る。対照 A S O 処理細胞に比較して、A S O 処理細胞において、N I E を網羅するプライマーを使用して産生される、より長い R T - P C R 産物の低下又は非存在は、エクソンスキッピング（又は N I E 含有標的イントロンのスプライシング）が亢進されたことを示唆する。いくつかの態様では、エクソンスキッピング効率（又は N I E 含有イントロンをスプライシングするスプライシング効率）、スプライスされたプレ m R N A のスプライスされないプレ m R N A に対する比、スプライシングの割合、又はスプライシングの程度は、本明細書に記載される A S O を使用して改善され得る。標的プレ m R N A によってコードされるタンパク質又は機能的 R N A の量についても評価して、それぞれの A S O が所望される効果（例えば、機能的タンパク質産生の亢進）を達成したかどうかを判定することができる。ウェスタンブロットティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡検査法、及び E L I S A のような、タンパク質産生について評価する、及び / 又はそれを定量するための当該技術分野で知られているどの方法も使用することができる。

【0166】

[00191] プレ m R N A のある領域へハイブリダイズするときにエクソンスキッピング（又は N I E 含有イントロンのスプライシングの亢進）を生じてタンパク質産生を増加させる A S O について、動物モデル（例えば、全長ヒト遺伝子がノックインされたトランスジェニックマウスモデル、又は疾患のヒト化マウスモデル）を使用して生体内で（in vivo）試験し得る。A S O の投与に適した経路は、A S O の送達が所望される疾患及び / 又は細胞種に依って変わる場合がある。A S O は、例えば、髄腔内注射、脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、硝子体内注射、又は静脈内注射によって投与し得る。投与に続いて、例えば、スプライシング（効率、割合、程度）とタンパク質産生について当該技術分野で知られていて本明細書に記載される方法によって評価することによって、モデル動物の細胞、組織、及び / 又は臓器について評価して、A S O 処理の効果を判定することができる。動物モデルは、疾患又は疾患重症度の表現型又は行動を示すものでもよい。

【0167】

[00192] 本明細書の様々な実施例に記載されるように、ヒト S C N 1 A 遺伝子中のエクソン 20 x は、マウス S C N 1 A 遺伝子中エクソン 21 x と同等である。

[00193] 本開示の範囲内にはまた、N M D 阻害剤（例えば、シクロヘキシミド）の存在下に N M D 誘導エクソンを同定するか又は立証するための方法がある。例示の方法を図 3 と実施例 2 に提供する。

【0168】

具体的な態様

[00194] 態様 1 . ナンセンス変異依存性 R N A 分解誘導エクソンを含有する m R N A（N M D エクソン m R N A）であって S C N 1 A タンパク質をコードする m R N A を有

10

20

30

40

50

している細胞において、SCN1Aタンパク質の発現を調節する方法であって、該細胞へ治療薬剤を接触させ、それにより治療薬剤は、SCN1Aタンパク質をコードするNMDエクソンmRNAからのNMDエクソンのスプライシングを調節し、それによってSCN1Aタンパク質をコードするプロセシングされたmRNAのレベルを調節し、そして、該細胞におけるSCN1Aタンパク質の発現を調節する、ことを含んでなり、ここで該治療薬剤は、SCN1AをコードするNMDエクソンmRNAの標的化部分へ結合し、そして該標的化部分は、NMD誘導エクソン(NIE)の5'端から約1000ヌクレオチド上流~NIEの5'端から約100ヌクレオチド上流；又はNIEの3'端の約100ヌクレオチド下流~NIEの3'端の約1000ヌクレオチド下流にある、前記方法。

【0169】

10

[00195] 態様2. 疾患又は病態を治療することの必要な被験者の細胞においてSCN1Aタンパク質の発現を調節することによって、該被験者においてそれを治療する方法であって、該細胞中のNMDエクソンを含有してSCN1AをコードするmRNAからのナンセンス変異依存性mRNA分解誘導エクソン(NMDエクソン)のスプライシングを調節する治療薬剤と該被験者の該細胞とを接触させ、それによりSCN1Aタンパク質をコードするプロセシングされたmRNAのレベルを調節し、そして、該被験者の該細胞におけるSCN1Aタンパク質の発現を調節する、ことを含んでなり；ここで該治療薬剤は、SCN1AをコードするNMDエクソンmRNAの標的化部分へ結合し、そして該標的化部分は、NMD誘導エクソン(NIE)の5'端から約1000ヌクレオチド上流~NIEの5'端から約100ヌクレオチド上流；又はNIEの3'端の約100ヌクレオチド下流~NIEの3'端の約1000ヌクレオチド下流にある、前記方法。

20

【0170】

[00196] 態様3. 治療薬剤が、標的化部分の領域からのNMDエクソンのスプライシングに関与する因子の結合に干渉する、態様1又は2の方法。

[00197] 態様4. 標的化部分が、NIEの5'端の最大でも約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド上流にある、態様1又は2の方法。

【0171】

30

[00198] 態様5. 標的化部分が、NIEの5'端の少なくとも約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約5ヌクレオチド、約4ヌクレオチド、約2ヌクレオチド、約1ヌクレオチド上流にある、態様1又は2の方法。

【0172】

[00199] 態様6. 標的化部分が、NIEの3'端の最大でも約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド下流にある、態様1又は2の方法。

40

【0173】

[00200] 態様7. 標的化部分が、NIEの3'端の少なくとも約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約5ヌクレオチド、約4ヌクレオチド、約2ヌクレオチド、約1ヌクレオチド下流にある、態

50

様 1 又は 2 の方法。

【 0 1 7 4 】

[00201] 態様 8 . 治療薬剤がアンチセンスオリゴマー ( A S O ) である、態様 1 ~ 7 のいずれか 1 つの方法。

[00202] 態様 9 . A S O が配列番号 1 2 ~ 7 3 1 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、又は 1 0 0 % 同一である配列を含む、態様 8 の方法。

【 0 1 7 5 】

[00203] 態様 1 0 . 治療薬剤が、S C N 1 A タンパク質をコードするプロセシングされた m R N A からの N M D エクソンの排除を促進させる、態様 1 ~ 9 のいずれか 1 つの方法。

10

【 0 1 7 6 】

[00204] 態様 1 1 . 治療薬剤と接触した細胞における、S C N 1 A タンパク質をコードするプロセシングされた m R N A からの N M D エクソンの排除が、対照細胞における、S C N 1 A タンパク質をコードするプロセシングされた m R N A からの N M D エクソンの排除と比較して、約 1 . 1 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 5 ~ 約 1 0 倍、約 2 ~ 約 1 0 倍、約 3 ~ 約 1 0 倍、約 4 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 1 ~ 約 5 倍、約 1 . 1 ~ 約 6 倍、約 1 . 1 ~ 約 7 倍、約 1 . 1 ~ 約 8 倍、約 1 . 1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3 . 5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、又は少なくとも約 1 0 倍増加する、態様 1 0 の方法。

20

【 0 1 7 7 】

[00205] 態様 1 2 . 治療薬剤が、S C N 1 A タンパク質をコードするプロセシングされた m R N A の該細胞中のレベルを増加させる、態様 1 0 の方法。

[00206] 態様 1 3 . 治療薬剤と接触した細胞における、S C N 1 A タンパク質をコードするプロセシングされた m R N A の量が、対照細胞における、S C N 1 A タンパク質をコードするプロセシングされた m R N A の全量と比較して、約 1 . 1 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 5 ~ 約 1 0 倍、約 2 ~ 約 1 0 倍、約 3 ~ 約 1 0 倍、約 4 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 1 ~ 約 5 倍、約 1 . 1 ~ 約 6 倍、約 1 . 1 ~ 約 7 倍、約 1 . 1 ~ 約 8 倍、約 1 . 1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3 . 5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、又は少なくとも約 1 0 倍増加する、態様 1 0 の方法。

30

【 0 1 7 8 】

[00207] 態様 1 4 . 疾患又は病態が、N a v 1 . 1 における機能欠失変異によって誘導される、態様 2 の方法。

[00208] 態様 1 5 . 疾患又は病態が S C N 1 A 遺伝子のハプロ不全に関連し、ここで該被験者は、機能的 S C N 1 A をコードする第 1 対立遺伝子と、S C N 1 A が産生されないか又は低下したレベルで産生される第 2 対立遺伝子、又は非機能的 S C N 1 A 又は部分機能的 S C N 1 A をコードする第 2 対立遺伝子とを有する、態様 1 4 の方法。

40

【 0 1 7 9 】

[00209] 態様 1 6 . 疾患又は病態が脳症である、態様 1 4 の方法。

[00210] 態様 1 7 . 脳症がてんかん性脳症である、態様 1 6 の方法。

[00211] 態様 1 8 . 疾患又は病態が、ドラベ症候群 ( D S ) ; 乳児重症ミオクロニーてんかん ( S M E I ) - 辺縁型 ( S M E B ) ; 熱性痙攣 ( F S ) ; 全般性てんかん熱性痙攣プラス ( G E F S + ) ; てんかん性脳症、早期乳児、1 3 ; 潜在性全般性てんかん ; 潜在性焦点性てんかん ; ミオクロニー失立発作てんかん ; レノックス・ガスト症候群 ; ウ

50

エスト症候群；特発性痙攣；早期ミオクロニー脳症；進行性ミオクロニーてんかん；小児交互性片麻痺；分類不能てんかん性脳症；てんかんにおける予期せぬ突然死（S U D E P）；洞不全症候群１；自閉症；又は乳児悪性遊走性部分発作である、態様１４の方法。

【０１８０】

[00212] 態様１９． G E F S + が、全般性てんかん熱性痙攣プラス２型である、態様１８の方法。

[00213] 態様２０． 熱性痙攣が家族性熱性痙攣３Ａである、態様１８の方法。

【０１８１】

[00214] 態様２１． S M E B が、全般性棘徐波のない S M E B（S M E B - S W）、ミオクロニー発作のない S M E B（S M E B - M）、S M E I の１より多い特徴を欠いている S M E B（S M E B - O）、又は全身性強直性間代性発作を伴う小児難治性てんかん（I C E G T C）である、態様１８の方法。

10

【０１８２】

[00215] 態様２２． A S O が配列番号 7 2 又は 4 3 2 より選択される配列から成る、態様１又は２の方法。

[00216] 態様２３． A S O が配列番号 7 3 又は 4 3 3 より選択される配列から成る、態様１又は２の方法。

【０１８３】

[00217] 態様２４． A S O が配列番号 7 6 又は 4 3 6 より選択される配列から成る、態様１又は２の方法。

20

[00218] 態様２５． A S O が配列番号 1 8 1 又は 5 4 1 より選択される配列から成る、態様１又は２の方法。

【０１８４】

[00219] 態様２６． A S O が配列番号 2 2 0 又は 5 8 0 より選択される配列から成る、態様１又は２の方法。

[00220] 態様２７． ナンセンス変異依存性 R N A 分解誘導エクソンを含有する m R N A（N M D エクソン m R N A）であって S C N 1 A タンパク質をコードする m R N A を有する細胞において、S C N 1 A タンパク質の発現を調節する方法であって、該細胞へ治療薬剤を接触させ、それにより治療薬剤は、S C N 1 A タンパク質をコードする N M D エクソン m R N A からの N M D エクソンのスプライシングを調節し、それにより S C N 1 A タンパク質をコードするプロセシングされた m R N A のレベルを調節し、そして、該細胞における S C N 1 A タンパク質の発現を調節する、ことを含んでなり、ここで該治療薬剤は、S C N 1 A をコードする N M D エクソン m R N A の標的化部分へ結合し、そして該標的化部分は、N M D 誘導エクソン（N I E）の 5' 端から約 1 0 0 0 ヌクレオチド上流 ~ N I E の 3' 端の約 1 0 0 0 ヌクレオチド下流にある、前記方法。

30

【０１８５】

[00221] 態様２８． 疾患又は病態を治療することが必要な被験者の細胞において S C N 1 A タンパク質の発現を調節することによって、該被験者においてそれを治療する方法であって、該細胞中の N M D エクソンを含有して S C N 1 A をコードする m R N A からのナンセンス変異依存性 m R N A 分解誘導エクソン（N M D エクソン）のスプライシングを調節する治療薬剤と該被験者の該細胞とを接触させ、それにより、S C N 1 A タンパク質をコードするプロセシングされた m R N A のレベルを調節し、そして、該被験者の該細胞における S C N 1 A タンパク質の発現を調節する、ことを含んでなり；ここで該治療薬剤は、S C N 1 A をコードする N M D エクソン m R N A の標的化部分へ結合し、そして該標的化部分は、N M D 誘導エクソン（N I E）の 5' 端から約 1 0 0 0 ヌクレオチド上流 ~ N I E の 3' 端の約 1 0 0 0 ヌクレオチド下流にある、前記方法。

40

【０１８６】

[00222] 態様２９． 配列番号 1 2 ~ 7 3 1 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、又は 1 0 0 % 同一である配列を含んでなるアンチセンスオリゴマー（A S O）。

