

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-537497
(P2020-537497A)

(43) 公表日 令和2年12月24日(2020.12.24)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/113 (2010.01)
C 12 N 15/12 (2006.01)
A 61 P 25/00 (2006.01)
A 61 P 21/00 (2006.01)
A 61 P 43/00 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/113
C 12 N 15/12
A 61 P 25/00
A 61 P 21/00
A 61 P 43/00

テーマコード(参考)

4 C 076
4 C 084
4 C 086

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 181 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-514269 (P2020-514269)
(86) (22) 出願日 平成30年9月21日 (2018.9.21)
(85) 翻訳文提出日 令和2年5月11日 (2020.5.11)
(86) 國際出願番号 PCT/US2018/052289
(87) 國際公開番号 WO2019/060775
(87) 國際公開日 平成31年3月28日 (2019.3.28)
(31) 優先権主張番号 62/561,939
(32) 優先日 平成29年9月22日 (2017.9.22)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31) 優先権主張番号 62/696,766
(32) 優先日 平成30年7月11日 (2018.7.11)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71) 出願人 518345192
アビディティー バイオサイエンシーズ,
インク.
アメリカ合衆国 92037 カリフォル
ニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・
パインズ・ロード 10975 スイート
150
(74) 代理人 100082072
弁理士 清原 義博
(72) 発明者 レビン, アーサー エー
アメリカ合衆国 92037 カリフォル
ニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・
パインズ・ロード 10975 スイート
150

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】エクソンスキッピングを誘発する核酸ポリペプチド組成物と方法

(57) 【要約】

エクソンスキッピングまたはエクソンインクルージョンを誘導するために、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物における挿入、欠失、複製、あるいは変化を引き起こす分子および医薬組成物が本明細書で開示される。エクソンスキッピングまたはエクソンインクルージョンを誘導するために誤ってスプライシングされたmRNA転写産物における挿入、欠失、複製、あるいは変化を引き起こす分子あるいは医薬組成物を含む、疾患または障害を処置する方法が本明細書でさらに記載される。

【選択図】図3

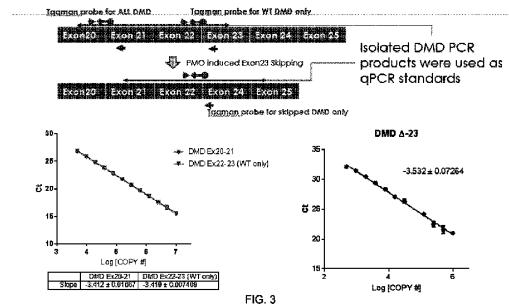


FIG. 3

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

D M D 遺伝子の m R N A 前駆体転写産物の標的領域にハイブリダイズする少なくとも 1 つのポリ核酸分子と結合する標的細胞結合部分を含む、ポリ核酸抱合体であって、ここで、少なくとも 1 つのポリ核酸分子は、機能性ジストロフィンタンパク質をコードする m R N A 転写産物を生成するために m R N A 前駆体転写産物からエクソンのスプライシングアウトを誘発する、ポリ核酸抱合体。

【請求項 2】

機能性ジストロフィンタンパク質は、ジストロフィンタンパク質からの切断された形態である、請求項 1 に記載のポリ核酸抱合体。 10

【請求項 3】

標的領域はエクソン - イントロン接合部にあり、エクソンは、スプライシングアウトされることになっているエクソンである、請求項 1 に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 4】

エクソンは、エクソン 8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または 55 である、請求項 3 に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 5】

エクソン - イントロン接合部は、スプライシングアウトされることになっているエクソンの 5' に位置する、請求項 3 に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 6】

標的領域はエクソン - イントロン接合部の上流のイントロン領域である、請求項 5 に記載のポリ核酸抱合体。 20

【請求項 7】

標的領域は、エクソン - イントロン接合部の約 500、450、400、350、300、250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、あるいは 10 ヌクレオチド上流である、請求項 5 または 6 に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 8】

エクソン - イントロン接合部は、スプライシングアウトされることになっているエクソンの 3' に位置する、請求項 3 に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 9】

標的領域はエクソン - イントロン接合部の下流のイントロン領域である、請求項 8 に記載のポリ核酸抱合体。 30

【請求項 10】

標的領域は、エクソン - イントロン接合部の約 500、450、400、350、300、250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、あるいは 10 ヌクレオチド下流である、請求項 8 または 9 に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 11】

標的細胞結合部分は、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、あるいは 8 以上のポリ核酸分子に結合する、請求項 1 - 10 のいずれか 1 つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 12】

ポリ核酸分子は、約 10 から約 50 ヌクレオチド長さを含む、請求項 1 - 10 のいずれか 1 つに記載のポリ核酸抱合体。 40

【請求項 13】

ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 964 - 1285 から選択された配列に対して、約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、あるいは 99% の配列同一性を含む、請求項 1 - 12 のいずれか 1 つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 14】

ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 964 - 1285 から選択された塩基配列の少なくとも 10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む、請求項 1 - 13 のいずれか 1 つに記載のポ

リ核酸抱合体。

【請求項 15】

ポリ核酸分子はさらに、1、2、3、あるいは4つのミスマッチを含む、請求項1-14のいずれか1つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 16】

ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:1056-1094、1147-1162、または、1173-1211から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む、請求項1-15のいずれか1つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 17】

ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:1056-1076から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む、請求項16に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 18】

ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:1077-1094から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む、請求項16に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 19】

ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:1147-1162から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む、請求項16に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 20】

ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:1173-1211から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む、請求項16に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 21】

結合部分は抗体を含む、請求項1-19のいずれか1つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 22】

抗体は抗トランスフェリン抗体を含む、請求項21に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 23】

結合部分は血漿タンパク質を含む、請求項1-19のいずれか1つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 24】

ポリ核酸抱合体は、

$$A - (X^1 - B)_n$$

式()

を含み、

式中、

Aは結合部分を含み；

Bはポリ核酸分子からなり；

X¹は単結合あるいは第1の非高分子リンカーからなり；および、

nは1-12から選択された平均値である、請求項1-23のいずれか1つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 25】

ポリ核酸分子は、パッセンジャー鎖とガイド鎖とを含む、請求項1-24のいずれか1つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 26】

ガイド鎖は、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合、少なくとも1つの逆脱塩基部分、少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチド、あるいは、これらの組み合わせを含む、請求項25に記載のポリ核酸抱合体。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

ガイド鎖は、約2、3、4、5、6、7、8、あるいは9つのホスホロチオエート修飾された非天然のヌクレオチドを含む、請求項25に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 28】

ガイド鎖は、1つのホスホロチオエート修飾された非天然のヌクレオチドを含む、請求項25に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 29】

ホスホロチオエート修飾された非天然のヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのヌクレオチド間結合に位置する、請求項26-28のいずれか1つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 30】

少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、ガイド鎖の5'末端から、約1、2、3、4、あるいは5つの塩基離れて位置する、請求項26に記載のポリ核酸抱合体。

10

【請求項 31】

少なくとも1つの5'-ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、2'位置でさらに修飾される、請求項26または30に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 32】

2'修飾は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾されたヌクレオチドから選択される、請求項31に記載のポリ核酸抱合体。

20

【請求項 33】

パッセンジャー鎖は、少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー修飾された非天然のヌクレオチドを含む、請求項25に記載のポリ核酸抱合体。

30

【請求項 34】

パッセンジャー鎖は、100%ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー修飾された非天然のヌクレオチドを含む、請求項25に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 35】

パッセンジャー鎖はガイド鎖よりも長さが短く、それによって、5'オーバーハング、3'オーバーハング、あるいはこれらの組み合わせを生成する、請求項25に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 36】

パッセンジャー鎖はガイド鎖と長さが等しく、それによって、ポリ核酸分子の各末端で平滑末端を生成する、請求項25に記載のポリ核酸抱合体。

40

【請求項 37】

ポリ核酸分子はホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー/RNAヘテロ二本鎖である、請求項35または36に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 38】

パッセンジャー鎖は、少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のペプチド核酸修飾された非天然のヌクレオチドを含む、請求項25に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 39】

パッセンジャー鎖は、100%ペプチド核酸修飾された非天然のヌクレオチドを含む、請求項25に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 40】

50

パッセンジャー鎖はガイド鎖よりも長さが短く、それによって、5'オーバーハング、3'オーバーハング、あるいはこれらの組み合わせを生成する、請求項25に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項41】

パッセンジャー鎖はガイド鎖と長さが等しく、それによって、ポリ核酸分子の各末端で平滑末端を生成する、請求項25に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項42】

ポリ核酸分子はペプチド核酸/RNAヘテロ二本鎖である、請求項40または41に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項43】

パッセンジャー鎖はA-X¹に結合される、請求項25に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項44】

A-X¹はパッセンジャー鎖の5'末端に結合される、請求項43に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項45】

A-X¹はパッセンジャー鎖の3'末端に結合される、請求項43に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項46】

X¹は単結合である、請求項24または43-45のいずれか1つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項47】

X¹はC₁-C₆アルキル基である、請求項24または43-45のいずれか1つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項48】

X¹は、随意にC₁-C₆アルキル基に結合された、ホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである、請求項24または43-45のいずれか1つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項49】

さらにCを含む、請求項1に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項50】

Cはポリエチレングリコールである、請求項49に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項51】

CはX²を介して直接Bに結合される、請求項24-50のいずれか1つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項52】

X²は単結合あるいは第2の非高分子リンカーからなる、請求項51に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項53】

X²は単結合である、請求項52に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項54】

X²はC₁-C₆アルキル基である、請求項52に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項55】

X²は、随意にC₁-C₆アルキル基に結合された、ホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである、請求項52に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項56】

パッセンジャー鎖はA-X¹とX²-Cに結合される、請求項1-55のいずれか1つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項57】

A-X¹はパッセンジャー鎖の5'末端に結合され、X²-Cはパッセンジャー鎖の3'末端に結合される、請求項1-56のいずれか1つに記載のポリ核酸抱合体。

10

20

30

40

50

【請求項 5 8】

$X^2 - C$ はパッセンジャー鎖の 5' 末端に結合され、 $A - X^1$ はパッセンジャー鎖の 3' 末端に結合される、請求項 1 - 5 6 のいずれか 1 つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 5 9】

ポリ核酸抱合体は、

$$A - X^1 - (B - X^2 - C)_n$$

式 (V I)

を含み；

式中、

A は結合部分を含み；

B はポリ核酸分子からなり；

C はポリマーからなり；

X^1 は単結合あるいは第 1 の非高分子リンカーからなり；

X^2 は単結合あるいは第 2 の非高分子リンカーからなり；および、

n は 1 - 1 2 から選択された平均値である、請求項 1 - 5 8 のいずれか 1 つに記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 6 0】

さらに D を含む、請求項 1 に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 6 1】

D はエンドソーム溶解部分である、請求項 6 0 に記載のポリ核酸抱合体。

【請求項 6 2】

SEQ ID NO : 1 0 5 6 - 1 0 5 8 あるいは 1 0 8 7 - 1 0 8 9 から選択された塩基配列の少なくとも 2 3 の隣接する塩基を含むポリ核酸分子であって、ここで、ポリ核酸分子は 5 0 以下のヌクレオチド長さを含む、ポリ核酸分子。

【請求項 6 3】

SEQ ID NO : 1 0 5 6 - 1 0 5 8 を含むポリ核酸分子であって、ここで、ポリ核酸分子は 5 0 以下のヌクレオチド長さを含む、ポリ核酸分子。

【請求項 6 4】

SEQ ID NO : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 を含むポリ核酸分子であって、ここで、ポリ核酸分子は 5 0 以下のヌクレオチド長さを含む、ポリ核酸分子。

【請求項 6 5】

請求項 1 - 6 1 のポリ核酸抱合体、あるいは、請求項 6 2 - 6 4 のポリ核酸分子；および、薬学的に許容可能な賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 6 6】

前記医薬組成物は全身送達のために製剤化される、請求項 6 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 7】

前記医薬組成物は非経口投与のために製剤化される、請求項 6 5 または 6 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 8】

被験体の欠損 mRNA を特徴とする疾患または疾病を処置する方法であって、

前記方法は、

機能性タンパク質をコードするプロセシングされた mRNA を生成するために欠損 mRNA を引き起こすエクソンのスキッピングを誘導するべく、請求項 1 - 6 1 のポリ核酸抱合体、あるいは、請求項 6 2 - 6 4 のポリ核酸分子を、被験体に投与する工程であって、それによって、被験体の疾患または疾病を処置する、工程、を含む、方法。

【請求項 6 9】

前記疾患または疾病が、神経筋疾患、遺伝病、癌、遺伝性疾患、あるいは心血管疾患である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

神経筋疾患が筋ジストロフィーである、請求項 6 9 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 1】

筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、あるいは筋緊張性ジストロフィーである、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

被験体の筋ジストロフィーを処置する方法であって、前記方法は：

請求項 1 - 6 1 のポリ核酸抱合体、あるいは、請求項 6 2 - 6 4 のポリ核酸分子を被験体に投与する工程であって、それによって、被験体の筋ジストロフィーを処置する、工程、を含む、方法。

【請求項 7 3】

筋ジストロフィーはデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、請求項 7 2 に記載の方法。
。

【請求項 7 4】

被験体はヒトである、請求項 1 - 7 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 7 5】

請求項 1 - 6 1 のポリ核酸抱合体あるいは請求項 6 2 - 6 4 のポリ核酸分子を含む、キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】****相互参照**

本出願は、2017年9月22日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 5 6 1 , 9 3 9 号と、2018年7月11日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 6 9 6 , 7 6 6 号の利益を主張するものであり、これらは各々、その全体における引用により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

R N A 機能の調節は治療的関心を集める発展途上の領域である。アンチセンスオリゴヌクレオチドと低分子干渉 R N A のように m R N A 安定性に影響を与える薬物は、R N A 機能を調節する一つの方法である。オリゴヌクレオチドの別の群は、最終的な遺伝子産物：コードされたタンパク質から m R N A 前駆体の特定の領域を包含または除外するために、m R N A 前駆体の処理を変更することにより、R N A 機能を調節することができる。したがって、オリゴヌクレオチド治療薬は、疾患状態におけるタンパク質発現を調節する手段を表し、したがって、治療薬としての有用性を有している。

【発明の概要】**【0 0 0 3】**

本明細書では、特定の実施形態において、R N A プロセシングを調節するための分子および医薬組成物が開示される。いくつかの実施形態において、筋ジストロフィーの処置のための分子と医薬組成物も本明細書で開示される。

【0 0 0 4】

本明細書では、ある実施形態において、被験体の誤ってスプライシングされた m R N A 転写産物によって引き起こされた疾患または障害を処置する方法が開示され、該方法は、被験体にポリ核酸分子抱合体を投与する工程を含み、ここで、ポリ核酸分子抱合体は細胞標的結合部分に結合され、ここで、ポリヌクレオチドは随意に、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチド、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも 1 つの逆脱塩基部分を含み、ここで、ポリ核酸分子抱合体は、完全に処理された m R N A 転写産物を生成するために、誤ってスプライシングされた m R N A 転写産物中のエクソンスキッピングまたはエクソンインクリージョンを誘発するべく、誤ってスプライシングされた m R N A 転写産物の挿入、欠失、複製、あるいは変化を誘発し、および、ここで、完全に処理された m R N A 転写産物は、機能性タンパク質をコードし、それによって、被験

10

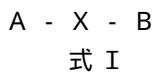
20

30

40

50

体の疾患または障害を処置する。いくつかの実施形態において、疾患または障害はさらに、mRNA中の1つ以上の突然変異を特徴とする。いくつかの実施形態において、疾患または障害は、神経筋疾患、遺伝病、癌、遺伝性疾患、あるいは心血管疾患を含む。いくつかの実施形態において、疾患または障害は筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態において、疾患または障害はデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態において、エクソンスキッピングは、DMD遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または、55のものである。いくつかの実施形態において、エクソンスキッピングはDMD遺伝子のエクソン23のものである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(I)であり、

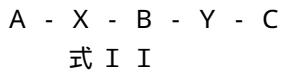


10

式中、

Aは結合部分であり；
Bはポリヌクレオチドであり；および、
Xは単結合または第1のリンカーである。

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(II)であり、



20

式中、

Aは結合部分であり；
Bはポリヌクレオチドであり；
Cは高分子であり；
Xは単結合または第1のリンカーであり；および、
Yは単結合または第2のリンカーである。

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(III)であり：



30

式中、

Aは結合部分であり；
Bはポリヌクレオチドであり；
Cは高分子であり；
Xは単結合または第1のリンカーであり；および、
Yは単結合または第2のリンカーである。

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、モルホリノ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、ロックド核酸(LNA)、エチレン核酸(ENA)、あるいはペプチド核酸(PNA)を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、モルホリノを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの逆塩基部分は少なくとも1つの末端である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合あるいはホスホロジチオエート結合を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約10から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、約15から約30、約18から約25、約18から約24、約19から約23、約20から約22ヌクレオチド長さの少なくとも1つである。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約16、17、18、19、20、21、22、23、24、または

40

50

25ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つを含む：約5%から約100%の修飾、約10%から約100%の修飾、約20%から約100%の修飾、約30%から約100%の修飾、約40%から約100%の修飾、約50%から約100%の修飾、約60%から約100%の修飾、約70%から約100%の修飾、約80%から約100%の修飾、および、約90%から約100%の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つを含む：約10%から約90%の修飾、約20%から約90%の修飾、約30%から約90%の修飾、約40%から約90%の修飾、約50%から約90%の修飾、約60%から約90%の修飾、約70%から約90%の修飾、および、約80%から約100%の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つを含む：約10%から約80%の修飾、約20%から約80%の修飾、約30%から約80%の修飾、約40%から約80%の修飾、約50%から約80%の修飾、約60%から約80%の修飾、および、約70%から約80%の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つを含む：約10%から約70%の修飾、約20%から約70%の修飾、約30%から約70%の修飾、約40%から約70%の修飾、約50%から約70%の修飾、および、約60%から約70%の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つを含む：約10%から約60%の修飾、約20%から約60%の修飾、約30%から約60%の修飾、約40%から約60%の修飾、および約50%から約60%の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つを含む：約10%から約40%の修飾、約20%から約40%の修飾、および約30%から約40%の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つを含む：約10%から約30%の修飾、および約20%から約30%の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約10%から約20%の修飾を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約15%から約90%、約20%から約80%、約30%から約70%、あるいは約40%から約60%の修飾を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は少なくとも約15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の修飾を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は少なくとも約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、またはそれ以上の修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は一本鎖を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は二本以上の鎖を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、二本鎖ポリ核酸分子を形成するために、第1のポリヌクレオチドと、第1のポリヌクレオチドにハイブリダイズされた第2のポリヌクレオチドとを含む。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドは少なくとも1つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはRNA分子である。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはsiRNA分子である。いくつかの実施形態において、XとYは独立して、単結合、分解性リンカー、非分解性リンカー、切断リンカー、あるいは非ポリマーリンカー基である。いくつかの実施形態において、Xは単結合である。いくつかの実施形態において、XはC₁-C₆アルキル基である。いくつかの実施形態において、YはC₁-C₆アルキル基である。いくつかの実施形態において、Xは、随意にC₁-C₆アルキル基に結合された、ホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態において、Yはホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態では、結合部分は、抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体またはその結合

フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価 F a b '、二価 F a b₂、一本鎖可変フラグメント (s c F v)、ダイアボディ、ミニボディ (m i n i b o d y)、ナノボディ、单ードメイン抗体 (s d A b)、またはラクダ抗体、あるいはその結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、Cはポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態では、Cは約 5,000 Da の分子量を有する。いくつかの実施形態において、A-XはBの5'末端へ共役され、Y-CはBの3'末端へ共役される。いくつかの実施形態において、Y-CはBの5'末端へ共役され、A-XはBの3'末端へ共役される。いくつかの実施形態において、A-X、Y-C、またはその組み合わせは、ヌクレオチド間結合群に共役される。いくつかの実施形態では、上記方法はDをさらに含む。いくつかの実施形態において、DはCあるいはAに共役される。いくつかの実施形態において、Dは、式 (I V) に係る式 (I I) の分子抱合体に結合され、



式中、

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；

Cは高分子であり；

Xは単結合または第1のリンカーであり；

Yは単結合または第2のリンカーであり；

Lは単結合または第3のリンカーであり；

Dはエンドゾーム溶解部分であり；および、

cは0と1の間の整数であり；

ここで、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチド、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも1つの逆脱塩基部分を含み、および、Dは、A、B、またはCのいかなる場所に共役している。

いくつかの実施形態では、DはINF7またはメリチンである。いくつかの実施形態では、LはC₁-C₆アルキル基である。いくつかの実施形態では、Lはホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態において、上記方法はさらに少なくとも第2の結合部分Aを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも第2の結合部分Aは、A、B、またはCに共役される。

【 0 0 0 5 】

いくつかの実施形態において、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物中のエクソンスキッピングあるいはエクソンインクルージョンを誘発するために、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物の挿入、欠失、複製、または変化を誘発する方法が本明細書で開示され、前記方法は：標的細胞をポリ核酸分子抱合体に接触させる工程であって、ポリヌクレオチドが、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチド、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも1つの逆脱塩基部分を含む、工程と；エクソンスキッピングまたはエクソンインクルージョンを誘発するために、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物の挿入、欠失、複製あるいは変化を誘発するべく、標的細胞内の誤ってスプライシングされたmRNA転写産物へポリ核酸分子抱合体をハイブリダイズする工程であって、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物がタンパク質の機能形態をコードすることができる、工程と；前の工程の完全に処理されたmRNA転写産物のタンパク質の機能形態を翻訳する工程を、含む。いくつかの実施形態において、標的細胞は被験体の標的細胞である。いくつかの実施形態において、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物はさらに疾患または障害を誘発する。いくつかの実施形態において、疾患または障害はさらに、mRNA中の1つ以上の突然変異を特徴とする。いくつかの実施形態において、疾患または障害は、神経筋疾患、遺伝病、癌、遺伝性疾患、あるいは心血管疾患を含む。いくつかの実施形態において、疾患または障害は筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態において、疾患または障害はデュシェンヌ型筋ジストロフィーで

ある。いくつかの実施形態において、エクソンスキッピングは、DMD遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または、55のものである。いくつかの実施形態において、エクソンスキッピングはDMD遺伝子のエクソン23のものである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(I)であり、