50

## 【 0 1 8 7 】

[00223] 態様 3 0 . 配列番号 1 2 ~ 7 3 1 より選択される配列から成るアンチセンスオリゴマー ( A S O ) 。

[00224] 態様 3 1 . 疾患又は病態を治療することが必要な被験者の細胞において S C N 1 A タンパク質の発現を調節することによって、該被験者においてそれを治療する方法であって、態様 2 9 又は 3 0 の A S O と該被験者の該細胞とを接触させることを含んでなる、前記方法。

## 【 0 1 8 8 】

[00225] 態様 3 2 . 態様 2 9 又は 3 0 の A S O を含んでなるキット。

[00226] 本発明の好ましい態様について本明細書において示して記載してきたが、当業者には、このような態様が実施例によってのみ提供されることが明らかであろう。当業者には、本発明の精神より逸脱することなく、数多くの変形態様、変化態様、及び置換態様が今や思いつくだらう。本発明を実施する場合には、本明細書に記載される本発明の態様に対する様々な代替態様を利用し得ると理解されたい。以下の特許請求項は、本発明の範囲を明確化するものであって、これら特許請求項の範囲内にある方法及び構造とそれらの均等物は、それに含まれると企図される。

## 【実施例】

## 【 0 1 8 9 】

[00227] 本発明は、以下の実施例によってより具体的に例解されよう。しかしながら、本発明は、これらの実施例によっていかなる方法でも制限されないと理解されたい。

実施例 1 : 次世代配列決定法を使用する R N A s e q による、S C N 1 A 転写産物中の N M D 誘導エクソン包含事象の同定

[00228] 次世代配列決定法を使用する全トランスクリプトームショットガン配列決定を行って S C N 1 A 遺伝子によって産生される転写産物のスナップショットを明らかにして、N I E 包含事象を同定した。この目的のために、H C N ( ヒト皮質ニューロン ) の核画分と細胞質画分よりポリ A + R N A を単離して、Illumina ' s TruSeq Stranded mRNA library Prep Kit を使用して c D N A ライブラリーを構築した。このライブラリーについてペアエンド ( pair-end ) 配列決定して生じた 1 0 0 ヌクレオチドの読取り ( reads ) をヒトゲノム ( 2009 年 2 月、G R C h 3 7 / h g 1 9 アセンブリー ) ヘマッピングした。S C N 1 A についての配列決定結果を図 2 に示す。簡潔に言えば、図 2 は、U C S C ゲノムブラウザー ( UCSC Genome Informatics Group ( ゲノムインフォマティクスグループ ) ( 生体分子科学・工学センター、カリフォルニア州立大学、サンタクルーズ、1156 High Street、サンタクルーズ、CA95064 ) によって操作される ) を使用して可視化されて、例えば、Rosenbloom, et al., 2015, 「The UCSC Genome Browser database ( U C S C ゲノムブラウザーデータベース ) : 2015 更新版」 Nucleic Acids Research 43, Database Issue, doi: 10.1093/nar/gku1177 ) によって記載された、マッピングされた読取りを示し、読取りの範囲と数は、ピークシグナルによって推定することができる。ピークの高さは、特別な領域中の読取りの密度によって与えられる発現のレベルを示す。上パネルは、S C N 1 A 遺伝子の拡大したグラフ図を示す。1 0 0 種の脊椎動物種にわたる保存レベルをピークとして示す。最高のピークがエクソン ( 黒色のボックス ) に対応するのに対し、大多数のイントロン ( 矢じりのあるライン ) では、ピークが観測されない。イントロン 2 0 ( N M \_ 0 0 6 9 2 0 ) には保存のピークが同定されて、中央パネルにおいて示した。保存された配列の精査により、3 ' スプライス部位と 5 ' スプライス部位 ( 下線を施した配列 ) が横にある、6 4 b p のエクソン様配列 ( 下パネル、灰色で強調した配列 ) を同定した。このエクソンの包含がフレームシフトをもたらすので、エクソン 2 1 中に未成熟終止コドンを導入して、この転写産物を N M D の標的とする。

## 【 0 1 9 0 】

[00229] 例示の S C N 1 A 遺伝子、プレ m R N A 、エクソン、及びイントロンの配列を表 1 に要約する。それぞれのエクソン又はイントロンの配列を表 2 に要約する。

## 【 0 1 9 1 】

## 【表 1】

表 1. 標的SCN1A遺伝子とプレmRNA配列のリスト

種	配列番号	配列タイプ
ヒト	配列番号 1	SCN1A遺伝子 (NC_000002.12)
	配列番号 2	SCN1AプレmRNA (例えば、SCN1A mRNA NM_006920.5 をコード)
	配列番号 3	イントロン 2 2 遺伝子 (GRCh38/hg38 アセンブリー) (座標: chr2 166002754 166007229)
	配列番号 4	エクソン 2 3 (エクソン 2 0 x) 遺伝子 (GRCh38/hg38 アセンブリー) (座標: chr2 166007230 166007293)
	配列番号 5	イントロン 2 3 遺伝子 (GRCh38/hg38 アセンブリー) (座標: chr2 166007294 166009718)
	配列番号 6	I VS 2 2 + I VS 2 3 プレmRNA (イントロン 2 2 及び 2 3 のプレmRNA配列)
	配列番号 7	エクソン 2 3 (エクソン 2 0 x) プレmRNA
マウス	配列番号 8	SCN1A遺伝子 (NC_000068.7)
	配列番号 9	SCN1AプレmRNA (例えば、SCN1A mRNA NM_001313997.1 をコード)
	配列番号 10	イントロン 2 1 プレmRNA
	配列番号 11	エクソン 2 1 x プレmRNA

## 【 0 1 9 2 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表2. SCN1A プレ mRNA 転写産物中の標的エクソン又はイントロンの配列

配列 番号	配列タイプ	配列
3	イントロン 2 2 遺伝子	<p>gtaagaaaaatgaaagaacctgaagtattgtatatagccaaaataaactaaattaaatttagaaaaag  gaaaaatcatgcatgcaaaagggaatggcaaatcttgcaaaattgctactttattgttttatctgttgc  atatctacttctaggtgatgatgcaagagaaataggectctcttgaaatgataataatcatcttatctgc  tgtcttatttaaatgactttatttctaatccatcttgggagtctcttacaactatataacaaaa  aaagctgatgcattattaaagtactatgtgaatgatataatggtaatctaaagtaaatctatatcag  gtacttattcttgtgatgatatactgtacttaacgagtttcttgaaaataatgtgaatcacacatgt  gcctaagtatgagtgttaagaaaaaatgaaaggagtgtttaaacttttgcctgtataatgccaaagt  ttgcattatttgaatatattcaagattagatggtagatattaggtgtgactgaatttataaaactag  taataactaacttaagattacatacaaatccacatcatctttataacaataaagtaaaacacttataat  gaacagaaaaataatttgaactcattactataggttaattatacattaccttaacttgcatcttatt  ggtcagagtcacacaaaatgttatttctcttttcaagatgcaataatcatttccatcatgcaataa  cagattagaattttgccattattgacttatttccatgccctttttacggcatgaagcattagttta  tagatatataataaaaaattagtctcttttttataaaaaaatattatcaaaaaaaacactga  attgtgtgattccaatagaaaaacactgctcttcacctcctaagggtgtagttacttttatgaaacta  agctgtattgtgacttccatttgcactttgttagattgtttatagccttatgtctcttctcaagctct  attataaatgtcactttgtgaacgtaggacttgccttcgatttccctaacatataatgaaaactttgt  cctcattatcgacaactcagaacaataatacaagtagtccctctttatttctcacagagagcctcaa  atcttcacacaaatgttaacagaaattatctctgggtgtataagaattaagtctgttttccaattaaa  tgtcactttgtttgttgcagactggcagtttgcagttctggagaaaaaaatgtcatttgtgtacattc  tacttgaaaacatgttgctgaatcaaaaataataattttatatggcttggaaatctgacaatgcta  aacatttgaaaataattataaaccttttacatttgaccatttgaagtttattaaattcattgggtcaagt  gtcagataattccatacattacacttcatcttataaaaaagctgatcttatcggtatacttttaatt  ttctcagaataaaccatactataatttataatcaataatgccttttatattaaaagaggttagtttt  gaaacttgagtttttagacataaaatccttataaatgctgatagtgatataactaaatagtttaaatgg  cagatttatgaataggctctatttctcataatgacaacatacacacagcactaaaatgactaatctct  tcaatacgtgtttggcatgtagagtcaaaataacgttataattgattctatttttatacttctagtgt  tttggatattttatttgtaaaaataataatcatgaatgatgggtgaggttggaataagaatgatgatta  tgattgggaagtggagatttgaacatgctcagaaactctcatttaattctttgcccagcagcataaaat  cacaatagctgcgtcaaaagcgaactcaggcactcattttattttgtgtgtgtatttttcaaaag  catgtgcttttatgcaacattactgaataaagcatgtgtacagtgtgataagaagtttagaaagtaa  caataaattatcatcagttgcactttgtgttttgcattttatgcacatttctggctgacagcttt  taaacatttattgtatttcaaatttccagtcacaaattttcaacttgtaaaattaaactgagtgaaattg  atgtcgtgaatctcagggtaaaaataaaatttgtgtttaaattgtatttttaatttctaacttagga  aatctttaaataccttcttttcaaaagaactcaagtcctaatggatagggaacagacggagagcatca  tgaacaaaaagtaacaccaaatgttctgtcatatcagatttctaactaataacaaactatatttcta  ttttgtatag</p>
4	エクソン 2 3 (エクソン 20x) 遺伝子	GATAATCTTGCTCCAACCTGGATGGGTGGAGCGCTGGTTCCTCCCTGAGCCCTTTATTATGG
5	イントロン 2 3 遺伝子	<p>gtactgtattacccttttgcacttttaactccttgactgtgacttatgtgtagtgagggtgaggagg  gattgggaagggtactattattgcaccacagtagggaaaaatacattattacatcctaateccctcttt  tcaattgtcttaaatcttattgaaaaaaacacattatgaatttaccctctgtggattttaacc  ccaatgggtgatattcttattaaagtttcatgaatatgatttagttatgtgtatatggagttaaccatc  ttfggggagattactggattggtagggcggggacccctgggtgataatgattatgtgaaaaacaatt  taacttgttaagctcatgatactgtttgaggcatacagccctgctgttttagtacattggctgggtcc  tgaaaaattaccagttagataccatcagttgattattgatattgatgagcagatactagggtgcaattt  tcagggttcataaagactggattgattgtgaccactctcattttttattgtgaagttcatatggggtt  atcttcaaaatgttaacaaggcaaaaataattaaagaaatagttgaataagcacatgtgaattgtgtt</p>