A - X - B

式I

式中、

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；および、

Xは単結合または第1のリンカーである。

10

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(II)であり、

A - X - B - Y - C

式II

式中、

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；

Cは高分子であり；

Xは単結合または第1のリンカーであり；および、

Yは単結合または第2のリンカーである。

20

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(III)であり：

A - X - C - Y - B

式III

式中、

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；

Cは高分子であり；

Xは単結合または第1のリンカーであり；および、

Yは単結合または第2のリンカーである。

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、モルホリノ、

2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル

30

(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、ロックド核酸(LNA)、エチレン核酸(ENA)、ペプチド核酸(PNA)を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、モルホリノを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの逆塩基部分は少なくとも1つの末端である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合あるいはホスホロジチオエート結合を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約10から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つである：約15から約30、約18から約25、約18から約24、約19から約23、約20から約22ヌクレオチド長さの少なくとも1つである。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つを含む：約5%から約100%の修飾、約10%から約100%の修飾、約20%から約100%の修飾、約30%から約100%の修飾、約40%から約100%の修飾、約50%から約100%の修飾、約60%から約100%の修飾、約70%から約100%の修飾、約80%から約100%の修飾、および、約90%

40

いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約100%の修飾、約10%から約100%の修飾、約20%から約100%の修飾、約30%から約100%の修飾、約40%

50

%から約100%の修飾、約50%から約100%の修飾、約60%から約100%の修飾、約70%から約100%の修飾、約80%から約100%の修飾、および、約90%

から約 100 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1つを含む：約 10 % から約 90 % の修飾、約 20 % から約 90 % の修飾、約 30 % から約 90 % の修飾、約 40 % から約 90 % の修飾、約 50 % から約 90 % の修飾、約 60 % から約 90 % の修飾、約 70 % から約 90 % の修飾、および、約 80 % から約 100 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1つを含む：約 10 % から約 80 % の修飾、約 20 % から約 80 % の修飾、約 30 % から約 80 % の修飾、約 40 % から約 80 % の修飾、約 50 % から約 80 % の修飾、約 60 % から約 80 % の修飾、および、約 70 % から約 80 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1つを含む：約 10 % から約 70 % の修飾、約 20 % から約 70 % の修飾、約 30 % から約 70 % の修飾、約 40 % から約 70 % の修飾、約 50 % から約 70 % の修飾、および、約 60 % から約 70 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1つを含む：約 10 % から約 60 % の修飾、約 20 % から約 60 % の修飾、約 30 % から約 60 % の修飾、約 40 % から約 60 % の修飾、および約 50 % から約 60 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1つを含む：約 10 % から約 50 % の修飾、約 20 % から約 50 % の修飾、約 30 % から約 50 % の修飾、および約 40 % から約 50 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1つを含む：約 10 % から約 40 % の修飾、約 20 % から約 40 % の修飾、および約 30 % から約 40 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1つを含む：約 10 % から約 30 % の修飾、および約 20 % から約 30 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 10 % から約 20 % の修飾を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 15 % から約 90 % 、約 20 % から約 80 % 、約 30 % から約 70 % 、あるいは約 40 % から約 60 % の修飾を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は少なくとも約 15 % 、20 % 、30 % 、40 % 、50 % 、60 % 、70 % 、80 % 、90 % 、95 % 、または 99 % の修飾を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は少なくとも約 3 、約 4 、約 5 、約 6 、約 7 、約 8 、約 9 、約 10 、約 11 、約 12 、約 13 、約 14 、約 15 、約 16 、約 17 、約 18 、約 19 、約 20 、約 21 、約 22 、またはそれ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約 1 、約 2 、約 3 、約 4 、約 5 、約 6 、約 7 、約 8 、約 9 、約 10 、約 11 、約 12 、約 13 、約 14 、約 15 、約 16 、約 17 、約 18 、約 19 、約 20 、約 21 、約 22 、またはそれ以上の修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は一本鎖を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は二本以上の鎖を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、二本鎖ポリ核酸分子を形成するために、第 1 のポリヌクレオチドと、第 1 のポリヌクレオチドにハイブリダイズされた第 2 のポリヌクレオチドとを含む。いくつかの実施形態では、第 2 のポリヌクレオチドは少なくとも 1 つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、第 1 のポリヌクレオチドおよび第 2 のポリヌクレオチドは RNA 分子である。いくつかの実施形態では、第 1 のポリヌクレオチドおよび第 2 のポリヌクレオチドは siRNA 分子である。いくつかの実施形態において、X と Y は独立して、単結合、分解性リンカー、非分解性リンカー、切断リンカー、あるいは非ポリマーリンカー基である。いくつかの実施形態において、X は単結合である。いくつかの実施形態において、X は C₁ - C₆ アルキル基である。いくつかの実施形態において、Y は C₁ - C₆ アルキル基である。いくつかの実施形態において、X は、随意に C₁ - C₆ アルキル基に結合された、ホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態において、Y はホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態では、結合部分は、抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価 F(ab')₁ 、二価 F(ab')₂ 、一本鎖可変フラグメント (scFv) 、ダイアボディ、ミニボディ (minibody) 、ナノボディ、單一ドメイン抗体 (sdAb) 、またはラクダ抗体、あるいはその結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、C はポリエチレ

10

20

30

40

50

ングリコールである。いくつかの実施形態では、Cは約5,000Daの分子量を有する。いくつかの実施形態において、A-XはBの5'末端へ共役され、Y-CはBの3'末端へ共役される。いくつかの実施形態において、Y-CはBの5'末端へ共役され、A-XはBの3'末端へ共役される。いくつかの実施形態において、A-X、Y-C、またはその組み合わせは、ヌクレオチド間結合群に共役される。いくつかの実施形態では、上記方法はDをさらに含む。いくつかの実施形態において、DはCあるいはAに共役される。いくつかの実施形態において、Dは、式(IV)に係る式(I)の分子抱合体に結合され、



10

式中、

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；

Cは高分子であり；

Xは単結合または第1のリンカーであり；

Yは単結合または第2のリンカーであり；

Lは単結合または第3のリンカーであり；

Dはエンドソーム溶解部分であり；および、

cは0と1の間の整数であり；

ここで、ポリヌクレオチドは、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチド、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも1つの逆脱塩基部分を含み、および、Dは、A、B、またはCのいかなる場所に共役している。

20

いくつかの実施形態では、DはINF7またはメリチンである。いくつかの実施形態では、LはC₁-C₆アルキル基である。いくつかの実施形態では、Lはホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態において、上記方法はさらに少なくとも第2の結合部分Aを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも第2の結合部分Aは、A、B、またはCに共役される。いくつかの実施形態において、方法はインビボの方法である。いくつかの実施形態において、方法はインビトロの方法である。いくつかの実施形態では、被験体はヒトである。

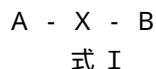
30

【0006】
特定の実施形態において、本明細書に開示される方法のいずれか1つによって得られた分子と薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物が開示される。いくつかの実施形態において、医薬組成物はナノ粒子製剤として製剤される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、非経口投与、経口投与、鼻腔内投与、バッカル投与、直腸投与、または経皮投与のために製剤される。

30

【0007】

ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体を含む組成物が本明細書で開示され、ここで、ポリ核酸分子抱合体は、SEQ ID NO:45-963に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドを含んでいる。ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体を含む組成物が本明細書で開示され、ここで、ポリ核酸分子抱合体は、SEQ ID NO:45-963に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドを含んでいる。特定の実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(I)であり：



40

式中、

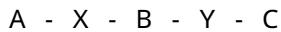
Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；および、

50

Xは単結合または第1のリンカーである。

特定の実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(II)であり：



式II

式中、

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；

Cは高分子であり；

Xは単結合または第1のリンカーであり；および、

Yは単結合または第2のリンカーである。

10

特定の実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(III)であり：



式III

式中、

Aは結合部分であり；

Bはポリヌクレオチドであり；

Cは高分子であり；

Xは単結合または第1のリンカーであり；および、

Yは単結合または第2のリンカーである。

20

【0008】

ある実施形態において、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、モルホリノ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-O-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾ヌクレオチドを含む。ある実施形態において、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドはモルホリノを含む。

【0009】

ある実施形態において、DMRD遺伝子のmRNA前駆体転写産物の標的領域にハイブリダイズする少なくとも1つのポリ核酸分子と結合する標的細胞結合部分を含む、ポリ核酸抱合体が本明細書に開示され、ここで、少なくとも1つのポリ核酸分子は、機能性ジストロフィンタンパク質をコードするmRNA転写産物を生成するためにmRNA前駆体転写産物からエクソンのスプライシングアウトを誘発する。いくつかの実施形態において、機能性ジストロフィンタンパク質は、ジストロフィンタンパク質からの切断された形態である。いくつかの実施形態において、標的領域はエクソン-イントロン接合部にあり、ここで、エクソンは、スプライシングアウトされることになっているエクソンである。いくつかの実施形態において、エクソンは、エクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または55である。いくつかの実施形態において、エクソン-イントロン接合部は、スプライシングアウトされることになっているエクソンの5'に位置する。いくつかの実施形態において、標的領域はエクソン-イントロン接合部の上流のイントロン領域である。いくつかの実施形態において、標的領域は、エクソン-イントロン接合部の約500、450、400、350、300、250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、あるいは10ヌクレオチド上流である。いくつかの実施形態において、エクソン-イントロン接合部は、スプライシングアウトされることになっているエクソンの3'に位置する。いくつかの実施形態において、標的領域はエクソン-イントロン接合部の下流のイントロン領域である。いくつかの実施形態において、標的領域は、エクソン-イントロン接合部の約500、450、400、350、300、250、200、150、100、90、80、70、60、50、40、30、20、あるいは10ヌクレオチド下流である。いくつかの実施形態において、標

30

40

50

的細胞結合部分は、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、あるいは8以上のポリ核酸分子に結合する。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、約10から約50ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 964 - 1285から選択された配列に対して、約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、あるいは99%の配列同一性を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 964 - 1285から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はさらに、1、2、3、あるいは4つのミスマッチを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1056 - 1094、1147 - 1162、または、1173 - 1211から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1056 - 1076から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1077 - 1094から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO : 1173 - 1211から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む。いくつかの実施形態では、結合部分は抗体を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、抗トランスフェリン抗体を含む。いくつかの実施形態において、結合部分は血漿タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸抱合体は、A - (X¹ - B)_n; 式()を含み、式中、Aは結合部分を含み；Bはポリ核酸分子からなり；X¹は単結合あるいは第1の非高分子リンカーからなり；および、nは1 - 12から選択された平均値である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、パッセンジャー鎖とガイド鎖とを含む。いくつかの実施形態において、ガイド鎖は、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合、少なくとも1つの逆脱塩基部分、少なくとも1つの5' - ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチド、あるいは、これらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、ガイド鎖は、約2、3、4、5、6、7、8、あるいは9つのホスホチオエート修飾された非天然のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ガイド鎖は、1つのホスホチオエート修飾された非天然のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ホスホチオエート修飾された非天然のヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのヌクレオチド間結合に位置する。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの5' - ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、ガイド鎖の5'末端から、約1、2、3、4、あるいは5つの塩基離れて位置する。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの5' - ビニルホスホネート修飾された非天然のヌクレオチドは、2' - 位置でさらに修飾される。いくつかの実施形態において、2' - 修飾は、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル(2' - O - M O E)、2' - デオキシ、T - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル(2' - O - A P)、2' - O - ジメチルアミノエチル(2' - O - D M A O E)、2' - O - ジメチルアミノプロピル(2' - O - D M A P)、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル(2' - O - D M A E O E)、または、2' - O - N - メチルアセトアミド(2' - O - N M A)修飾されたヌクレオチドから選択される。いくつかの実施形態において、パッセンジャー鎖は、少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のホスホジアミデートモルホリノオリゴマー修飾された非天然のヌクレオチドを含む。いく
10
20
30
40
50

つかの実施形態において、パッセンジャー鎖は、100%ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー修飾された非天然のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、パッセンジャー鎖はガイド鎖よりも長さが短く、それによって、5'オーバーハング、3'オーバーハング、あるいはこれらの組み合わせを生成する。いくつかの実施形態において、パッセンジャー鎖はガイド鎖と長さが等しく、それによって、ポリ核酸分子の各末端で平滑末端を生成する。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー / RNA ヘテロ二本鎖である。いくつかの実施形態において、パッセンジャー鎖は、少なくとも 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のペプチド核酸修飾された非天然のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、パッセンジャー鎖は、100%ペプチド核酸修飾された非天然のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、パッセンジャー鎖はガイド鎖よりも長さが短く、それによって、5'オーバーハング、3'オーバーハング、あるいはこれらの組み合わせを生成する。いくつかの実施形態において、パッセンジャー鎖はガイド鎖と長さが等しく、それによって、ポリ核酸分子の各末端で平滑末端を生成する。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はペプチド核酸 / RNA ヘテロ二本鎖である。いくつかの実施形態において、パッセンジャー鎖は A - X¹ に共役する。いくつかの実施形態において、A - X¹ はパッセンジャー鎖の 5' 末端に共役する。いくつかの実施形態において、A - X¹ はパッセンジャー鎖の 3' 末端に共役する。いくつかの実施形態において、X¹ は単結合である。いくつかの実施形態において、X¹ は C₁ - C₆ アルキル基である。いくつかの実施形態において、X¹ は、C₁ - C₆ アルキル基に随意に結合された、ホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸抱合体はさらに C を含む。いくつかの実施形態では、C はポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態において、C は X² を介して B に直接共役する。いくつかの実施形態において、X² は単結合あるいは第 2 の非高分子リンカーからなる。いくつかの実施形態において、X² は単結合である。いくつかの実施形態において、X² は C₁ - C₆ アルキル基である。いくつかの実施形態において、X² は、C₁ - C₆ アルキル基に随意に結合された、ホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態において、パッセンジャー鎖は A - X¹ と X² - C に共役する。いくつかの実施形態において、A - X¹ はパッセンジャー鎖の 5' 末端に結合され、X² - C はパッセンジャー鎖の 3' 末端へ共役する。いくつかの実施形態において、X² - C はパッセンジャー鎖の 5' 末端に結合され、A - X¹ はパッセンジャー鎖の 3' 末端へ共役する。いくつかの実施形態において、ポリ核酸抱合体は A - X¹ - (B - X² - C)_n ; 式 (V I) を含み ; 式中、A は結合部分を含み ; B はポリ核酸分子からなり ; C はポリマーからなり ; X¹ は単結合あるいは第 1 の非高分子リンカーからなり ; X² は単結合あるいは第 2 の非高分子リンカーからなり ; および、n は 1 - 12 から選択された平均値である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸抱合体はさらに D を含む。いくつかの実施形態において、D はエンドソーム溶解部分である。

【0010】

特定の実施形態において、SEQ ID NO : 1056 - 1058 あるいは 1087 - 1089 から選択された塩基配列の少なくとも 23 の隣接する塩基を含むポリ核酸分子が本明細書に開示され、ここで、ポリ核酸分子は 50 以下のヌクレオチド長さを含む。

【0011】

特定の実施形態において、SEQ ID NO : 1056 - 1058 を含むポリ核酸分子が本明細書に開示され、ここで、ポリ核酸分子は 50 以下のヌクレオチド長さを含む。

【0012】

特定の実施形態において、SEQ ID NO : 1087 - 1089 を含むポリ核酸分子が本明細書に開示され、ここで、ポリ核酸分子は 50 以下のヌクレオチド長さを含む。

【0013】

ある実施形態において、医薬組成物が本明細書に開示され、上記医薬組成物は、本明細書に記載されるポリ核酸抱合体、あるいは本明細書に記載されるポリ核酸分子；および、

10

20

30

40

50

薬学的に許容可能な賦形剤を含む。いくつかの実施形態において、医薬組成物は全身送達のために製剤化される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は非経口投与のために製剤化される。

【0014】

ある実施形態において、被験体の欠損mRNAを特徴とする疾患または疾病を処置する方法が本明細書に開示され、上記方法は、機能性タンパク質をコードするプロセシングされたmRNAを生成するために欠損mRNAを引き起こすエクソンのスキッピングを誘導するべく、本明細書に記載されるポリ核酸抱合体あるいは本明細書に記載されるポリ核酸分子を被験体に投与する工程であって、それによって、被験体の疾患または疾病を処置する、工程を含む。いくつかの実施形態において、疾患または疾病は、神経筋疾患、遺伝病、癌、遺伝性疾患、あるいは心血管疾患である。いくつかの実施形態において、神経筋疾患は筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態において、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、あるいは筋緊張性ジストロフィーである。いくつかの実施形態では、被験体はヒトである。

10

【0015】

本明細書には、特定の実施形態において、被験体の筋ジストロフィーを処置する方法が開示され、上記方法は、本明細書に記載されるポリ核酸抱合体あるいは本明細書に記載されるポリ核酸分子を被験体に投与する工程であって、それによって、被験体の筋ジストロフィーを処置する、工程を含む。いくつかの実施形態において、筋ジストロフィーはデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態では、被験体はヒトである。

20

【0016】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸抱合体、あるいは本明細書に記載されるポリ核酸分子を含むキットが本明細書で開示される。

【0017】

ある実施形態において、本明細書に開示される方法のいずれか1つによって得られた分子を含むキットが本明細書で開示される。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】末端ヌクレオチドを拡張したホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(PMO)配列を描く。

30

【図2A】末端ヌクレオチドを拡張したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド(PS A SO)配列を描く。

【図2B】十分に拡張されたホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド(PS A SO)配列を描く。

【図3】Taqman qPCRを使用して、全RNAにおけるスキッピングされたDM D mRNAを定量化するために使用される方法を描く。

【図4】疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)方法2で生成された抗CD71 mAb - PMO反応混合物のクロマトグラムを描く。

【図5A】サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)方法1を使用して生成された抗CD71 mAbのクロマトグラムを描く。

40

【図5B】サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)方法1を使用して生成された抗CD71 mAb - PMO DAR1 , 2のクロマトグラムを描く。

【図5C】サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)方法1を使用して生成された抗CD71 mAb - PMO DAR > 2のクロマトグラムを描く。

【図6A】疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)方法2を使用して生成された抗CD71 mAbのクロマトグラムを描く。

【図6B】疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)方法2を使用して生成された精製された抗CD71 mAb - PMO DAR1 , 2抱合体のクロマトグラムを描く。

【図6C】疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)方法2を使用して生成された精

50

製された抗 C D 7 1 m A b - P M O D A R > 2 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 7 A】疎水性相互作用クロマトグラフィー(H I C)方法 3 を使用して、抗 C D 7 1 F a b - P M O の高速タンパク質液体クロマトグラフィー(F P L C)精製のクロマトグラムを描く。

【図 7 B】S E C 方法 1 を使用して生成された抗 C D 7 1 F a b のクロマトグラムを描く。

【図 7 C】S E C 方法 1 を使用して生成された抗 C D 7 1 F a b - P M O D A R 1 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 7 D】S E C 方法 1 を使用して生成された抗 C D 7 1 F a b - P M O D A R 2 抱合体のクロマトグラムを描く。 10

【図 7 E】S E C 方法 1 を使用して生成された抗 C D 7 1 F a b - P M O D A R 3 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 7 F】H I C 方法 4 を使用して生成された抗 C D 7 1 F a b のクロマトグラムを描く。

【図 7 G】H I C 方法 4 を使用して生成された抗 C D 7 1 F a b - P M O D A R 1 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 7 H】H I C 方法 4 を使用して生成された抗 C D 7 1 F a b - P M O D A R 2 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 7 I】H I C 方法 4 を使用して生成された抗 C D 7 1 F a b - P M O D A R 3 抱合体のクロマトグラムを描く。 20

【図 8 A】S A X 方法 2 を使用して生成された抗 C D 7 1 m A b - P S A S O 反応混合物のクロマトグラムを描く。

【図 8 B】S E C 方法 1 を使用して生成された抗 C D 7 1 m A b のクロマトグラムを描く。

【図 8 C】S E C 方法 1 を使用して生成された抗 C D 7 1 m A b - P S A S O D A R 1 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 8 D】S E C 方法 1 を使用して生成された抗 C D 7 1 m A b - P S A S O D A R 2 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 8 E】S E C 方法 1 を使用して生成された抗 C D 7 1 m A b - P S A S O D A R 3 抱合体のクロマトグラムを描く。 30

【図 8 F】S A X 方法 2 を使用して生成された抗 C D 7 1 m A b - P S A S O D A R 1 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 8 G】S A X 方法 2 を使用して生成された抗 C D 7 1 m A b - P S A S O D A R 2 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 8 H】S A X 方法 2 を使用して生成された抗 C D 7 1 m A b - P S A S O D A R 3 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 9】P M O および抗 C D 7 1 m A b - P M O 抱合体を使用して、分化した C 2 C 1 2 細胞におけるエクソン 2 3 スキッピングを検出するネステッド P C R からのアガロースゲルを描く。

【図 10】P M O 、抗 C D 7 1 m A b - P M O 、および抗 C D 7 1 m A b - P M O 抱合体を使用して、分化した C 2 C 1 2 細胞におけるエクソン 2 3 スキッピングを検出するネステッド P C R からのアガロースゲルを描く。 40

【図 11】P M O 、A S O 、D A R 1 (「 A S C - D A R 1 」) の共役した抗 C D 7 1 m A b - A S O 、D A R 2 (「 A S C - D A R 2 」) の共役した抗 C D 7 1 m A b - A S O 、および、D A R 3 (「 A S C - D A R 3 」) の共役した抗 C D 7 1 m A b - A S O を使用して、分化した C 2 C 1 2 細胞におけるエクソン 2 3 スキッピングを検出するネステッド P C R からのアガロースゲルを描く。

【図 12 A】抗 C D 7 1 m A b - P M O 抱合体の単回静脈内注射を投与された野生型のマウスの腓腹筋においてエクソン 2 3 スキッピングを検出するネステッド P C R からのアガロースゲルを描く。 50

【図12B】腓腹筋からのPCR産物の定量化のグラフである。

【図12C】野生型のマウスからの腓腹筋のTaqman qPCRを使用する、インビオのエクソンスキッピングの定量化のグラフである。

【図13A】単回静脈内注射後に野生型のマウスの心臓筋においてエクソン23スキッピングを検出するネステッドPCRからのアガロースゲルを描く。

【図13B】心臓筋からのPCR産物の定量化のグラフである。

【図14】スキッピングと野生型のPCR産物からのDNA断片の配列決定データを描く。

【図15】トランスフェクトされた初代ヒト骨格筋細胞におけるヒトDMD mRNA前駆体中のエクソン45を標的とする様々な長さのエクソンスキッピングPMOのエクソンスキッピング活性を例証する。 10