【 0 1 9 3 】

10

20

30

40

【表 2 - 2】

	<p>             taaacaaaaagtagaataaaaaaatccacttatttgaattatgcagaatagaatacataccatagaat              aaacaaaaacgtcttatcatgagtattatagataaaatttaggcataaacctcactctttagaataagt              aactcccaactaactttcttaggattttaaaaacataacacagtgaaaacatacataaataactctaca              ttttatttattcttaagtttaagtgattatatacaagaagaaggtttatttgcagagacagaaaaag              tcagaattttgtttggatcaccaatataatcatagcttacaaaaaaactgtcttaattaaaaccacaa              cataatttttttagatttttaagaagattctattattctctttatacttaaaaaatggatgattccta              ctttggccactttttttttttttcacatagattttctttttttctattagagaagcactagaattcatg              aatagtgttgatttgaagttcaagtaatttaattcagataaaaagacatttctgcatgtatgaaaattt              ctaatgtgaatttgcatttttaattatcaatccttcatttagttagacttatttttaaaaatgcagg              aatgaaccagaaatagaattgggtgtgctagagtagagaaactttattgatgattgttttgaaaaaa              agctcttgagaagaacaacctctagtagcatttaattcattaagtagctctttctcagacatttct              ctttcatgtagcctgaagttcaatttgaatttggcttttccattttcagactaattctgcctac              tttcttcccccataagaaccaattactgcagctttattgagactgaaaaaagttaatacacctctct              tttgctgaaccaaggaatggcttggaaactctgggaaaagacaatctttctatgatcttctattgtct              aatttaatacatcataaataatgactatagctttgtataataaactccccataactgtgccagatgttt              ctaagataaagttattttatgttcacaaaaaaataaaacttttcttgggccaatgtatgccaaact              tgcaaatcatatctgaagtgcactgctgcagagtacatgcttgcgtcataaattccatagattcgt              ttaactctaaatcaatccccagtttcaagtaaacctctcaaacatattacctaaagcacaaacttctcc              ctgtgctcagttccttaattattctcatcccatattcagaaataaacatttaaaaattatgctttgatca              ataaataactaacttaaaactttgcttcatttaaccattcatttttgcacatttattttatccctatat              tcaaaagctctctggtatgtcttatattcaagacactcaaggcctgggaagattcacgaacatattgt              gcatcttaaattttagaaaaatctacaatctgtcaggattacactgaactctagtagacagtaaatg              ggtaccagataaagtgaggagcaactcttccacgtagactggaacagcactaaatgctatttataggeta              ctttctgaacttaacttgttttaacctcatttttctcatatgccaaatgagaacgcaatactgaattat              ctgtacagttctgttgcagtagaattctgattcttgaattcaaaaggggaaaacattcctcttatttt              tggaggctaaactgggggacaaagttaggctccatgaaagaagtgtctatttgaactaaagcctttaaga              ggggagagattttcagaagaggagctattagacaaggaatttcaatgtaaatggcatctcaatcacctg              gcaattatattagcacacgggtatttatattaattgaagtgcatgaagtatagatgaccaggggaagtta              aaactggaaatataagattgtggagtgatgtgaataccaaggttaagaaaaatattgttagttaccagag              agcccaataaataactttcaagtgaggacttggggaagattaattcatcttacatagattaaatgaaggag              aaggttaggagacagatgacagtgcaggtatgaaataacagagggcaggtctaggtggtagctgtgaga              atggaagaagaggtggcaagctgagaaactttcaagaaaaaatgtgagacaggtaatgtgaaagaa              aatcgagaaataggtatagataatcagtgcttctgtcactcttaaattgggtgttgaaggcaaaatac              gtatttttaattagctctgtgtatcacactagaacagcattgtaatctggatagtggaacaaatat              tcagaaaagaagggaatagtaacttgatttcaatttccaaatctctaatctgaaagaaatctaatctct              attcatccatttaaaataaattatataacgagaatttatgaagtcattgtattaatgcagacagctcag              atgagataaaggcaaggtgcagtgctcagcttggtagttgcatcgccacatcatttgggtctgcctgg              ataactcaaccaaatatttttatactcatccctccacettgttcattactggattcttatttttct              tttggcccaacttatcacactgttttatgttccccagaaggcctagagttctttacaggctttaaacagg              gatcagaagtataaagaattggctcatgtatttttttttcagacagcagttaaaaaaaattgttctaa              aaatacactggcatcaaatggcaatagaagatgttttgacgactacttccattggatcagactgacaa              gaataatacaagcacataggtggaattaaacttagctattaatgtccaagtttgaggcagctgcccctt              ataagcatttttaggtctgttttttagcttccctcttagccactcctgtgcagctccagtgagggtatg              gaggaaaaagcaagggaagccatccctatgttgttttccaacatgaacactcaagatttttaactagtgg              tccagaagtaagaggggggaaacatcctctatagaaaaaaaagtagataataaattgaacacag              aacttcatgtgatcatcagatttgagaactatgtatggcatccctctttttctatttttctaagaa              atgatttctattatgtttcatttgaataagtttttgaattaaactcagtaaatgaacaaactgacat              gactggagcttgaataaaacgatgtgatgataatgaataacataatgcaaatgtcttctgtcttctat              gcaaaaattatttagtcatagcaatgcatgaataattaaagacaatttatattaggtatttaataatatt              tttatatttatcatctgaatttttaagttatttttaaaaatatattggtaaatcaactcaggtccaat              gtttttagtttgttctttaatatattgcctttttaaaatgagttaaactctgtataggtttttaact              tttctttatctgataacacaattctgacttcatctggcagcaagttcctctgattttcttcttctt              aaccttttaatgcttctcctcccttttttttaaaaacatttttggttcatttcttgggttatattgctt           </p>	10
		20
		30
		40

【 0 1 9 4 】

[illegible]

【 0 1 9 5 】

20

30

40

【 0 1 9 7 】

[illegible]





## 【表 4 - 1】

表 4. ヒト *SCN1A* を標的にする A S O の配列

配列名	Chr2 始点	Chr2 終点	配列 番号	A S O 配列	配列 番号	A S O 配列
SCN1A-IVS22-986	166864788	166864806	12	ATGAATTTAATAAACTTT	372	AUGAAUUUAAUAAACUUU
SCN1A-IVS22-981	166864783	166864801	13	GACCAATGAATTTAATAA	373	GACCAUAGAAUUUAAUAA
SCN1A-IVS22-976	166864778	166864796	14	CACTTGACCAATGAATTT	374	CACUUGACCAUAGAAUUU
SCN1A-IVS22-971	166864773	166864791	15	CTGAGCACTTGACCAATG	375	CUGAGCACUUGACCAUUG
SCN1A-IVS22-966	166864768	166864786	16	AATATCTGAGCACTTGAC	376	AAUUCUGAGCACUUGAC
SCN1A-IVS22-961	166864763	166864781	17	ATGGAATATCTGAGCAC	377	AUGGAAUUAUCUGAGCAC
SCN1A-IVS22-956	166864758	166864776	18	AATGTATGGAATATCTG	378	AAUGUUGGAAUUAUCUG
SCN1A-IVS22-951	166864753	166864771	19	AGTGTAAATGTATGGAAT	379	AGUGUAAUGUUGGAAU
SCN1A-IVS22-946	166864748	166864766	20	AATGAAGTGTAATGTATG	380	AAUGAAGUGUAAUGUUG
SCN1A-IVS22-941	166864743	166864761	21	ATAGAAATGAAGTGTAAT	381	AUAGAAUAGAGUGUAAU
SCN1A-IVS22-936	166864738	166864756	22	TTTTATAGAAATGAAGT	382	UUUUUAGAGAAUAGAGU
SCN1A-IVS22-931	166864733	166864751	23	CAGCTTTTTATAGAAAT	383	CAGCUUUUUUAGAGAAU
SCN1A-IVS22-926	166864728	166864746	24	AAGATCAGCTTTTTTATA	384	AAGUACAGCUUUUUUAUA
SCN1A-IVS22-921	166864723	166864741	25	CCGATAAGATCAGCTTTT	385	CCGAUAAAGUACAGCUUUU
SCN1A-IVS22-916	166864718	166864736	26	GTATACCGATAAGATCAG	386	GUUACCGAUAAAGUACAG
SCN1A-IVS22-911	166864713	166864731	27	TAAAGTATACCGATAAG	387	UAAAAGUUAACCGUAAG
SCN1A-IVS22-906	166864708	166864726	28	AAAATTAAGTATACCG	388	AAAAUAAAAGUUAACCG
SCN1A-IVS22-901	166864703	166864721	29	CTGAGAAAATTAAGTA	389	CUGAGAAAUAAAAGUA
SCN1A-IVS22-896	166864698	166864716	30	TATTTCTGAGAAATTA	390	UAUUUCUGAGAAAUAUA
SCN1A-IVS22-891	166864693	166864711	31	ATGGTTATTCTGAGAAA	391	AUGGUUAUUUCUGAGAAA
SCN1A-IVS22-886	166864688	166864706	32	TAGATATGGTTATTCTG	392	UAGAUUGGUUAUUUCUG
SCN1A-IVS22-881	166864683	166864701	33	AATTATAGATATGGTTAT	393	AAUUAUAGAUUGGUUAU
SCN1A-IVS22-876	166864678	166864696	34	TTAATAATTATAGATATG	394	UUAUAAUUAUAGAUUAG
SCN1A-IVS22-871	166864673	166864691	35	ATTGATTAATAATTATAG	395	AUUGAUUAAUAAUUAAG
SCN1A-IVS22-866	166864668	166864686	36	GCATTATTGATTAATAAT	396	GCAUUAUUGAUUAAUUAU
SCN1A-IVS22-861	166864663	166864681	37	AAAAGGCATTATTGATTA	397	AAAAGGCAUUAUUGAUUA
SCN1A-IVS22-856	166864658	166864676	38	AATATAAAGGCATTATT	398	AAUUAUAAAGGCAUUAU
SCN1A-IVS22-851	166864653	166864671	39	CTTTTAATATAAAGGCA	399	CUUUUAAUUAUAAAGGCA
SCN1A-IVS22-846	166864648	166864666	40	AACCTCTTTAATATAAA	400	AACCUCUUUAAUUAUAA
SCN1A-IVS22-841	166864643	166864661	41	AACTAACCTCTTTTAAT	401	AAACUAAACCUUUUAUU
SCN1A-IVS22-836	166864638	166864656	42	TTCAAAAATAACCTCTT	402	UUCAAAAACUAAACCUU
SCN1A-IVS22-831	166864633	166864651	43	CAAGTTTCAAAAATAAC	403	CAAGUUCAAAAACUAAAC
SCN1A-IVS22-826	166864628	166864646	44	AACTCCAAGTTTCAAAA	404	AACUCCAAGUUUCAAAA
SCN1A-IVS22-821	166864623	166864641	45	TCTAAACTCCAAGTTTC	405	UCUAAAACUCCAAGUUUC
SCN1A-IVS22-816	166864618	166864636	46	TTATGTCTAAACTCCAA	406	UUUGUCUAAAACUCCAA
SCN1A-IVS22-811	166864613	166864631	47	GGATTTTATGTCTAAAC	407	GGAUUUUUGUCUAAAC
SCN1A-IVS22-806	166864608	166864626	48	TATAAGGATTTTATGTCT	408	UAUAGGAUUUUAUGUCU
SCN1A-IVS22-801	166864603	166864621	49	GCATTTATAAGGATTTTA	409	GCAUUUAUAGGAUUUUA
SCN1A-IVS22-796	166864598	166864616	50	TATCAGCATTTATAAGGA	410	UAUCAGCAUUUAUAGGA
SCN1A-IVS22-791	166864593	166864611	51	ATCACTATCAGCATTTAT	411	AUCACUACAGCAUUUAU
SCN1A-IVS22-786	166864588	166864606	52	GTTATATCACTATCAGCA	412	GUUAUAUCACUACAGCA
SCN1A-IVS22-781	166864583	166864601	53	TATTAGTTATATCACTAT	413	UAUUAUUAUUAUCACU

【 0 2 0 3 】

10

20

30

40

【表 4 - 2】

SCN1A-IVS22-776	166864578	166864596	54	TAACTATTAGTTATATC	414	UAAACUUAUAGUUAUUC
SCN1A-IVS22-771	166864573	166864591	55	CCATTTAAACTATTAGTT	415	CCAUUUAACUUAUAGUU
SCN1A-IVS22-766	166864568	166864586	56	TCTGACCATTTAAACTAT	416	UCUGACCAUUUAAACUUAU
SCN1A-IVS22-761	166864563	166864581	57	ATAAATCTGACCATTTAA	417	AUAAAUUCUGACCAUUUAA
SCN1A-IVS22-756	166864558	166864576	58	TATTCATAAATCTGACCA	418	UAUUCAUAAAUUCUGACCA
SCN1A-IVS22-751	166864553	166864571	59	AGCCATATTCATAAATCT	419	AGCCAUUAUUAUAAUUCU
SCN1A-IVS22-746	166864548	166864566	60	AATAGAGCCATATTCATA	420	AAUAGAGCCAUUAUUAUA
SCN1A-IVS22-741	166864543	166864561	61	TGAGGAATAGAGCCATAT	421	UGAGGAUAGAGCCAUUAU
SCN1A-IVS22-736	166864538	166864556	62	CATTATGAGGAATAGAGC	422	CAUUAUGAGGAUAGAGC
SCN1A-IVS22-731	166864533	166864551	63	GTTGTCAATTATGAGGAAT	423	GUUGUCAUUAUAGAGAAU
SCN1A-IVS22-726	166864528	166864546	64	TGTATGTTGTCATTATGA	424	UGUAUGUGUCAUUAUGA
SCN1A-IVS22-721	166864523	166864541	65	CTGTGTGATGTTGTCAT	425	CUGUGUGUAGUUGUCAU
SCN1A-IVS22-716	166864518	166864536	66	TAGTGCTGTGTGTATGTT	426	UAGUGCUGUGUGUAGUU
SCN1A-IVS22-711	166864513	166864531	67	CATTTTAGTGCTGTGTGT	427	CAUUUAGUGCUGUGUGU
SCN1A-IVS22-706	166864508	166864526	68	TTAGTCATTTTAGTGCTG	428	UUAGUCAUUUAGUGCUG
SCN1A-IVS22-701	166864503	166864521	69	AGAGATTAGTCATTTTAG	429	AGAGAUUAGUCAUUUAG
SCN1A-IVS22-696	166864498	166864516	70	ATTGAAGAGATTAGTCAT	430	AUGAAGAGAUUAGUCAU
SCN1A-IVS22-691	166864493	166864511	71	CACGTATTGAAGAGATTA	431	CACGUUUGAAGAGAUUA
SCN1A-IVS22-686	166864488	166864506	72	CCAAACACGTATTGAAGA	432	CCAAACACGUUUAUGAGA
SCN1A-IVS22-681	166864483	166864501	73	CAATGCCAAACACGTATT	433	CAAUGCCAAACACGUUAU
SCN1A-IVS22-676	166864478	166864496	74	CTCTACAATGCCAAACAC	434	CUCUACAAGCCAAACAC
SCN1A-IVS22-671	166864473	166864491	75	TTTGACTCTACAATGCCA	435	UUUGACUCUACAAGCCA
SCN1A-IVS22-666	166864468	166864486	76	GTTATTTTGACTCTACAA	436	GUUAUUUGACUCUACAA
SCN1A-IVS22-661	166864463	166864481	77	ATAACGTTATTTGACTC	437	AUAACGUUAUUUGACUC
SCN1A-IVS22-656	166864458	166864476	78	CAATTATAACGTTATTTT	438	CAAUUAUACGUUAUUUU
SCN1A-IVS22-651	166864453	166864471	79	AGAATCAATTATAACGTT	439	AGAAUCAAUUAUACGUU
SCN1A-IVS22-646	166864448	166864466	80	AAAATAGAATCAATTATA	440	AAAAAGAAUCAUUUAUA
SCN1A-IVS22-641	166864443	166864461	81	TATAAAAAATAGAATCAA	441	UAUAAAAAUAGAUAUCA
SCN1A-IVS22-636	166864438	166864456	82	AGAAGTATAAAAAATAGA	442	AGAAGUAUAAAAAUAGA
SCN1A-IVS22-631	166864433	166864451	83	ACACTAGAAGTATAAAAA	443	ACACUAGAAGUAUAAAA
SCN1A-IVS22-626	166864428	166864446	84	TCCAAACACTAGAAGTAT	444	UCCAAACACTAGAAGUAU
SCN1A-IVS22-621	166864423	166864441	85	AAATATCCAAACACTAGA	445	AAAUUCCAAACACTAGA
SCN1A-IVS22-616	166864418	166864436	86	AAATAAAATATCCAAACA	446	AAUAAAAAUCCAAACA
SCN1A-IVS22-611	166864413	166864431	87	TTACAAAATAAAATATCC	447	UUACAAAATAAAAUUCC
SCN1A-IVS22-606	166864408	166864426	88	TATTTTACAAAATAAAA	448	UAUUUUACAAAATAAAA
SCN1A-IVS22-601	166864403	166864421	89	GATTATATTTTACAAAA	449	GAUUAUUAUUUACAAAA
SCN1A-IVS22-596	166864398	166864416	90	TTCATGATTATATTTTAA	450	UUCAUUAUUAUUUUUA
SCN1A-IVS22-591	166864393	166864411	91	CATCATTCATGATTATAT	451	CAUCAUCAUGAUUAUUAU
SCN1A-IVS22-586	166864388	166864406	92	CTCACCATCATTATGAT	452	CUCACCAUCAUCAUGAU
SCN1A-IVS22-581	166864383	166864401	93	CCAACCTCACCATCATT	453	CCAACCUACCAUCAUUC
SCN1A-IVS22-576	166864378	166864396	94	TATATCCAACCTCACCAT	454	UAUAUCCAACCUACCAU
SCN1A-IVS22-571	166864373	166864391	95	ATTCTTATATCCAACCTC	455	AUCUUAUAUCCAACCTC
SCN1A-IVS22-566	166864368	166864386	96	TCATCATTCCTATATCCA	456	UCAUCAUUAUUAUCCA
SCN1A-IVS22-561	166864363	166864381	97	CATAATCATCATTCTTAT	457	CAUAAUCAUUAUUAUUAU
SCN1A-IVS22-556	166864358	166864376	98	CCAATCATAATCATCATT	458	CCAAUCAUAAUCAUUAU
SCN1A-IVS22-551	166864353	166864371	99	ACTTCCCAATCATAATCA	459	ACUCCCAUCAUUAUUAU
SCN1A-IVS22-546	166864348	166864366	100	ATCTCACCTTCCCAATCAT	460	AUCUCACUCCCAAUCAU

【 0 2 0 4 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

SCN1A-IVS22-541	166864343	166864361	101	TTCAAATCTCACTTCCCA	461	UUCAAAUUCACUCCCA
SCN1A-IVS22-536	166864338	166864356	102	GCATGTTCAAATCTCACT	462	GCAUGUCAAUUCACU
SCN1A-IVS22-531	166864333	166864351	103	TCTGAGCATGTTCAAATC	463	UCUGAGCAUGUCAAUUC
SCN1A-IVS22-526	166864328	166864346	104	GAGTTTCTGAGCATGTTT	464	GAGUUCUGAGCAUGUUC
SCN1A-IVS22-521	166864323	166864341	105	AATGAGAGTTTCTGAGCA	465	AAUGAGAGUUCUGAGCA
SCN1A-IVS22-516	166864318	166864336	106	AATTAAATGAGAGTTTCT	466	AAUAAAUGAGAGUUCU
SCN1A-IVS22-511	166864313	166864331	107	CAAAGAATTAAATGAGAG	467	CAAAGAAUAAAUGAGAG
SCN1A-IVS22-506	166864308	166864326	108	TAGGGCAAAGAATTAAAT	468	UAGGGCAAAGAAUAAAU
SCN1A-IVS22-501	166864303	166864321	109	GCTGCTAGGGCAAAGAAT	469	GCUGCUAGGGCAAAGAAU
SCN1A-IVS22-496	166864298	166864316	110	TTTATGCTGCTAGGGCAA	470	UUUAGUCUGCUAGGGCAA
SCN1A-IVS22-491	166864293	166864311	111	GTGATTTTATGCTGCTAG	471	GUGAUUUUAGUCUGCUAG
SCN1A-IVS22-486	166864288	166864306	112	CTATTGTGATTTTATGCT	472	CUAUUGUGAUUUUAGUCU
SCN1A-IVS22-481	166864283	166864301	113	CGCAGCTATTGTGATTTT	473	CGCAGCUAUUGUGAUUUU
SCN1A-IVS22-476	166864278	166864296	114	TTTGACGCAGCTATTGTG	474	UUUGACGCAGCUAUUGUG
SCN1A-IVS22-471	166864273	166864291	115	TACGCTTTGACGCAGCTA	475	UACGCUUUGACGCAGCUA
SCN1A-IVS22-466	166864268	166864286	116	TGAGTTACGCTTTGACGC	476	UGAGUACGCUUUGACGC
SCN1A-IVS22-461	166864263	166864281	117	GTGCTTGAGTTACGCTTT	477	GUGCCUGAGUUAACGCUU
SCN1A-IVS22-456	166864258	166864276	118	AATGAGTGCCTGAGTTAC	478	AAUGAGUGCCUGAGUUA
SCN1A-IVS22-451	166864253	166864271	119	AATAAAATGAGTGCCTGA	479	AAUAAAUGAGUGCCUGA
SCN1A-IVS22-446	166864248	166864266	120	ACAAAAATAAAATGAGTG	480	ACAAAAUAAAUGAGUG
SCN1A-IVS22-441	166864243	166864261	121	GAACAACAAAAATAAAAT	481	GAACAACAAAAUAAAAU
SCN1A-IVS22-436	166864238	166864256	122	TAACAGAACACAAAAAT	482	UACAGAACACAAAAAU
SCN1A-IVS22-431	166864233	166864251	123	AAAAATAACAGAACACA	483	AAAAUAAACAGAACACA
SCN1A-IVS22-426	166864228	166864246	124	TTTGAAAAATAACAGAA	484	UUUGAAAAUAAACAGAA
SCN1A-IVS22-421	166864223	166864241	125	CATGCTTTGAAAAATAA	485	CAUGCUUUGAAAAAUAA
SCN1A-IVS22-416	166864218	166864236	126	AAGCACATGCTTTGAAAA	486	AAGCACAUUGCUUUGAAAA
SCN1A-IVS22-411	166864213	166864231	127	CATAAAGCACATGCTTT	487	CAUAAAAGCACAUUGCUU
SCN1A-IVS22-406	166864208	166864226	128	TGTTGCATAAAGCACAT	488	UGUUGCAUAAAAGCACAU
SCN1A-IVS22-401	166864203	166864221	129	AGTAATGTTGCATAAAAG	489	AGUAAUGUUGCAUAAAAG
SCN1A-IVS22-396	166864198	166864216	130	TATTCACTAATGTTGCAT	490	UAUUCAGUAAUGUUGCAU
SCN1A-IVS22-391	166864193	166864211	131	TGCTTTATTCACTAATGT	491	UGCUUUAUUCAGUAAUGU
SCN1A-IVS22-386	166864188	166864206	132	CAACATGCTTTATTCACT	492	CAACAUUCUUAUUCAGU
SCN1A-IVS22-381	166864183	166864201	133	CTGTACAACATGCTTTAT	493	CUGUACAACAUUGCUUUAU
SCN1A-IVS22-376	166864178	166864196	134	AAGCACTGTACAACATGC	494	AAGCACUGUACAACAUGC
SCN1A-IVS22-371	166864173	166864191	135	TTATCAAGCACTGTACAA	495	UUAUCAAGCACUGUACAA
SCN1A-IVS22-366	166864168	166864186	136	ACTTCTTATCAAGCACTG	496	ACUUCUUAUCAAGCACUG
SCN1A-IVS22-361	166864163	166864181	137	TTCTAACTTCTTATCAAG	497	UUCUAAUCUUAUCAAG
SCN1A-IVS22-356	166864158	166864176	138	TTACTTTCTAACTTCTTA	498	UUACUUCUAAUCUUA
SCN1A-IVS22-351	166864153	166864171	139	ATTTGTTACTTTCTAACT	499	AUUUGUUAUUUUAUUAU
SCN1A-IVS22-346	166864148	166864166	140	AATTATTTGTTACTTTC	500	AAUUUAUUUGUUAUUUC
SCN1A-IVS22-341	166864143	166864161	141	ATGATAATTTATTGTTA	501	AUGAUAAUUAUUUGUUA
SCN1A-IVS22-336	166864138	166864156	142	ACGTGATGATAATTTAAT	502	ACGUGAUGAUAAUUUAU
SCN1A-IVS22-331	166864133	166864151	143	GTGCAACGTGATGATAAT	503	GUGCAACGUGAUGAUAAU
SCN1A-IVS22-326	166864128	166864146	144	ACAAAGTGCAACGTGATG	504	ACAAAGUGCAACGUGAUG
SCN1A-IVS22-321	166864123	166864141	145	AAAACACAAAGTGCAACG	505	AAAACACAAAGUGCAACG
SCN1A-IVS22-316	166864118	166864136	146	CATGCAAAACACAAAGTG	506	CAUGCAAAACACAAAGUG
SCN1A-IVS22-311	166864113	166864131	147	TAAACATGCAAAACACA	507	UAAACAUGCAAAACACA