【図16】インビトロでヒトトランスフェリン受容体に対するhTfR1.mAb-PMO抱合体の結合を例証する。

【図17】初代ヒト骨格筋細胞中のhTfR1.mAb-PMO抱合体のエクソンスキッピング活性を例証する。

【図18】初代の不死化されたヒト骨格筋細胞の筋管におけるhTfR1.mAb-PMO抱合体のエクソンスキッピング活性を例証する。

【発明を実施するための形態】

【0019】

核酸（例えば、RNAi）治療は高い選択率と特異性を誇る標的療法である。しかしながら、いくつかの例では、核酸治療も、脆弱な細胞内取り込み、標的細胞の不十分な細胞内濃度、および低い有効性によって妨げられる。こうした諸問題に対応するために、核酸組成物の様々な修飾、例えば、より優れた安定化および／またはより低い毒性のための新規なリンカー、増加した標的特異性および／または標的送達用の結合部分の最適化、ならびに、安定性の増加および／または的外れの効果の減少のための核酸ポリマー修飾などが探求されている。 20

【0020】

いくつかの例では、オリゴヌクレオチドが使用されるそのような1つの領域は、筋ジストロフィーを処置するためのものである。筋ジストロフィーは、筋肉に影響を与える複数の疾患を包含する。デュシェンヌ型筋ジストロフィーは筋ジストロフィーの重症の形態であり、DMD遺伝子中の突然変異によって引き起こされる。いくつかの例では、DMD遺伝子中の突然変異は、翻訳のリーディングフレームを破壊し、非機能的なジストロフィンタンパク質をもたらす。 30

【0021】

ある実施形態において、翻訳のリーディングフレームを回復させるために使用される、エクソンスキッピングあるいはエクソンインクルージョンを誘発するために、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物の挿入、欠失、複製、あるいは変化を誘発するための核酸療法に関連する方法と組成物が本明細書で開示される。いくつかの実施形態において、誤ってプロセシングされたmRNA転写産物を特徴とする疾患または障害を処置するための方法と組成物も本明細書で記載され、エクソンの除去の後、mRNAは機能性タンパク質をコードすることができ、それによって疾患または障害を処置する。さらなる実施形態において、上記の疾患または障害を処置するための医薬組成物とキットが本明細書に記載される。 40

【0022】

RNAプロセシング

RNAは遺伝子発現と細胞生理の調節において中心的な役割を有する。RNAの適切なプロセシングは機能性タンパク質の翻訳のために重要である。RNAの誤ったスプライシングの結果などのRNAプロセシングの変化は疾患をもたらす可能性がある。例えば、スプライス部位の突然変異は、早熟な終止コドンの曝露、エクソンの喪失、あるいはインtronのインクルージョンを引き起こす。いくつかの例では、RNAプロセシングの変化は 50

、挿入、欠失、あるいは複製をもたらす。いくつかの例では、RNAプロセシングの変化は、エクソンの挿入、欠失、あるいは複製をもたらす。RNAプロセシングの変化は、場合によっては、イントロンの挿入、欠失、あるいは複製をもたらす。

【0023】

エクソンスキッピング

エクソンスキッピングはRNAスプライシングの形態である。場合によっては、エクソンがプロセシングされたmRNAでスキッピングされるか、プロセシングされたmRNAからスプライシングされるとときに、エクソンスキッピングが生じる。エクソンスキッピングの結果、プロセシングされたmRNAはスキッピングされたエクソンを含まない。いくつかの例では、エクソンスキッピングは変化された生成物の発現をもたらす。

10

【0024】

いくつかの例では、アンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)はエクソンスキッピングを誘発するために使用される。いくつかの例では、AONは、特定のmRNAあるいはmRNA前駆体配列と結合する短い核酸配列である。例えば、AONはスプライス部位あるいはエクソンエンハンサーに結合する。いくつかの例では、特定のmRNAあるいはmRNA前駆体配列にAONを結合することにより、二本鎖領域が生成される。いくつかの例では、二本鎖領域の形成は、スプライソームまたはスプライソームに関連するタンパク質が通常結合することになる場所で生じ、エクソンをスキッピングさせる。いくつかの例では、エクソンのスキッピングは転写産物リーディングフレームの回復を引き起こし、部分的に機能的なタンパク質の産生を可能にする。

20

【0025】

エクソンインクルージョン

いくつかの例では、RNA中の突然変異はエクソンスキッピングを引き起こす。場合によっては、突然変異は、スプライス部位、スプライス部位の近く、およびスプライス部位から距離をおいた場所の少なくとも1つである。いくつかの例では、突然変異は、スプライス部位の不活性化または脆弱化、エクソンスプライスエンハンサーあるいはイントロンスプライスエンハンサーの破壊、およびエクソンスプライスサイレンサーまたはイントロンスプライスエンハンサーの作成の少なくとも1つをもたらす。いくつかの例において、突然変異はRNA二次構造を変質する。場合によっては、突然変異はRNA二次構造を変質し、エクソン認識にとって重要なシグナルのアクセシビリティーの破壊を引き起こす。

30

【0026】

いくつかの例では、AONの使用はスキッピングされたエクソンのインクルージョンを引き起こす。いくつかの例では、AONは、スプライス部位、スプライス部位の近くの部位、スプライス部位から離れた部位の少なくとも1つに結合する。場合によっては、AONは、エクソンスプライスエンハンサーあるいはイントロンスプライスエンハンサーの破壊を防ぐために、RNAのある部位で結合する。場合によっては、AONは、エクソンスプライスサイレンサーあるいはイントロンスプライスサイレンサーの生成を防ぐために、RNAのある部位で結合する。

【0027】

指標

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子あるいは医薬組成物は、欠損したmRNAを特徴とする疾患または障害の処置に使用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子あるいは医薬組成物は、エクソンスキッピングまたはエクソンインクルージョンを誘発するために、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物の挿入、欠失、複製、あるいは変化を誘導することによって疾患または障害の処置に使用される。

40

【0028】

ヒトのタンパク質コード遺伝子の大部分が代替的にスプライシングされる。いくつかの例では、突然変異は不適切にスプライシングされたか、部分的にスプライシングされたmRNAを引き起こす。例えば、突然変異は、タンパク質コード遺伝子、サイレンサーまた

50

はエンハンサー配列、エクソン配列、あるいはイントロン配列中のスプライス部位の少なくとも1つにある。いくつかの例では、突然変異は遺伝子機能障害を引き起こす。いくつかの例では、突然変異は疾患または障害を引き起こす。

【0029】

いくつかの例では、不適切にスプライシングされたか、部分的にスプライシングされたmRNAに起因する疾患または障害としては、限定されないが、神経筋疾患、遺伝病、癌、遺伝性疾患、あるいは心血管疾患が挙げられる。

【0030】

いくつかの例では、遺伝病または遺伝障害は、常染色体優性障害、常染色体劣性障害、X連鎖優性障害、X連鎖劣性障害、Y連鎖障害、ミトコンドリア遺伝病、あるいは多因子または多遺伝子障害を含む。10

【0031】

いくつかの例では、高コレステロール血症などの心血管疾患は、不適切にスプライシングされたか、あるいは、部分的にスプライシングされたmRNAに起因する。高コレステロール血症において、低密度リポタンパク質受容体(LDLR)のエクソン12中の一塩基多型がエクソنسキッピングを促進することが示してきた。

【0032】

いくつかの例では、不適切にスプライシングされたか、部分的にスプライシングされたmRNAは、癌を引き起こす。例えば、不適切にスプライシングされたか、部分的にスプライシングされたmRNAは、限定されないが、増殖、運動、および薬物応答を含む、癌に関する細胞のプロセスに影響を与える。いくつかの例では、固形癌あるいは血液の癌がある。いくつかの例では、癌は、膀胱癌、肺癌、脳癌、黒色腫、乳癌、非ホジキンリンパ腫、子宮頸癌、卵巣癌、大腸癌、肺臓癌、食道癌、前立腺癌、腎臓癌、皮膚癌、白血病、甲状腺癌、肝臓癌、または子宮癌である。20

【0033】

いくつかの例では、不適切にスプライシングされたか、部分的にスプライシングされたmRNAは神経筋疾患または障害を引き起こす。例示的な神経筋疾患としては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、あるいは筋緊張性ジストロフィーなどの筋ジストロフィーが挙げられる、いくつかの例では、筋ジストロフィーは遺伝的である。いくつかの例では、筋ジストロフィーは自然突然変異によって引き起こされる。ベッカー型筋ジストロフィーとデュシェンヌ型筋ジストロフィーは、タンパク質ジストロフィンをコードするDMD遺伝子中の突然変異に関与していることが示してきた。顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーは二重ホメオボックス4(DUX4)遺伝子中の突然変異に関与していることが示されている。30

【0034】

いくつかの例では、不適切にスプライシングされたか、部分的にスプライシングされたmRNAは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを引き起こす。デュシェンヌ型筋ジストロフィーは重度の筋衰弱を引き起こし、機能的なジストロフィンの産生を消失させるDMD遺伝子中の突然変異によって引き起こされる。いくつかの例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、DMD遺伝子中のエクソンの突然変異の結果である。いくつかの例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、DMD遺伝子中のエクソン1、2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、および79の少なくとも1つの突然変異の結果である。いくつかの例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、DMD遺伝子中のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、および79の少なくとも1つの突然変異の結果である。40

8、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、および63の少なくとも1つの突然変異の結果である。いくつかの例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、DMD遺伝子中のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、および55の少なくとも1つの突然変異の結果である。いくつかの例では、多くのエクソンが突然変異する。例えば、エクソン48-50の突然変異はデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者において一般的である。いくつかの例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーはエクソン51の突然変異の結果である。いくつかの例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーはエクソン23の突然変異の結果である。いくつかの例では、突然変異は、1以上の複数のエクソンの欠失を含む。いくつかの例では、突然変異は、1以上の複数の複製を含む。いくつかの例では、突然変異はエクソンを点突然変異に関与している。例えば、患者の中にはDMD遺伝子のエクソン51のナンセンス点突然変異を抱えているものもいることが示されている。

10

【0035】

いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子あるいは医薬組成物は、筋ジストロフィーの処置に使用される。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子あるいは医薬組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィーあるいは筋緊張性ジストロフィーの処置に使用される。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子あるいは医薬組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの処置に使用される。

20

【0036】

ポリ核酸分子

いくつかの実施形態において、エクソنسキッピングまたはエクソンインクルージョンを誘発するために、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物の挿入、欠失、複製、あるいは変化を誘発するポリ核酸分子が本明細書に記載される。いくつかの例では、ポリ核酸分子は翻訳のリーディングフレームを回復させる。いくつかの例では、ポリ核酸分子は機能的かつ切断されたタンパク質をもたらす。