【 0 2 0 5 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

SCN1A-IVS22-306	166864108	166864126	148	GTGCATAAAACATGCAAA	508	GUGCAUAAAACAUGCAAA
SCN1A-IVS22-301	166864103	166864121	149	GAAATGTGCATAAAACAT	509	GAAUUGUGCAUAAAACAU
SCN1A-IVS22-296	166864098	166864116	150	AGCCAGAAATGTGCATAA	510	AGCCAGAAUUGUGCAUAA
SCN1A-IVS22-291	166864093	166864111	151	CTGTCAGCCAGAAATGTG	511	CUGUCAGCCAGAAUUGUG
SCN1A-IVS22-286	166864088	166864106	152	AAAAGCTGTCAGCCAGAA	512	AAAAGCUGUCAGCCAGAA
SCN1A-IVS22-281	166864083	166864101	153	TGTTTAAAAGCTGTGAGC	513	UGUUUAAAAGCUGUCAGC
SCN1A-IVS22-276	166864078	166864096	154	ATAAATGTTTAAAAGCTG	514	AUAAAUGUUUAAAAGCUG
SCN1A-IVS22-271	166864073	166864091	155	ATACAATAAATGTTTAAA	515	AUACAUAUAAUGUUUAAA
SCN1A-IVS22-266	166864068	166864086	156	TTGAAATACAATAAATGT	516	UUGAAAUACAUAUAAUUGU
SCN1A-IVS22-261	166864063	166864081	157	GAAATTTGAAATACAATA	517	GAAAUUGAAAUACAUAUA
SCN1A-IVS22-256	166864058	166864076	158	GACTGGAAATTTGAAATA	518	GACUGGAAAUUGAAUAUA
SCN1A-IVS22-251	166864053	166864071	159	ATTGAGCTGGAAATTTG	519	AUUUGGACUGGAAAUUG
SCN1A-IVS22-246	166864048	166864066	160	GAAAAATTTGGACTGGAA	520	GAAAAUUUGGACUGGAA
SCN1A-IVS22-241	166864043	166864061	161	AAGTTGAAAAATTTGGAC	521	AAGUGAAAAAUUGGAC
SCN1A-IVS22-236	166864038	166864056	162	TTTACAAGTTGAAAAATT	522	UUUACAAGUGAAAAAUU
SCN1A-IVS22-231	166864033	166864051	163	TTAATTTTACAAGTTGAA	523	UUAAUUUACAAGUUGAA
SCN1A-IVS22-226	166864028	166864046	164	TCAGTTTAATTTTACAAG	524	UCAGUUUAAUUUACAAG
SCN1A-IVS22-221	166864023	166864041	165	TTCACCTCAGTTTAATTTT	525	UUCACUCAGUUAAUUUU
SCN1A-IVS22-216	166864018	166864036	166	ATCAATTCACCTCAGTTTA	526	AUCAUUCACUCAGUUUA
SCN1A-IVS22-211	166864013	166864031	167	ACGACATCAATTCACCTCA	527	ACGACAUCAAUUCACUCA
SCN1A-IVS22-206	166864008	166864026	168	TATTCACGACATCAATTC	528	UAUUCACGACAUCAAUUC
SCN1A-IVS22-201	166864003	166864021	169	CTAGATATTCACGACATC	529	CUAGAUUUCACGACAUUC
SCN1A-IVS22-196	166863998	166864016	170	TTACCCCTAGATATTCACG	530	UUACCCUAGAUUUCACG
SCN1A-IVS22-191	166863993	166864011	171	TTATTTTACCCTAGATAT	531	UUUUUUUACCCUAGAUU
SCN1A-IVS22-186	166863988	166864006	172	AAATTTTATTTTACCCTA	532	AAAUUUUUAUUUACCCUA
SCN1A-IVS22-181	166863983	166864001	173	AACACAAATTTTATTTTA	533	AACACAAUUUUUUUUUA
SCN1A-IVS22-176	166863978	166863996	174	ATTTAAACACAAATTTTA	534	AUUUAAACACAAUUUUUA
SCN1A-IVS22-171	166863973	166863991	175	TACAAATTTAAACACAAA	535	UACAAUUUAAACACAAA
SCN1A-IVS22-166	166863968	166863986	176	AAAAATACAAATTTAAAC	536	AAAAUACAAUUUAAAC
SCN1A-IVS22-161	166863963	166863981	177	AAATTAATAATACAAATTT	537	AAAUUAAAAUACAAAUU
SCN1A-IVS22-156	166863958	166863976	178	TTAGGAAATTAATAATAC	538	UUAGGAAUUAAAAUAC
SCN1A-IVS22-151	166863953	166863971	179	CTAGGTTAGGAAATTAATA	539	CUAGGUUAGGAAUUAAA
SCN1A-IVS22-146	166863948	166863966	180	ATTTCCCTAGGTTAGGAAA	540	AUUCCUAGGUUAGGAAA
SCN1A-IVS22-141	166863943	166863961	181	TTAAGATTTCCTAGGTTA	541	UUAAGAUUCCUAGGUUA
SCN1A-IVS22-136	166863938	166863956	182	GGTATTTAAGATTTCCTA	542	GGUAAUUUAGAUUCCUA
SCN1A-IVS22-131	166863933	166863951	183	AAGAAGGTATTTAAGATT	543	AAGAAGGUUUUAGAUU
SCN1A-IVS22-126	166863928	166863946	184	TGAAAAAGAAGGTATTTA	544	UGAAAAAGAAGGUUUUA
SCN1A-IVS22-121	166863923	166863941	185	TCTTTTAAAAAGAAGGT	545	UCUUUUGAAAAAGAAGGU
SCN1A-IVS22-116	166863918	166863936	186	TGAGTCTTTTAAAAAAG	546	UGAGUUCUUUGAAAAAG
SCN1A-IVS22-111	166863913	166863931	187	AGACTTGAGTCTTTTGA	547	AGACUUGAGUUCUUUGA
SCN1A-IVS22-106	166863908	166863926	188	CATTAAGACTTGAGTTCT	548	CAUUAAGACUUGAGUUCU
SCN1A-IVS22-101	166863903	166863921	189	CTATCCATTAAAGACTTGA	549	CUAUCCAUUAAGACUUGA
SCN1A-IVS22-096	166863898	166863916	190	TTTCCCTATCCATTAGA	550	UUCCCUAUCCAUUAAGA
SCN1A-IVS22-091	166863893	166863911	191	GTCTGTTTCCCTATCCAT	551	GUCUGUCCCUAUCCAU
SCN1A-IVS23+091	166863631	166863649	192	TTTCCCTACTGTGGTGCA	552	UUCCCUACUGUGGUGCA
SCN1A-IVS23+096	166863626	166863644	193	TGTATTTTCCCTACTGTG	553	UGUAAUUCCCUACUGUG
SCN1A-IVS23+101	166863621	166863639	194	AATAATGTATTTCCCTA	554	AAUAAUGUAAUUUCCCUA

【 0 2 0 6 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

SCN1A-IVS23+106	166863616	166863634	195	ATGTAAATATGTATTTT	555	AUGUAAUAAUGAUUUU
SCN1A-IVS23+111	166863611	166863629	196	TTAGGATGTAAATATGT	556	UUAGGAUGUAAUAAUGU
SCN1A-IVS23+116	166863606	166863624	197	AGGGATTAGGATGTAAAT	557	AGGGAUUAGGAUGUAAU
SCN1A-IVS23+121	166863601	166863619	198	AAAGAGGGAATTAGGATG	558	AAAGAGGGAUUAAGGAUG
SCN1A-IVS23+126	166863596	166863614	199	ATTGAAAAGAAGGGATTA	559	AUGAAAAGAAGGGAUUA
SCN1A-IVS23+131	166863591	166863609	200	AGACAATTGAAAAGAGGG	560	AGACAAGUAAAAGAGGG
SCN1A-IVS23+136	166863586	166863604	201	ATTTAAGACAATTGAAAA	561	AUUUAGACAAGUAAAA
SCN1A-IVS23+141	166863581	166863599	202	ATGAAATTTAAGACAATT	562	AUGAAAUUAAGACAAGU
SCN1A-IVS23+146	166863576	166863594	203	TTCAAATGAAATTTAAGA	563	UUCAAAGAAAUUUAAGA
SCN1A-IVS23+151	166863571	166863589	204	TTTTTTTCAAATGAAATT	564	UUUUUUCAAUGAAAUU
SCN1A-IVS23+156	166863566	166863584	205	TTTTTTTTTTTCAAATG	565	UUUUUUUUUCAAUG
SCN1A-IVS23+161	166863561	166863579	206	AAGGTTTTTTTTTTTTTC	566	AAGGUUUUUUUUUUUC
SCN1A-IVS23+166	166863556	166863574	207	TCATAAAGGTTTTTTTTT	567	UCAUAAAGGUUUUUUUU
SCN1A-IVS23+171	166863551	166863569	208	TAAATTCATAAAGGTTTT	568	UAAAUCAUAAAGGUUUU
SCN1A-IVS23+176	166863546	166863564	209	GAGGGTAAATTCATAAAG	569	GAGGGUAAAUCAUAAAG
SCN1A-IVS23+181	166863541	166863559	210	CCACAGAGGGTAAATTC	570	CCACAGAGGGUAAAUCA
SCN1A-IVS23+186	166863536	166863554	211	AAAATCCACAGAGGGTAA	571	AAAUCCACAGAGGGUAA
SCN1A-IVS23+191	166863531	166863549	212	GGGTTAAATCCACAGAG	572	GGGUUAAAUCCACAGAG
SCN1A-IVS23+196	166863526	166863544	213	CATTGGGATTAAATCCA	573	CAUUGGGAUUAAAUCCA
SCN1A-IVS23+201	166863521	166863539	214	TCAACCATAGGGTTAAA	574	UCAACCAUAGGGUAAA
SCN1A-IVS23+206	166863516	166863534	215	AGATATCAACCATGGGA	575	AGAUUACAACCAUUGGGA
SCN1A-IVS23+211	166863511	166863529	216	AATAAGATATCAACCAT	576	AUAUAGAUUACAACCAU
SCN1A-IVS23+216	166863506	166863524	217	AACCTAATAAGATATCA	577	AACUUAUAAAGAUUCA
SCN1A-IVS23+221	166863501	166863519	218	AATGAACTTAATAAGA	578	AUGAAACUUAUAAAGA
SCN1A-IVS23+226	166863496	166863514	219	TATTCATGAACTTAAT	579	UAUCAAUGAAACUAAU
SCN1A-IVS23+231	166863491	166863509	220	AATCATATTCATGAAAC	580	AUCAAUAUCAAUGAAAC
SCN1A-IVS23+236	166863486	166863504	221	AACTAAATCATATTCAT	581	AACUAAAUCAUUAUCAAU
SCN1A-IVS23+241	166863481	166863499	222	CACATAACTAAATCATAT	582	CACAUAAAUAAUCAAU
SCN1A-IVS23+246	166863476	166863494	223	ATATACATAACTAAAT	583	AUAUACAUAAAUAAU
SCN1A-IVS23+251	166863471	166863489	224	ACTCCATATACATAAAC	584	ACUCCAUUACACAUAAAC
SCN1A-IVS23+256	166863466	166863484	225	GGATACTCATATACAC	585	GGAUUACUCCAUUACAC
SCN1A-IVS23+261	166863461	166863479	226	AAGATGGATACTCCATA	586	AAGAUUGAUAAUCCAU
SCN1A-IVS23+266	166863456	166863474	227	CCCCAAAGATGGATAACT	587	CCCCAAAGUUGAUAAU
SCN1A-IVS23+271	166863451	166863469	228	AATCTCCCCAAAGATGGA	588	AAUCUCCCCAAAGUUGA
SCN1A-IVS23+276	166863446	166863464	229	CCAGTAATCTCCCCAAAG	589	CCAGUAAUCCCCAAAG
SCN1A-IVS23+281	166863441	166863459	230	CCAATCCAGTAATCTCCC	590	CCAAUCCAGUAAUCCCC
SCN1A-IVS23+286	166863436	166863454	231	CCTCACCAATCCAGTAAT	591	CCUACCAUCCAGUAAU
SCN1A-IVS23+291	166863431	166863449	232	CCCGCCCTCACCAATCCA	592	CCCGCCUCCACCAUCCA
SCN1A-IVS23+296	166863426	166863444	233	GGTCCCCCGCCCTCACCA	593	GGUCCCCCGCCUCCACCA
SCN1A-IVS23+301	166863421	166863439	234	ACCAGGGTCCCCCGCCCT	594	ACCAGGGUCCCCCGCCU
SCN1A-IVS23+306	166863416	166863434	235	TCTACACAGGGTCCCCC	595	UCUACACAGGGUCCCCC
SCN1A-IVS23+311	166863411	166863429	236	ATCATTCTACACAGGGT	596	AUCAUUCUACACAGGGU
SCN1A-IVS23+316	166863406	166863424	237	ACATAATCATTCTACACC	597	ACAUAAUUAUUAUACACC
SCN1A-IVS23+321	166863401	166863419	238	TTTTCACATAATCATTCT	598	UUUCACAUAAUUAUUCU
SCN1A-IVS23+326	166863396	166863414	239	TGTTTTTTCACATAATC	599	UUGUUUUUACAUAAUC
SCN1A-IVS23+331	166863391	166863409	240	TTAAATTGTTTTTTCACA	600	UUAAUUGUUUUUCACA
SCN1A-IVS23+336	166863386	166863404	241	ACAAGTTAAATTGTTTTT	601	ACAAGUAAAUUGUUUUU

【 0 2 0 7 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

SCN1A-IVS23+341	166863381	166863399	242	GCTTAACAAGTTAAATTG	602	GCUUAACAAGUAAAUG
SCN1A-IVS23+346	166863376	166863394	243	CATGAGCTTAACAAGTTA	603	CAUGAGCUUACAAGUUA
SCN1A-IVS23+351	166863371	166863389	244	AGTATCATGAGCTTAACA	604	AGUAUCAUGAGCUAACA
SCN1A-IVS23+356	166863366	166863384	245	CAAACAGTATCATGAGCT	605	CAACAGUAUCAUGAGCU
SCN1A-IVS23+361	166863361	166863379	246	TGCCTCAAACAGTATCAT	606	UGCCUCAAACAGUAUCAU
SCN1A-IVS23+366	166863356	166863374	247	CTGTATGCCTCAAACAGT	607	CUGUAUGCCUCAAACAGU
SCN1A-IVS23+371	166863351	166863369	248	AGGGACTGTATGCCTCAA	608	AGGGACUGUAUGCCUCAA
SCN1A-IVS23+376	166863346	166863364	249	ACAGCAGGACTGTATGC	609	ACAGCAGGACUGUAUGC
SCN1A-IVS23+381	166863341	166863359	250	ACTAAACAGCAAGGGCTG	610	ACUAAACAGCAAGGGCUG
SCN1A-IVS23+386	166863336	166863354	251	AATGTACTAAACAGCAGG	611	AAUGUACUAAACAGCAGG
SCN1A-IVS23+391	166863331	166863349	252	AGACCAATGTACTAAACA	612	AGACCAUGUACUAAACA
SCN1A-IVS23+396	166863326	166863344	253	GACCCAGACCAATGTACT	613	GACCCAGACCAUGUACU
SCN1A-IVS23+401	166863321	166863339	254	TTCAGGAGCCAGACCAAT	614	UUCAGGAGCCAGACCAU
SCN1A-IVS23+406	166863316	166863334	255	TAATTTTCAGGAGCCAGA	615	UAAUUUUCAGGAGCCAGA
SCN1A-IVS23+411	166863311	166863329	256	ACTGGTAATTTTCAGGAC	616	ACUGGUAUUUUCAGGAC
SCN1A-IVS23+416	166863306	166863324	257	ATCTAACTGGTAATTTTC	617	AUCUAACUGGUAUUUUC
SCN1A-IVS23+421	166863301	166863319	258	ATGGTATCTAACTGGTAA	618	AUGGUUAUCUACUGGUAA
SCN1A-IVS23+426	166863296	166863314	259	AACGTATGGTATCTAACT	619	AACUGAUGGUUAUCUACU
SCN1A-IVS23+431	166863291	166863309	260	TAATCAACTGATGGTATC	620	UAAUCAUCUGGUUAUC
SCN1A-IVS23+436	166863286	166863304	261	ATCAATAATCAACTGATG	621	AUCAUAAUCAUCUGAUG
SCN1A-IVS23+441	166863281	166863299	262	TACATATCAATAATCAAC	622	UACUAUCAAUAUACAAC
SCN1A-IVS23+446	166863276	166863294	263	GCTCATACATATCAATAA	623	GCUCAUACAUAUCAAUA
SCN1A-IVS23+451	166863271	166863289	264	TATCTGCTCATACATATC	624	UAUCUGCAUACAUAUC
SCN1A-IVS23+456	166863266	166863284	265	CCTAGTATCTGCTCATAC	625	CCUAGUAUCUGCAUAC
SCN1A-IVS23+461	166863261	166863279	266	TGCACCCAGTATCTGCT	626	UGCACCCUAGUAUCUGCU
SCN1A-IVS23+466	166863256	166863274	267	AATATTGCACCCAGTAT	627	AAUAUUGCACCCUAGUAU
SCN1A-IVS23+471	166863251	166863269	268	CCTGAAATATTGCACCCCT	628	CCUGAAAUUAGCACCCCU
SCN1A-IVS23+476	166863246	166863264	269	TGAAACCTGAAATATTGC	629	UGAAACCUGAAAUUAGC
SCN1A-IVS23+481	166863241	166863259	270	TCTTATGAAACCTGAAAT	630	UCUUAUGAAACCUGAAAU
SCN1A-IVS23+486	166863236	166863254	271	ACCAGTCTTATGAAACCT	631	ACCAGUCUUAUGAAACCU
SCN1A-IVS23+491	166863231	166863249	272	TCAATACCAGTCTTATGA	632	UCAUAACCAGUCUUAUGA
SCN1A-IVS23+496	166863226	166863244	273	CACAATCAATACCAGTCT	633	CACAAUCAUAACCAGUCU
SCN1A-IVS23+501	166863221	166863239	274	GTGGTCACAATCAATACC	634	GUGGUCACAAUCAAUACC
SCN1A-IVS23+506	166863216	166863234	275	TGAGAGTGGTCACAATCA	635	UGAGAGUGGUCACAAUCA
SCN1A-IVS23+511	166863211	166863229	276	AAAAATGAGAGTGGTCAC	636	AAAAUGAGAGUGGUCAC
SCN1A-IVS23+516	166863206	166863224	277	CAATAAAAAATGAGAGTG	637	CAUAAAAAUAGAGAGUG
SCN1A-IVS23+521	166863201	166863219	278	TTACACAATAAAAAATGA	638	UUACACAUAUAAAAUAGA
SCN1A-IVS23+526	166863196	166863214	279	TGAACCTTACACAATAAAA	639	UGAACUACACAUAUAAAA
SCN1A-IVS23+531	166863191	166863209	280	CCATATGAACTTACACAA	640	CCAUAUGAACUACACAA
SCN1A-IVS23+536	166863186	166863204	281	TAACCCCATATGAACCTTA	641	UAACCCCAUUAAGAACUUA
SCN1A-IVS23+541	166863181	166863199	282	GAAAATAACCCCATATGA	642	GAAAAUACCCCAUUAUGA
SCN1A-IVS23+546	166863176	166863194	283	ATTTTGAAAATAACCCCA	643	AUUUUGAAAAUAACCCCA
SCN1A-IVS23+551	166863171	166863189	284	TTAACATTTTGAAAATAA	644	UUAAAUUUUGAAAAUAA
SCN1A-IVS23+556	166863166	166863184	285	CCTTGTTAACATTTTGAA	645	CCUUGUAACAUUUUGAA
SCN1A-IVS23+561	166863161	166863179	286	TTTGTGCTTGTTAACATT	646	UUUUGCCUUGUUAACAU
SCN1A-IVS23+566	166863156	166863174	287	TATATTTTGTGCTTGTTA	647	UAUAUUUUUGCCUUGUA
SCN1A-IVS23+571	166863151	166863169	288	CTTAATATATTTTGTGCT	648	CUAAUAUAUUUUUGCCU

【 0 2 0 8 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 7】

SCN1A-IVS23+576	166863146	166863164	289	TATTCTTAATATATTTT	649	UAUUCUAAUUAUUUU
SCN1A-IVS23+581	166863141	166863159	290	TCAACTATTTCTTAATAT	650	UCAACUAAUUCUAAUUAU
SCN1A-IVS23+586	166863136	166863154	291	CTTATTCAACTATTTCTT	651	CUUAUUAACUAAUUCUU
SCN1A-IVS23+591	166863131	166863149	292	ATGTGCTTATTCAACTAT	652	AUGGCUAAUUAACUUAU
SCN1A-IVS23+596	166863126	166863144	293	TTCACATGTGCTTATTC	653	UUCACAUUGGCUAAUUA
SCN1A-IVS23+601	166863121	166863139	294	CACAATTCACATGTGCTT	654	CACAUAUUAUUGGCUU
SCN1A-IVS23+606	166863116	166863134	295	TACAACACAATTCACATG	655	UACAACAAUUAUUAUG
SCN1A-IVS23+611	166863111	166863129	296	TTGTTTACAACACAATTC	656	UUGUUUACAACACAUAUC
SCN1A-IVS23+616	166863106	166863124	297	ACTTTTGTGTTACAACAC	657	ACUUUUUGUUACAACAC
SCN1A-IVS23+621	166863101	166863119	298	TTCTAACTTTTGTTTAC	658	UUCUAAUUUUUGUUUAC
SCN1A-IVS23+626	166863096	166863114	299	TTTATTCTAACTTTTGTG	659	UUUAUUCUAAUUUUUG
SCN1A-IVS23+631	166863091	166863109	300	GATTTTATTTATTCTAACT	660	GAUUUUUUAUUCUAAU
SCN1A-IVS23+636	166863086	166863104	301	AAGTGGATTTTATTATTC	661	AAGUGGAUUUUUAUUC
SCN1A-IVS23+641	166863081	166863099	302	CAAAUAGTGGATTTT	662	CAAAUAGUGGAUUUUU
SCN1A-IVS23+646	166863076	166863094	303	TAATTCAAATAAGTGGAT	663	UAAUCAAUAAGUGGAU
SCN1A-IVS23+651	166863071	166863089	304	CTGCATAATTCAAATAAG	664	CUGCAUAAUCAAUAAG
SCN1A-IVS23+656	166863066	166863084	305	CTATTCTGCATAATTC	665	CUUAUCUGCAUAAUCAA
SCN1A-IVS23+661	166863061	166863079	306	GTATTCTATTCTGCATAA	666	GUAUUCUUAUCUGCAUAA
SCN1A-IVS23+666	166863056	166863074	307	GGTATGTATTCTATTCTG	667	GGUAUGUAUUCUUAUCUG
SCN1A-IVS23+671	166863051	166863069	308	TTCTAGGTATGTATTCTA	668	UUCUAGGUAUGUAUUCUA
SCN1A-IVS23+676	166863046	166863064	309	TTTATTTCTAGGTATGTA	669	UUUAUUUCUAGGUAUGUA
SCN1A-IVS23+681	166863041	166863059	310	TTTGTTTTATTCTAGGT	670	UUGUUUUUAUUCUAGGU
SCN1A-IVS23+686	166863036	166863054	311	ACGTTTTTGTTTTATTC	671	ACGUUUUUGUUUAUUC
SCN1A-IVS23+691	166863031	166863049	312	ATAAGACGTTTTGT	672	AUAAGACGUUUUGUUU
SCN1A-IVS23+696	166863026	166863044	313	TCATGATAAGACGTTTT	673	UCAUGAUAGACGUUUU
SCN1A-IVS23+701	166863021	166863039	314	AATACTCATGATAAGACG	674	AAUACUUAUGAUAGACG
SCN1A-IVS23+706	166863016	166863034	315	ATCTTAATACTCATGATA	675	AUCUAAUUAUUAUGAUA
SCN1A-IVS23+711	166863011	166863029	316	ATTTTATCTTAATACTCA	676	AUUUAUCUUAUAUUAUCA
SCN1A-IVS23+716	166863006	166863024	317	CTTAAATTTTATCTTAAT	677	CUUAAUUUAUUAUUAU
SCN1A-IVS23+721	166863001	166863019	318	TATGCCCTAAATTTTATC	678	UAGCCUUAUUUAUUAUC
SCN1A-IVS23+726	166862996	166863014	319	GAGTTTATGCCCTAAAT	679	GAGUUAUAGCCUUAUUAU
SCN1A-IVS23+731	166862991	166863009	320	GAAGTGAGTTTATGCCCT	680	GAAGUGAGUUAUAGCCU
SCN1A-IVS23+736	166862986	166863004	321	TCTAAGAAGTGAGTTTAT	681	UCUAAGAAGUGAGUUAU
SCN1A-IVS23+741	166862981	166862999	322	CTTATTCTAAGAAGTGAG	682	CUUAUUAAGAAGUGAG
SCN1A-IVS23+746	166862976	166862994	323	AGTTACTTATTCTAAGAA	683	AGUAUUAUUAUUAAGAA
SCN1A-IVS23+751	166862971	166862989	324	TTGGGAGTTACTTATTCT	684	UUGGGAGUUAUUAUUAU
SCN1A-IVS23+756	166862966	166862984	325	GTTAGTTGGGAGTTACTT	685	GUUAGUUGGAGUUAUUA
SCN1A-IVS23+761	166862961	166862979	326	AGAAAGTTAGTTGGGAGT	686	AGAAAGUAGUUGGAGU
SCN1A-IVS23+766	166862956	166862974	327	ATCCTAGAAAGTTAGTTG	687	AUCCUAGAAAGUAGUUG
SCN1A-IVS23+771	166862951	166862969	328	TTAAATCCTAGAAAGTT	688	UUAUUUCCUAGAAAGUU
SCN1A-IVS23+776	166862946	166862964	329	ATGTTTAAATCCTAGA	689	AUGUUUAAAAUCCUAGA
SCN1A-IVS23+781	166862941	166862959	330	GTGTTATGTTTAAATC	690	GUGUAUGUUUAAAAU
SCN1A-IVS23+786	166862936	166862954	331	TCACTGTGTTATGTTT	691	UCACUGUUAUGUUUA
SCN1A-IVS23+791	166862931	166862949	332	TGTTTCACTGTGTTATG	692	UGUUUCACUGUUAUG
SCN1A-IVS23+796	166862926	166862944	333	ATGTATGTTTCACTGTG	693	AUGUAUGUUUACUGUG
SCN1A-IVS23+801	166862921	166862939	334	TGTTTATGTATGTTTCA	694	UGUUUAUGUAUGUUUA
SCN1A-IVS23+806	166862916	166862934	335	AGTTATGTTTATGTATGT	695	AGUAUGUUUAUGUAUGU