20

【0037】

いくつかの例では、ポリ核酸分子はmRNA配列を標的とする。いくつかの例では、ポリ核酸分子はスプライス部位を標的とする。いくつかの例では、ポリ核酸分子はシス調節因子を標的とする。いくつかの例では、ポリ核酸分子はトランス調節因子を標的とする。いくつかの例では、ポリ核酸分子はエクソنسプライスエンハンサーあるいはイントロンスプライスエンハンサーを標的とする。いくつかの例では、ポリ核酸分子はエクソنسプライスサイレンサーあるいはイントロンスプライスサイレンサーを標的とする。

30

【0038】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、イントロンまたはエクソンで見られる配列を標的とする。例えば、ポリ核酸分子は、前記エクソンのスプライシングを媒介するエクソン中で見られる配列を標的とする。いくつかの例では、ポリ核酸分子はエクソン認識配列を標的とする。いくつかの例では、ポリ核酸分子はエクソンの上流の配列を標的とする。いくつかの例では、ポリ核酸分子はエクソンの下流の配列を標的とする。

40

【0039】

上に記載されたように、ポリ核酸分子は、限定されないが、神経筋疾患、遺伝病、癌、遺伝性疾患、あるいは心血管疾患などの疾患または障害をもたらす誤ってプロセシングされたmRNA転写産物を標的とする。場合によっては、ポリ核酸分子は、神経筋疾患または障害を引き起こす誤ってプロセシングされたmRNA転写産物を標的とする。場合によっては、神経筋疾患または障害は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、あるいは筋緊張性ジストロフィーである。場合によっては、ポリ核酸分子は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッcker型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、あるいは筋緊張性ジストロフィーを引き起こす誤ってプロセシングされた

50

mRNA 転写産物を標的とする。場合によっては、ポリ核酸分子は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを引き起こす誤ってプロセシングされたmRNA 転写産物を標的とする。

【0040】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを引き起こすDMD 遺伝子中で突然変異するエクソンを標的とする。デュシェンヌ型筋ジストロフィーを引き起こすDMD 遺伝子中で突然変異する例示的なエクソンとしては、限定されないが、エクソン、2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、および78が挙げられる。いくつかの例では、ポリ核酸分子は突然変異したエクソンに隣接する配列を標的とする。例えば、エクソン50の欠失がある場合、エクソン51がスキッピングされるように、ポリ核酸分子はエクソン51中の配列を標的とする。別の例では、エクソン23に突然変異がある場合、エクソン23がスキッピングされるように、ポリ核酸分子はエクソン22中の配列を標的とする。

【0041】

いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、および78のエクソン-イントロン接合部にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、または63のエクソン-イントロン接合部にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または55のエクソン-イントロン接合部にある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン8のエクソン-イントロン接合部にある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン23のエクソン-イントロン接合部にある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン35のエクソン-イントロン接合部にある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン43のエクソン-イントロン接合部にある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン44のエクソン-イントロン接合部にある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン45のエクソン-イントロン接合部にある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン49のエクソン-イントロン接合部にある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン50のエクソン-イントロン接合部にある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン51のエクソン-イントロン接合部にある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン52のエクソン-イントロン接合部にある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子

10

20

30

40

50

のエクソン 5 3 のエクソン - イントロン接合部にある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 5 のエクソン - イントロン接合部にある領域を標的とする。

【0042】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、および 78 の少なくとも 1 つの 5' イントロン - エクソン接合部あるいは 3' エクソン - イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。¹⁰ いくつかの例では、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、および、63 の少なくとも 1 つの 5' イントロン - エクソン接合部あるいは 3' エクソン - イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または 55 の 5' イントロン - エクソン接合部あるいは 3' エクソン - イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。²⁰

【0043】

場合によっては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、および 78 の少なくとも 1 つの 5' イントロン - エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする（例えば、エクソン 3 の 5' イントロン - エクソン接合部は、イントロン 2 - エクソン 3 の接合部である）。場合によっては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、または 55 の 5' イントロン - エクソン接合部あるいは 3' エクソン 3 の 5' イントロン - エクソン接合部は、イントロン 2 - エクソン 3 の接合部である）。場合によっては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または 55 の 5' イントロン - エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 8 の 5' イントロン - エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 23 の 5' イントロン - エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。³⁰ 案によっては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 35 の 5' イントロン - エクソン接合部あるいは 3' エクソン 3 の 5' イントロン - エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 43 の 5' イントロン - エクソン接合部あるいは 3' エクソン 35 の 5' イントロン - エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 44 の 5' イントロン - エクソン接合部あるいは 3' エクソン 43 の 5' イントロン - エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 45 の 5' イントロン - エクソン接合部あるいは 3' エクソン 44 の 5' イントロン - エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 50 の 5' イントロン - エクソン接合部あるいは 3' エクソン 45 の 5' イントロン - エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 55 の 5' イントロン - エクソン接合部あるいは 3' エクソン 50 の 5' イントロン - エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。⁴⁰ 案によっては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 51 の 5' イントロン - エクソン接合部あるいは 3' エクソン 55 の 5' イントロン - エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 51 の 5' イントロン - エクソン接合部あるいは 3' エクソン 55 の 5' イントロン - エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。⁵⁰

にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン52の5'イントロン-エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン53の5'イントロン-エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン55の5'イントロン-エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。

【0044】

場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、および78の少なくとも1つの3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする(例えば、エクソン3の3'エクソン-イントロン接合部は、エクソン3-イントロン3の接合部である)。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子の3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、および、63の少なくとも1つの3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする(例えば、エクソン3の3'-イントロン接合部は、エクソン3-イントロン3の接合部である)。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または55の3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8の3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン23の3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン35の3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン43の3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン44の3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン45の3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン50の3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン51の3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン52の3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン53の3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン55の3'エクソン-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。

【0045】

いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、および78のスプライス部位を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、

10

20

30

40

50

25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、または63のスプライス部位を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または55のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン23のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン35のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン43のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン44のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン45のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン48のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン49のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン50のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン51のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン52のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン53のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン55のスプライス部位を標的とする。本明細書で使用されるように、スプライス部位は、エクソンスキッピングまたはエクソンインクリージョンを誘発するために、誤ってスライシングされたmRNA転写産物の挿入、欠失、複製、あるいは変化を誘発することができる、基準スプライス部位、隠れたスプライス部位、あるいは代替的なスプライス部位を含む。

【0046】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、エクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、または、63などのデュシェンヌ型筋ジストロフィーに関する追加のエクソンを含む部分的にスライシングされたmRNA配列を標的とする。

【0047】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン-イントロン接合部に近位の領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子中のエクソン2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、または78の少なくとも1000ヌクレオチド(nt)、500nt、400nt、300nt、200nt、100nt、80nt、60nt、50nt、40nt、30nt、20nt、10nt、または5nt上流(あるいは、5'から)の領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、あるいは63の少なくとも1000ヌク

10

20

30

40

50

53の少なくとも1000 nt、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、あるいは5 nt上流(あるいは5'から)にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン55の少なくとも1000 nt、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、あるいは5 nt上流(あるいは5'から)にある領域を標的とする。

【0048】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、および78の少なくとも1つの上流(あるいは5')にある標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、または55の少なくとも1つの上流(または5')にある標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、および、63の少なくとも1つの上流(または5')である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または55の少なくとも1つの上流(または5')にある標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、および、63の少なくとも1つの約5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは500 bp上流(あるいは5')である標的領域にハイブリダイズする。

【0049】

いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD遺伝子中のエクソン2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、あるいは63の少なくとも1000ヌクレオチド(nt)、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、または5 nt下流(あるいは、3'から)の領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、または55の少なくとも1000ヌクレオチド(nt)、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、あるいは5 nt下流(あるいは3'から)の領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または55の少なくとも1000ヌクレオチド(nt)、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、あるいは5 nt下流(あるいは3'から)の領域を標的とする。

n t、50 n t、40 n t、30 n t、20 n t、10 n t、あるいは5 n t下流（あるいは3'から）の領域を標的とする。

【0050】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、および78の少なくとも1つの下流（あるいは3'）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、および、63の少なくとも1つの下流（または3'）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、および、63の少なくとも1つの約5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは500 bp下流（あるいは5'）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または55の少なくとも1つの約5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは500 bp下流（あるいは3'）の標的領域にハイブリダイズする。

【0051】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、あるいは78内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、または63内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または55内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン23内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン35内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン43内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン44内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン50内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン51内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン52内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン53内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン55内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン45内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン48内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン49内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明

細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン50内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン51内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン52内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン53内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン55内の内部領域を標的とする。

【0052】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、および78の少なくとも1つの標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、および、63の少なくとも1つの内部にある標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または55の少なくとも1つの内部にある標的領域にハイブリダイズする。
10
20

【0053】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン44を含む部分的にスプライシングされたmRNA配列を標的とする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン44に対して上流（あるいは5'）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン44の約5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは500bp上流（あるいは5'）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン44に対して下流（あるいは3'）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン44の約5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは500bp下流（あるいは3'）の標的領域にハイブリダイズする。
30

【0054】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン44内にある標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、5'イントロン-エクソン4接合部あるいは3'エクソン44-イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。

【0055】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン45を含む部分的にスプライシングされたmRNA配列を標的とする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン45に対して上流（あるいは5'）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン45の約5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは500bp上流（あるいは5'）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン45に対して下流（あるいは3'）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン45の約5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは500bp下流（あるいは3'）の標的領域にハイブリダイズする。
40

【0056】

50

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 4 5 内にある標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、5' イントロン - エクソン 4 5 接合部あるいは 3' エクソン 4 5 - イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 1 を含む部分的にスプライシングされたm R N A 配列を標的とする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン 5 1 に対して上流（あるいは 5' ）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン 5 1 の約 5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは 500 b p 上流（あるいは 5' ）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン 5 1 に対して下流（あるいは 3' ）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン 5 1 の約 5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは 500 b p 下流（あるいは 3' ）の標的領域にハイブリダイズする。

10

【 0 0 5 8 】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 1 内にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、5' イントロン - エクソン 5 1 接合部あるいは 3' エクソン 5 1 - イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。

20

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 3 を含む部分的にスプライシングされたm R N A 配列を標的とする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン 5 3 に対して上流（あるいは 5' ）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン 5 3 の約 5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは 500 b p 上流（あるいは 5' ）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン 5 3 に対して下流（あるいは 3' ）の標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン 5 3 の約 5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは 500 b p 下流（あるいは 3' ）の標的領域にハイブリダイズする。

30

【 0 0 6 0 】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 3 内にある標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、5' イントロン - エクソン 5 3 接合部あるいは 3' エクソン 5 3 - イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、対象の標的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 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、対象の標的配列に対して少なくとも 5 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、対象の標的配列に対して少なくとも 6 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、対象の標的配列に対して少なくとも 7 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、対象の標的配列に対して少なくとも 7 5 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、対象の標的配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、対象の標的配列に対して少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、対象の標的配列に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いく

40

50

つかの実施形態において、ポリ核酸分子は、対象の標的配列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。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、対象の標的配列に対して少なくとも96%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、対象の標的配列に対して少なくとも97%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、対象の標的配列に対して少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、対象の標的配列に対して少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は対象の標的配列からなる。

【0062】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドを含む。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、対象の標的配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、対象の標的配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、対象の標的配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する第1のポリヌクレオチドと、対象の標的配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する第2のポリヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