【 0 2 0 9 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 8】

SCN1A-IVS23+811	166862911	166862929	336	TGTAGAGTTATGTTTATG	696	UGUAGAGUUAUGUUUUAUG
SCN1A-IVS23+816	166862906	166862924	337	TAAATGTAGAGTTATGT	697	UAAAAUGUAGAGUUAUGU
SCN1A-IVS23+821	166862901	166862919	338	ATAAATAAAATGTAGAGT	698	AUAAAUAAAUGUAGAGU
SCN1A-IVS23+826	166862896	166862914	339	TAAGAATAAAATAAATGT	699	UAAGAAUAAAUAUUUAUGU
SCN1A-IVS23+831	166862891	166862909	340	AACTTTAAGAATAAATAA	700	AACUUUAGAUAUAAUAA
SCN1A-IVS23+836	166862886	166862904	341	ACTTAAACTTTAAGAATA	701	ACUUAACUUUAGAUAUA
SCN1A-IVS23+841	166862881	166862899	342	AATACACTTAACTTTAA	702	AAUACACUAAACUUUAA
SCN1A-IVS23+846	166862876	166862894	343	TGTATAATACACTTAAAC	703	UGUAUAUACACUAAAC
SCN1A-IVS23+851	166862871	166862889	344	CTTCTGTATAATACT	704	CUUCUGUAUAAUACACU
SCN1A-IVS23+856	166862866	166862884	345	CTCTCTCTCTGTATAAT	705	CUCUCUCUCUGUAUAAU
SCN1A-IVS23+861	166862861	166862879	346	ATAAACTCTTCTCTGT	706	AUAAACUCUCUCUCUGU
SCN1A-IVS23+866	166862856	166862874	347	CGAATATAAACTCTCTT	707	CGAAUUAACUCUCUCU
SCN1A-IVS23+871	166862851	166862869	348	TCTCTCGAATATAAACTC	708	UCUCUCGAUAUAAACUC
SCN1A-IVS23+876	166862846	166862864	349	TTCTGTCTCTCGAATATA	709	UUCUGUCUCUGAAUUA
SCN1A-IVS23+881	166862841	166862859	350	ACTTTTCTGTCTCTCGA	710	ACUUUUUCUGUCUCUGA
SCN1A-IVS23+886	166862836	166862854	351	TTCTGACITTTTCTGTCT	711	UUCUGACUUUUUCUGUCU
SCN1A-IVS23+891	166862831	166862849	352	AAAAATTCTGACTTTTTC	712	AAAAUUCUGACUUUUUC
SCN1A-IVS23+896	166862826	166862844	353	CAACAAAAATCTGACT	713	CAACAAAAAUUCUGACU
SCN1A-IVS23+901	166862821	166862839	354	TGATCCAAACAAAAATTC	714	UGAUCCAAACAAAAUUC
SCN1A-IVS23+906	166862816	166862834	355	ATTGGTGATCCAAACAAA	715	AUUGGUGAUCCAAACAAA
SCN1A-IVS23+911	166862811	166862829	356	GATATATTGGTGATCCAA	716	GAUAUAUUGGUGAUCCAA
SCN1A-IVS23+916	166862806	166862824	357	GCTATGATATATTGGTGA	717	GCUAUGAUUAUUGGUGA
SCN1A-IVS23+921	166862801	166862819	358	TGTAAGCTATGATATATT	718	UGUAAGCUAUGAUUAUU
SCN1A-IVS23+926	166862796	166862814	359	TTTTTTGTAAGCTATGAT	719	UUUUUGUAAGCUAUGAU
SCN1A-IVS23+931	166862791	166862809	360	ACAGTTTTTTGTAAGCT	720	ACAGUUUUUUGUAAGCU
SCN1A-IVS23+936	166862786	166862804	361	TTAAGACAGTTTTTTTGT	721	UUAAGACAGUUUUUUGU
SCN1A-IVS23+941	166862781	166862799	362	TTTAATTAAGACAGTTTT	722	UUUAUAUAGACAGUUUU
SCN1A-IVS23+946	166862776	166862794	363	TGGGTTTTAATTAAGACA	723	UGGGUUUUAUUAAGACA
SCN1A-IVS23+951	166862771	166862789	364	TGTTGTGGGTTTAAATTA	724	UGUUGGGUUUUAUUA
SCN1A-IVS23+956	166862766	166862784	365	AATTATGTTGTGGGTTT	725	AAUAUGUUGGGUUUU
SCN1A-IVS23+961	166862761	166862779	366	AAAAAAATTATGTTGTGG	726	AAAAAAUUAUGUUGUGG
SCN1A-IVS23+966	166862756	166862774	367	AATCTAAAAAATTATGT	727	AAUCUAAAAAAUUAUGU
SCN1A-IVS23+971	166862751	166862769	368	TAAAAATCTAAAAAAT	728	UUAAAAUCUAAAAAAU
SCN1A-IVS23+976	166862746	166862764	369	CTTCTTAAAAATCTAAA	729	CUUCUAAAAAUUAAAA
SCN1A-IVS23+981	166862741	166862759	370	AGAATCTTCTTAAAAAT	730	AGAAUCUUCUAAAAAU
SCN1A-IVS23+986	166862736	166862754	371	ATAATAGAATCTTTCTTA	731	AUAAUAGAAUCUUCUUA

【 0 2 1 0 】

実施例 4 : R T - P C R によって評価される、S C N 1 A エクソン 2 3 ( エクソン 2 0 x ) 領域の伸長 A S O ウォーク

[00232] A S O ウォーク配列について、例えば R T - P C R によって評価することができる。図 5 A では、代表的な P A G E が、R e n C e l l における 1 μ M の濃度でのヌクレオフェクションによる、実施例 3 において、そして図 3 の記載において本明細書に記載したような、エクソン 2 0 x 領域を標的とする、S C N 1 A モック処理、対照 A S O 処理された、S Y B R - 安全染色 R T - P C R 産物を示す。2 種の産物 ( 一方はエクソン 2 0 x を含んでなり、他方はエクソン 2 0 x を排除している ) について定量して、エクソン 2 0 x 包含 % を棒グラフ中にプロットする ( 図 5 B )。T a q m a n q P C R 産物についても R P L 3 2 内部対照に対して正規化して、モックに比した倍数変化を棒グラフ中に

プロットする（図5C）。

【0211】

[00233] 本発明の好ましい態様について本明細書において示して記載してきたが、当業者には、このような態様が実施例によってのみ提供されることが明らかであろう。当業者には、本発明の精神より逸脱することなく、数多くの変形態様、変化態様、及び置換態様が今や思いつくだらう。本発明を実施する場合には、本明細書に記載される本発明の態様に対する様々な代替態様を利用し得ると理解されたい。以下の特許請求項は、本発明の範囲を明確化するものであって、これら特許請求項の範囲内にある方法及び構造とそれらの均等物は、それに含まれると企図される。

本願は、以下の発明を包含する。

〔項目1〕 ナンセンス変異依存性RNA分解誘導エクソンを含有するmRNA（NMDエクソンmRNA）であってSCN1Aタンパク質をコードするmRNAを有する細胞において、SCN1Aタンパク質の発現を調節する方法であって、

該細胞へ治療薬剤を接触させ、それにより治療薬剤は、SCN1Aタンパク質をコードするNMDエクソンmRNAからのNMDエクソンのスプライシングを調節し、それによりSCN1Aタンパク質をコードするプロセシングされたmRNAのレベルを調節し、そして、

該細胞におけるSCN1Aタンパク質の発現を調節する、

ことを含んでなり、ここで該治療薬剤は、SCN1AをコードするNMDエクソンmRNAの標的化部分へ結合し、そして該標的化部分は：

NMD誘導エクソン（NIE）の5'端から約1000ヌクレオチド上流～NIEの5'端から約100ヌクレオチド上流；又は

NIEの3'端の約100ヌクレオチド下流～NIEの3'端の約1000ヌクレオチド下流、

にある、前記方法。

〔項目2〕 疾患又は病態を治療することが必要な被験者の細胞においてSCN1Aタンパク質の発現を調節することによって、該被験者においてそれを治療する方法であって：該細胞中のNMDエクソンを含有してSCN1AをコードするmRNAからのナンセンス変異依存性mRNA分解誘導エクソン（NMDエクソン）のスプライシングを調節する治療薬剤と該被験者の該細胞とを接触させ、それによりSCN1Aタンパク質をコードするプロセシングされたmRNAのレベルを調節し、そして

該被験者の該細胞におけるSCN1Aタンパク質の発現を調節する、

ことを含んでなり、ここで該治療薬剤は、SCN1AをコードするNMDエクソンmRNAの標的化部分へ結合し、そして該標的化部分は：

NMD誘導エクソン（NIE）の5'端から約1000ヌクレオチド上流～NIEの5'端から約100ヌクレオチド上流；又は

NIEの3'端の約100ヌクレオチド下流～NIEの3'端の約1000ヌクレオチド下流、

にある、前記方法。

〔項目3〕 治療薬剤が、標的化部分の領域からのNMDエクソンのスプライシングに關与する因子の結合に干渉する、項目1又は2の方法。

〔項目4〕 標的化部分が、NIEの5'端の最大でも約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド上流にある、項目1又は2の方法。

〔項目5〕 標的化部分が、NIEの5'端の少なくとも約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約40ヌクレオ

10

20

30

40

50

チド、約 30ヌクレオチド、約 20ヌクレオチド、約 10ヌクレオチド、約 5ヌクレオチド、約 4ヌクレオチド、約 2ヌクレオチド、約 1ヌクレオチド上流にある、項目 1 又は 2 の方法。

〔項目 6〕 標的化部分が、NIE の 3' 端の最大でも約 800ヌクレオチド、約 700ヌクレオチド、約 600ヌクレオチド、約 500ヌクレオチド、約 400ヌクレオチド、約 300ヌクレオチド、約 200ヌクレオチド、約 100ヌクレオチド、約 80ヌクレオチド、約 70ヌクレオチド、約 60ヌクレオチド、約 50ヌクレオチド下流にある、項目 1 又は 2 の方法。

〔項目 7〕 標的化部分が、NIE の 3' 端の少なくとも約 800ヌクレオチド、約 700ヌクレオチド、約 600ヌクレオチド、約 500ヌクレオチド、約 400ヌクレオチド、約 300ヌクレオチド、約 200ヌクレオチド、約 100ヌクレオチド、約 80ヌクレオチド、約 70ヌクレオチド、約 60ヌクレオチド、約 50ヌクレオチド、約 40ヌクレオチド、約 30ヌクレオチド、約 20ヌクレオチド、約 10ヌクレオチド、約 5ヌクレオチド、約 4ヌクレオチド、約 2ヌクレオチド、約 1ヌクレオチド下流にある、項目 1 又は 2 の方法。

〔項目 8〕 治療薬剤がアンチセンスオリゴマー (ASO) である、項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項の方法。

〔項目 9〕 ASO が、配列番号 12 ~ 731 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、97%、又は 100% 同一である配列を含む、項目 8 の方法。

〔項目 10〕 治療薬剤が、SCN1A タンパク質をコードするプロセシングされた mRNA からの NMD エクソンの排除を促進させる、項目 1 ~ 9 のいずれか 1 項の方法。

〔項目 11〕 治療薬剤と接触した細胞における、SCN1A タンパク質をコードするプロセシングされた mRNA からの NMD エクソンの排除が、対照細胞における、SCN1A タンパク質をコードするプロセシングされた mRNA からの NMD エクソンの排除と比較して、約 1.1 ~ 約 10 倍、約 1.5 ~ 約 10 倍、約 2 ~ 約 10 倍、約 3 ~ 約 10 倍、約 4 ~ 約 10 倍、約 1.1 ~ 約 5 倍、約 1.1 ~ 約 6 倍、約 1.1 ~ 約 7 倍、約 1.1 ~ 約 8 倍、約 1.1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 約 9 倍、少なくとも約 1.1 倍、少なくとも約 1.5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2.5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3.5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、又は少なくとも約 10 倍増加する、項目 10 の方法。

〔項目 12〕 治療薬剤が、SCN1A タンパク質をコードするプロセシングされた mRNA の該細胞中のレベルを増加させる、項目 10 の方法。

〔項目 13〕 治療薬剤と接触した細胞における、SCN1A タンパク質をコードするプロセシングされた mRNA の量が、対照細胞における、SCN1A タンパク質をコードするプロセシングされた mRNA の全量と比較して、約 1.1 ~ 約 10 倍、約 1.5 ~ 約 10 倍、約 2 ~ 約 10 倍、約 3 ~ 約 10 倍、約 4 ~ 約 10 倍、約 1.1 ~ 約 5 倍、約 1.1 ~ 約 6 倍、約 1.1 ~ 約 7 倍、約 1.1 ~ 約 8 倍、約 1.1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 約 9 倍、少なくとも約 1.1 倍、少なくとも約 1.5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2.5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3.5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、又は少なくとも約 10 倍増加する、項目 10 の方法。

〔項目 14〕 疾患又は病態が、Na<sub>v</sub>1.1 における機能欠失変異によって誘導される、項目 2 の方法。

〔項目 15〕 疾患又は病態が SCN1A 遺伝子のハプロ不全に関連し、ここで該被験者は、機能的 SCN1A をコードする第 1 対立遺伝子と、SCN1A が産生されないか又は低下したレベルで産生される第 2 対立遺伝子、又は非機能的 SCN1A 又は部分機能的 SCN1A をコードする第 2 対立遺伝子とを有する、項目 14 の方法。

10

20

30

40

50

〔項目 16〕 疾患又は病態が脳症である、項目 14 の方法。

〔項目 17〕 脳症がてんかん性脳症である、項目 16 の方法。

〔項目 18〕 疾患又は病態が、ドラベ症候群 (DS)；乳児重症ミオクロニーてんかん (SMEI) - 辺縁型 (SMEB)；熱性痙攣 (FS)；全般性てんかん熱性痙攣プラス (GEFS+)；てんかん性脳症、早期乳児、13；潜在性 (cryptogenic) 全般性てんかん；潜在性焦点性てんかん；ミオクロニー失立発作てんかん；レノックス・ガスト症候群；ウェスト症候群；特発性痙攣；早期ミオクロニー脳症；進行性ミオクロニーてんかん；小児交互性片麻痺；分類不能てんかん性脳症；てんかんにおける予期せぬ突然死 (SUDEP)；洞不全症候群 1；自閉症；又は乳児悪性遊走性部分発作である、項目 14 の方法。