【0063】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285に対して少なくとも50%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285に対して少なくとも60%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285に対して少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285に対して少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285に対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285に対して少なくとも85%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285に対して少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285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。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285に対して少なくとも96%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285に対して少なくとも97%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285に対して少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285に対して少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:964-1285からなる。

【0064】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO:1056-10

50

I D N O : 1 0 5 6 - 1 0 5 8 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 5 6 - 1 0 5 8 に対して少なくとも 9 6 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 5 6 - 1 0 5 8 に対して少なくとも 9 7 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 5 6 - 1 0 5 8 に対して少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 5 6 - 1 0 5 8 に対して少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 5 6 - 1 0 5 8 からなる。

10

【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 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 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 に対して少なくとも 5 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 に対して少なくとも 6 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 に対して少なくとも 7 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 に対して少なくとも 7 5 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 に対して少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 に対して少なくとも 9 6 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 に対して少なくとも 9 7 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 に対して少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 に対して少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 8 7 - 1 0 8 9 からなる。

20

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 9 6 4 - 1 2 8 5 から選択された塩基配列の少なくとも 1 0、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、またはそれ以上の隣接する塩基を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 5 6 - 1 0 9 4、1 1 4 7 - 1 1 6 2、または、1 1 7 3 - 1 2 1 1 から選択された塩基配列の少なくとも 1 0、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、またはそれ以上の隣接する塩基を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 5 6 - 1 0 7 6 から選択された塩基配列の少なくとも 1 0、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、またはそれ以上の隣接する塩基を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、S E Q I D N O : 1 0 7 7 - 1 0 9 4 から選択された塩基配列の少なくとも 1 0、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、またはそれ以上の隣接する塩基を含む。いくつかの例では、ポリ

30

40

50

核酸分子は、SEQ ID NO: 1147 - 1162 から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1173 - 1211 から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1056 - 1058 から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、SEQ ID NO: 1087 - 1089 から選択された塩基配列の少なくとも10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、またはそれ以上の隣接する塩基を含む。場合によっては、ポリ核酸分子はさらに、1、2、3、あるいは4つのミスマッチを含む。

10

【0072】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はガイド鎖とパッセンジャー鎖を含む。いくつかの例では、ガイド鎖は、SEQ ID NO: 964 - 1285 に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。場合によっては、ガイド鎖は、SEQ ID NO: 964 - 1285 から選択される配列を含む。

20

【0073】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子はRNAまたはDNAを含む。場合によっては、ポリ核酸分子はRNAを含む。いくつかの例では、RNAは低分子干渉RNA(s i RNA)、低分子ヘアピン型RNA(s h RNA)、マイクロRNA(m i RNA)、二本鎖RNA(d s RNA)、転移RNA(t RNA)、リボソームRNA(r RNA)、またはヘテロ核RNA(h n RNA)を含む。いくつかの例では、RNAはs h RNAを含む。いくつかの例では、RNAはm i RNAを含む。いくつかの例では、RNAはd s RNAを含む。いくつかの例では、RNAはt RNAを含む。いくつかの例では、RNAはr RNAを含む。いくつかの例では、RNAはh n RNAを含む。いくつかの例では、RNAはs i RNAを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子はs i RNAを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子はアンチセンスオリゴヌクレオチド(A S O)である。

30

【0074】

いくつかの実施形態では、核酸ポリマーは、約10から約50ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約30、約15から約30、約18から約30、約18から約25, form 約18から約24、約19から約23、約19から約30、約19から約25、約19から約24、約19から約23、約20から約30、約20から約25、約20から約24、約20から約23、または約20から約22ヌクレオチド長さである。

【0075】

いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、約50ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約45ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約40ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約35ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約20ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約19ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約18ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約17ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約16ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約15ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約14ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約13

40

50

ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約12ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約11ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約50ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約45ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約40ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約35ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約10から約20ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約15から約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約15から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約12から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約19から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約20から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約19から約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約20から約25ヌクレオチド長さである。

【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、少なくとも 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、あるいは 50 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、少なくとも 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、あるいは 30 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は少なくとも 15 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は少なくとも 18 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は少なくとも 19 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は少なくとも 20 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は少なくとも 21 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は少なくとも 22 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は少なくとも 23 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は少なくとも 24 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は少なくとも 25 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は少なくとも 30 ヌクレオチド長さである。

【 0 0 7 7 】

酸分子は、約 12 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 11 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 10 ヌクレオチド長さである。

【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は第1のポリヌクレオチドを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は第2のポリヌクレオチドを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドを含む。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドはセンス鎖またはパッセンジャー鎖である。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドはアンチセンス鎖またはガイド鎖である。

【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は第1のポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、約10から約50ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約10から約30、約15から約30、約18から約30、約18から約25、約18から約24、約19から約23、約19から約30、約19から約25、約19から約24、約19から約23、約20から約30、約20から約25、約20から約24、約20から約23、または約20から約22ヌクレオチド長さである。

【 0 0 8 0 】

[0 0 8 1]

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は第2のポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約50ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約30、約15から約30、約18から約30、約18から約25、約18から約24、約19から約23、約1

9から約30、約19から約25、約19から約24、約19から約23、約20から約30、約20から約25、約20から約24、約20から約23、または約20から約22ヌクレオチド長さである。

【0082】

いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約50ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約45ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約40ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約35ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約20ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約19ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約18ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約17ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約16ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約15ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約14ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約13ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約12ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約11ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約50ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約45ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約40ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約35ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約10から約20ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約15から約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約15から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第2のポリヌクレオチドは、約12から約30ヌクレオチド長さである。

【0083】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子はさらに平滑末端、オーバーハングあるいはその組み合わせを含む。いくつかの例では、平滑末端は、5'平滑末端、3'平滑末端、あるいはその両方である。場合によっては、オーバーハングは5'オーバーハング、3'オーバーハング、またはその両方である。場合によっては、オーバーハングは1、2、3、4、5、6、7、8、9、あるいは10の非塩基対ヌクレオチドを含む。場合によっては、オーバーハングは1、2、3、4、5、あるいは6の非塩基対ヌクレオチドを含む。場合によっては、オーバーハングは1、2、3、あるいは4の非塩基対ヌクレオチドを含む。場合によっては、オーバーハングは1つの非塩基対ヌクレオチドを含む。場合によっては、オーバーハングは2つの非塩基対ヌクレオチドを含む。場合によっては、オーバーハングは3つの非塩基対ヌクレオチドを含む。場合によっては、オーバーハングは4つの非塩基対ヌクレオチドを含む。

【0084】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は、本明細書に記載された標的配列に対して、少なくとも40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、あるいは99.5%相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に少なくとも50%相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書

10

20

30

40

50

に記載された標的配列に少なくとも 60 % 相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に少なくとも 70 % 相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に少なくとも 80 % 相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に少なくとも 90 % 相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に少なくとも 95 % 相補的である。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に少なくとも 99 % 相補的である。いくつかの例では、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に 100 % 相補的である。

【0085】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に対して 5つ以下のミスマッチを有する。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に対して 4つ以下のミスマッチを有する。場合によっては、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に対して 3つ以下のミスマッチを有する。場合によっては、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に対して 2つ以下のミスマッチを有する。場合によっては、ポリ核酸分子の配列は本明細書に記載された標的配列に対して 1つ以下のミスマッチを有する。

【0086】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された標的配列にハイブリダイズするポリ核酸分子の特異性は、標的配列に対するポリ核酸分子の 95 %、98 %、99 %、99.5 %、あるいは 100 % の配列相補性である。いくつかの例では、ハイブリダイゼーションは高いストリングエントなハイブリダイゼーション状態である。

【0087】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はオフターゲット効果を減少させた。いくつかの例において、「オフターゲット」あるいは「オフターゲット効果」とは、所定の標的に対するポリ核酸ポリマーが、別の mRNA 配列、DNA 配列、あるいは細胞タンパク質またはその他の部分を直接的あるいは間接的に相互作用することによって意図しない効果を引き起こすあらゆる例を指す。いくつかの例では、その他の転写産物とポリ核酸分子のセンスおよび / またはアンチセンス鎖との間の部分的な相同性あるいは相補性によって他の転写産物の同時の分解がある場合に、「オフターゲット効果」が生じる。

【0088】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は天然または合成または人工のヌクレオチドアナログまたは塩基を含む。場合によっては、ポリ核酸分子は、DNA、RNA、および / またはヌクレオチドアナログの組み合わせを含む。いくつかの例では、合成または人工のヌクレオチドアナログまたは塩基は、リボース部分、リン酸塩部分、ヌクレオシド部分、あるいはその組み合わせの 1つ以上で修飾を含む。

【0089】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログあるいは人工ヌクレオチド塩基は、リボース部分の 2' 水酸基に修飾を有する核酸を含む。いくつかの例では、修飾は H、OR、R、ハロ、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、あるいは CN を含み、ここで、R はアルキル部分である。例示的なアルキル部分としては、限定されないが、ハロゲン、硫黄、チオール、チオエーテル、チオエステル、アミン（一級、二級、または三級）、アミド、エーテル、エステル、アルコール、および酸素が挙げられる。いくつかの例では、アルキル部分はさらに修飾を含む。いくつかの例では、修飾はアゾ基、ケト基、アルデヒド基、カルボキシル基、ニトロ基、ニトロソ基、ニトリル基、複素環（例えば、イミダゾール、ヒドラジノ、あるいはヒドロキシルアミノ）基、イソシアネートまたはシアナート基、あるいは硫黄含有基（例えば、スルホキシド、スルホン、スルフィド、あるいはジスルフィド）を含む。いくつかの例では、アルキル部分はさらにヘテロ置換を含む。いくつかの例では、複素環式置換は、限定されないが、モルホリノ、イミダゾール、および、ピロ

リジノを含む。

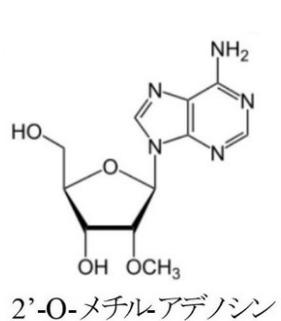
【0090】

いくつかの事例では、2' - ヒドロキシル基の修飾は、2' - O - メチル修飾または2' - O - メトキシエチル(2' - O - M O E)修飾である。場合によっては、2' - O - メチル修飾は、メチル基をリボース部分の2' - ヒドロキシル基に加え、一方で2' - O - メトキシエチル修飾は、メトキシエチル基をリボース部分の2' - ヒドロキシル基に加える。アデノシン分子の2' - O - メチル修飾およびウリジンの2' - O - メトキシエチル修飾の典型的な化学構造が、以下に例証される。

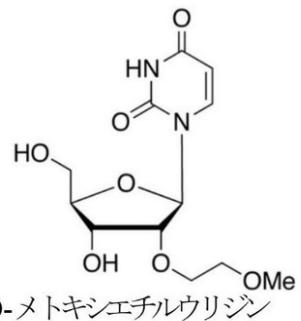
【0091】

【化1】

10



2'-O-メチルアデノシン



2'-O-メトキシエチルウリジン

20

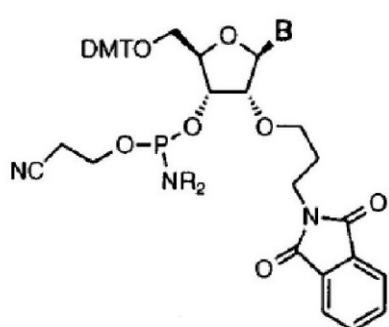
【0092】

いくつかの実施形態では、2' - ヒドロキシル基の修飾は、プロピルリンカーを含む伸長したアミン基がアミン基を2' - 酸素に結合する2' - O - アミノプロピル修飾である。いくつかの例では、この修飾は、1糖当たりアミン基から1つの正電荷を導入することによってオリゴヌクレオチド分子のリン酸塩由来の全体的な負電荷を中和し、それによって、その双性イオン特性による細胞取り込み特性を改善する。2' - O - アミノプロピルヌクレオシドホスホラミダイトの典型的な化学構造が、以下に例証される。

【0093】

【化2】

30



2'-O-アミノプロピルヌクレオシドホスホラミダイト

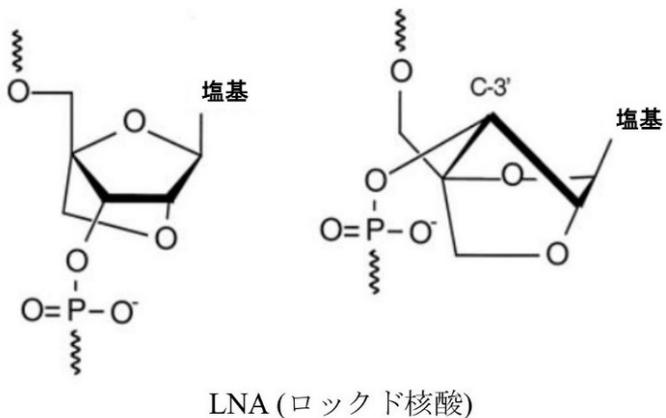
40

【0094】

いくつかの例では、2' - 水酸基の修飾はロックドまたは架橋リボース修飾（例えば、ロックド核酸またはLNA）であり、ここで、2' - 炭素で結合された酸素分子はメチレン基によって4' - 炭素に結合され、したがって、2' - C、4' - C - オキシ - メチレン結合二環式リボヌクレオチド単量体を形成する。LNAの化学構造の代表例が以下に例証される。左に示される代表例は、LNA単量体の化学結合性を強調している。右に示される代表例は、LNA単量体のフラノース環のロックド3' - endo (³E)構造を強調している。

【0095】

【化3】



10

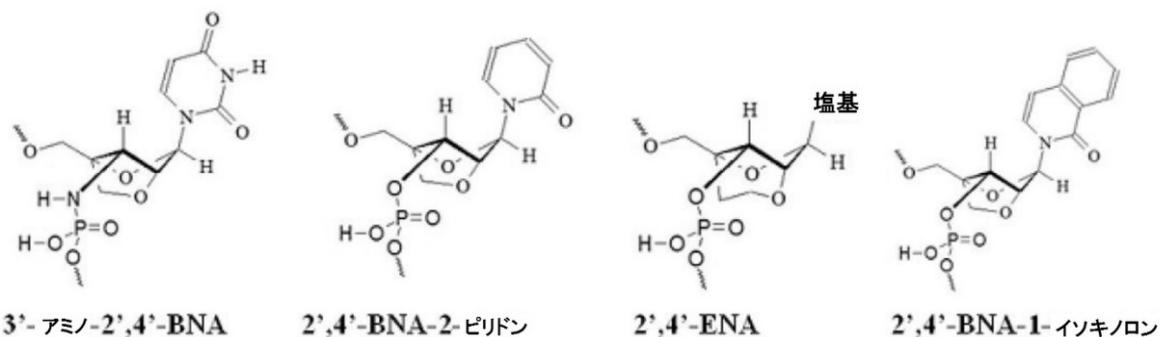
【0096】

いくつかの実施形態では、2' - ヒドロキシル基での修飾は、糖構造を3' - endo 糖のパッカリング構造 (sugar pucker ing conformation) へとロックする、例えば2' - 4' - エチレン架橋した核酸などの、エチレン核酸 (ENA) を含む。ENAは、LNAも含む修飾された核酸の架橋された核酸クラスの一部である。ENAおよび架橋された核酸の典型的な化学構造は、以下に例証される。

【0097】

20

【化4】



30

【0098】

いくつかの実施形態では、2' - ヒドロキシル基での追加の修飾は、2' - デオキシ、T - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル (2' - O - AP)、2' - O - ジメチルアミノエチル (2' - O - DMAOE)、2' - O - ジメチルアミノプロピル (2' - O - DMAP)、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル (2' - O - DMAOE)、または2' - O - N - メチルアセトアミド (2' - O - NMA) を含む。

【0099】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログは、限定されないが、5 - プロピニルウリジン、5 - プロピニルシチジン、6 - メチルアデニン、6 - メチルグアニン、N₁,N₂ - ジメチルアデニン、2 - プロピルアデニン、2 - プロピルグアニン、2 - アミノアデニン、1 - メチルイノシン、3 - メチルウリジン、5 - メチルシチジン、5 - メチルウリジン、および、5 位置に修飾を有する他のヌクレオチド、5 - (2 - アミノ) プロピルウリジン、5 - ハロシチジン、5 - ハロウリジン、4 - アセチルシチジン、1 - メチルアデノシン、2 - メチルアデノシン、3 - メチルシチジン、6 - メチルウリジン、2 - メチルグアノシン、7 - メチルグアノシン、2,2 - ジメチルグアノシン、5 - メチルアミノエチルウリジン、5 - メトキシウリジン、7 - デアザ - アデノシンなどのデアザヌクレオチド、6 - アゾウリジン、6 - アゾシチジン、6 - アゾチミジン、5 - メチル - 2 - チオウリジン、他のチオ塩基、例えば、2 - チオウリジンと4 - チオウリジン、および2 - チオシチジン、ジヒドロウリジン、ブソイドウリジン、キューオシン、アルカエオシン、

40

50

ナフチルおよび置換されたナフチル基、O-およびN-アルキル化プリンおよびピリミジン、例えば、N6-メチルアデノシン、5-メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン、5-オキシ酢酸、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニルおよび修飾フェニル基、例えば、アミノフェノールまたは2,4,6-トリメトキシベンゼン、Gクランプヌクレオチドとして作用する修飾されたシトシン、8-置換されたアデニンおよびグアニン、5-置換されたウラシルおよびチミン、アザピリミジン、カルボキシドロキシアルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルアミノアルキルヌクレオチド、および、アルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドなどの修飾塩基を含む。修飾されたヌクレオチドはさらに、リボシルではない糖あるいはそのアナログを有するヌクレオチドと同様に、糖部に対して修飾されるヌクレオチドを含む。例えば、場合によっては、糖部は、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4'-チオリボース、および、その他の糖類、複素環、あるいは炭素環であるか、または、これらがベースである。ヌクレオチドとの用語はさらに、普遍的な塩基として当技術分野で知られているものを含む。一例として、普遍的な塩基は、限定されないが、3-ニトロピロール、5-ニトロインドール、またはネプラリンを含む。

10

【0100】

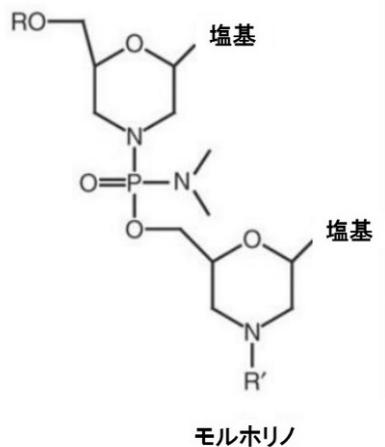
いくつかの実施形態では、ヌクレオチドアナログは、モルホリノ、ペプチド核酸(PNA)、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイト、1',5'-アンヒドロヘキシトール核酸(HNA)、またはそれらの組み合わせをさらに含む。モルホリノまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴ(PMO)は合分子を含み、その構造は、正常な糖およびリン酸塩構造からの偏差(deviates)によって天然の核酸構造を模倣している。いくつかの例では、5員のリボース環は、4つの炭素、1つの窒素、および1つの酸素を含有している6員のモルホリノ環で置換される。いくつかの場合では、リボース单量体は、リン酸基の代わりにホスホロジアミデート基によって結合される。場合によっては、骨格の変質は、荷電オリゴヌクレオチドによって使用されるような細胞送達剤(cellular delivery agents)の助けを借りることなく細胞膜を横断することができるモルホリノ中性分子を作るすべての正および負の電荷を除去する。

20

【0101】

【化5】

30



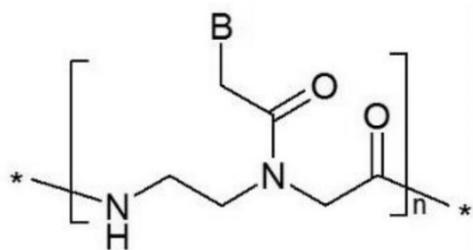
40

【0102】

いくつかの実施形態において、ペプチド核酸(PNA)は、糖骨格環もリン酸塩結合を含まず、塩基は結合し、オリゴグリシンのような分子によって適切に間隔を置かれ、ゆえに、骨格電荷を除去する。

【0103】

【化6】



PNA

10

【0104】

いくつかの実施形態において、1つ以上の修飾が随意にヌクレオチド間結合で生じる。いくつかの例では、修飾されたヌクレオチド間結合は、限定されないが、ホスホロチオエート、ホスホジチオエート、メチルホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、5'-メチルホスホネート、3'-アルキレンホスホネート、三フッ化ボウ素(boron trifluorideates)、3'-5'結合あるいは2'-5'結合のボラノリン酸エステルおよびセレノホスフェート、ホスホトリエステル、チオノアルキルホスホトリエステル、水素ホスホネート結合、アルキルホスホネート、アルキルホスホノチオエート、アリールホスホロチオエート、ホスホロセレノアート、ホスホロジセレノアート、ホスフィネート、ホスホルアミデート、3'-アルキルホスホルアミデート、アミノアルキルホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、ホスホロピペラジデート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニリデート、ケトン、スルホン、スルホンアミド、カルボネート、カルバメート、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルジメチルヒドラゾ、ホルムアセタル、チオホルムアセタル、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、チオアミデート、リボアセチル基との結合、アミノエチルグリシン、シリル、あるいはシロキサン結合、例えば、飽和または不飽和の、および/または、置換されたおよび/またはヘテロ原子を含む1~10の炭素のヘテロ原子を含むまたは含まないアルキルあるいはシクロアルキル結合、モルホリノ構造との結合、アミド、塩基が骨格のアザ窒素に直接的あるいは間接的に結合したポリアミド、またはこれらの組み合わせを含む。ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド(PS A SO)は、ホスホロチオエート結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。例示的なPS A SOが以下に説明される。

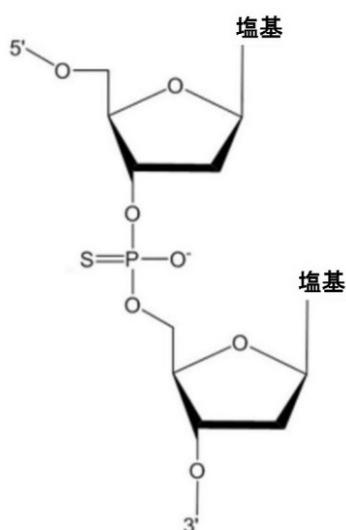
20

30

40

【0105】

【化7】