10

〔項目 19〕 GEFS+ が、全般性てんかん熱性痙攣プラス 2 型である、項目 18 の方法。

〔項目 20〕 熱性痙攣が、家族性熱性痙攣 3A である、項目 18 の方法。

〔項目 21〕 SMEB が、全般性棘徐波のない SMEB (SMEB-SW)、ミオクロニー発作のない SMEB (SMEB-M)、SMEI の 1 より多い特徴を欠いている SMEB (SMEB-O)、又は全身性強直性間代性発作を伴う小児難治性てんかん (ICEGTC) である、項目 18 の方法。

〔項目 22〕 ASO が、配列番号 72 又は 432 より選択される配列から成る、項目 1 又は 2 の方法。

〔項目 23〕 ASO が、配列番号 73 又は 433 より選択される配列から成る、項目 1 又は 2 の方法。

20

〔項目 24〕 ASO が、配列番号 76 又は 436 より選択される配列から成る、項目 1 又は 2 の方法。

〔項目 25〕 ASO が、配列番号 181 又は 541 より選択される配列から成る、項目 1 又は 2 の方法。

〔項目 26〕 ASO が、配列番号 220 又は 580 より選択される配列から成る、項目 1 又は 2 の方法。

〔項目 27〕 ナンセンス変異依存性 RNA 分解誘導エクソンを含有する mRNA (NMD エクソン mRNA) であって SCN1A タンパク質をコードする mRNA を有する細胞において、SCN1A タンパク質の発現を調節する方法であって、

30

該細胞へ治療薬剤を接触させ、それにより治療薬剤は、SCN1A タンパク質をコードする NMD エクソン mRNA からの NMD エクソンのスプライシングを調節し、それにより SCN1A タンパク質をコードするプロセシングされた mRNA のレベルを調節し、そして該細胞における SCN1A タンパク質の発現を調節する、

ことを含んでなり、ここで該治療薬剤は、SCN1A をコードする NMD エクソン mRNA の標的化部分へ結合し、そして該標的化部分は、NMD 誘導エクソン (NIE) の 5' 端から約 1000 ヌクレオチド上流 ~ NIE の 3' 端の約 1000 ヌクレオチド下流にある、前記方法。

〔項目 28〕 疾患又は病態を治療することが必要な被験者の細胞において SCN1A タンパク質の発現を調節することによって、該被験者においてそれを治療する方法であって：該細胞中の NMD エクソンを含有して SCN1A をコードする mRNA からのナンセンス変異依存性 mRNA 分解誘導エクソン (NMD エクソン) のスプライシングを調節する治療薬剤と該被験者の該細胞とを接触させ、それにより SCN1A タンパク質をコードするプロセシングされた mRNA のレベルを調節し、そして

40

該被験者の該細胞における SCN1A タンパク質の発現を調節する、

ことを含んでなり；ここで該治療薬剤は、SCN1A をコードする NMD エクソン mRNA の標的化部分へ結合し、そして該標的化部分は、NMD 誘導エクソン (NIE) の 5' 端から約 1000 ヌクレオチド上流 ~ NIE の 3' 端の約 1000 ヌクレオチド下流にある、前記方法。

〔項目 29〕 配列番号 12 ~ 731 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80%、85

50

%、90%、95%、97%、又は100%同一である配列を含んでなる、アンチセンスオリゴマー（ASO）。—

【項目30】 配列番号12～731より選択される配列から成る、アンチセンスオリゴマー（ASO）。—

【項目31】 疾患又は病態を治療することの必要な被験者の細胞においてSCN1Aタンパク質の発現を調節することによって、該被験者においてそれを治療する方法であって：項目29又は30のASOと該被験者の該細胞とを接触させることを含んでなる、前記方法。—

【項目32】 項目29又は30のASOを含んでなるキット。—

【図面】

【図1AB】

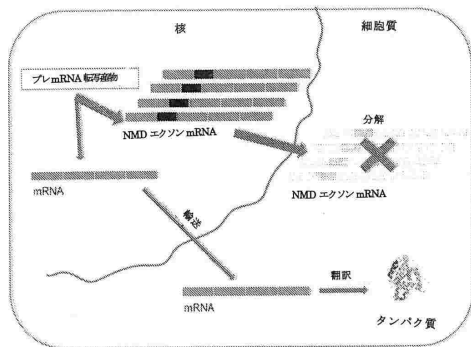


FIG. 1A

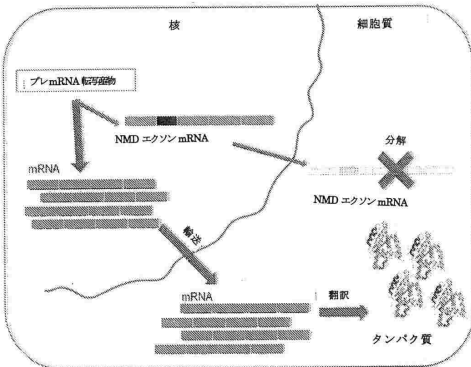


FIG. 1B

【図1C】

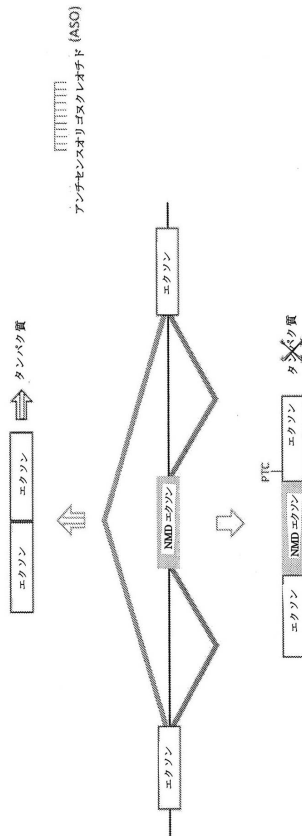
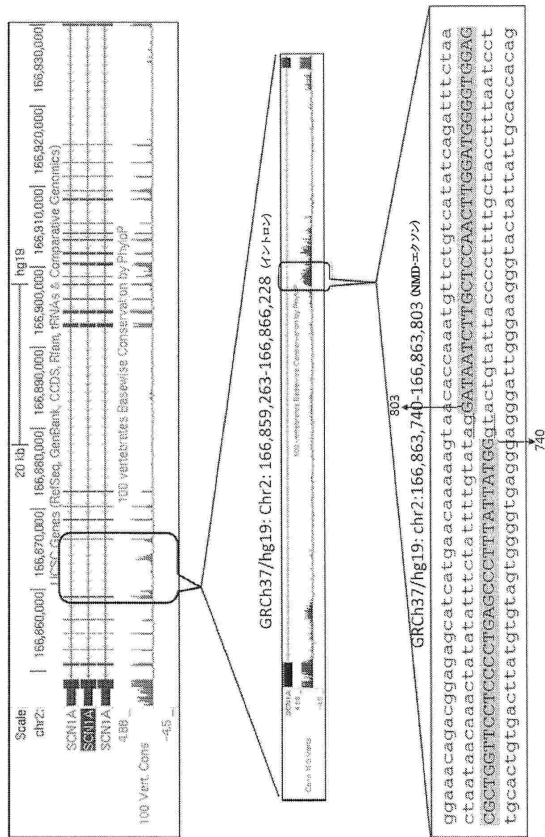
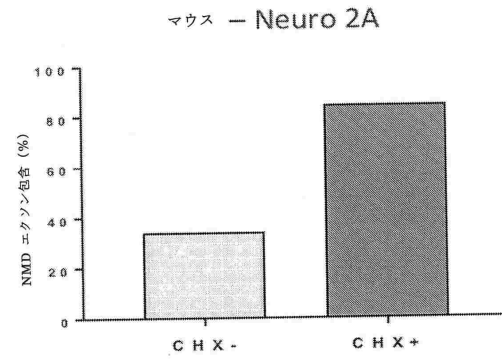


FIG. 1C

【 図 2 】

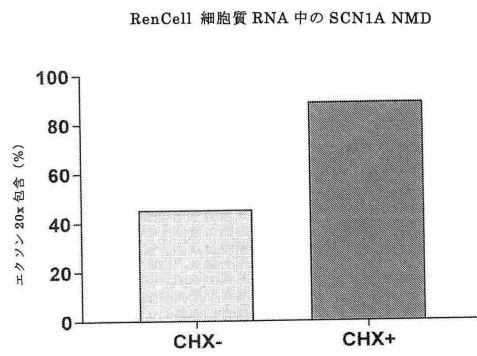


【 図 3 】



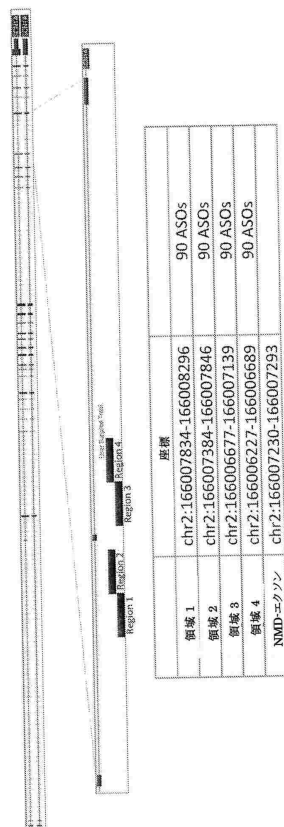
**FIG. 3A**

FIG. 2



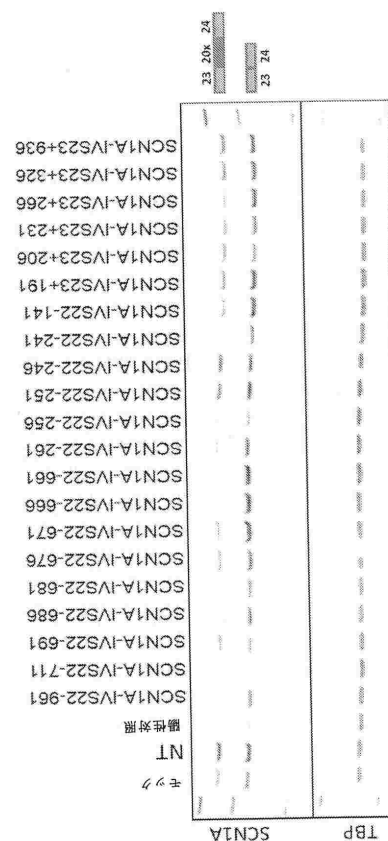
**FIG. 3B**

【 図 4 】



**FIG. 4**

【 図 5 A 】



**FIG. 5A**

【 図 5 B 】

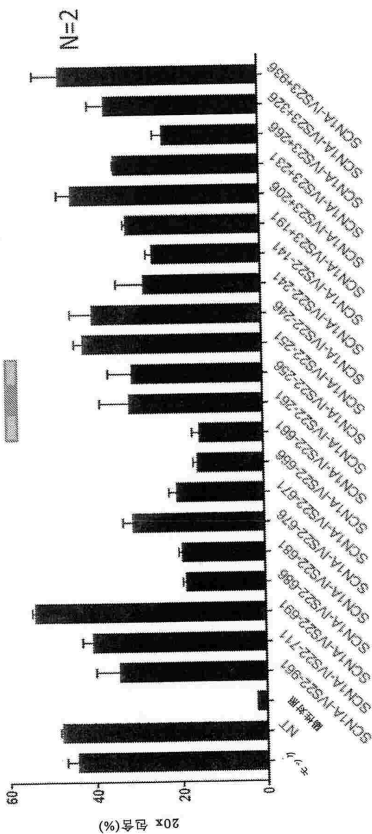


FIG. 5B

【 図 5 C 】

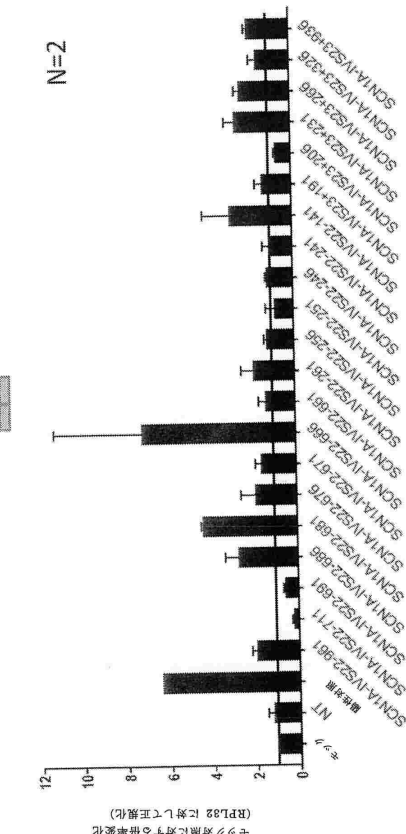


FIG. 5C

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113 1 4 0 Z

1 3 0 , ポストン , チェスナット・アベニュー 1 9 6 , ユニット・ビー

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 7 / 1 0 6 3 7 7 ( W O , A 1 )

特許第 7 4 2 0 6 7 9 ( J P , B 2 )

特許第 6 8 2 7 1 4 8 ( J P , B 2 )

Am. J. Hum. Genet. , 2018年 , 103, [6] , p.1022-1029

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0

C 1 2 N 1 5 / 1 1 3

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 P 2 5 / 0 0 - 2 5 / 3 6

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )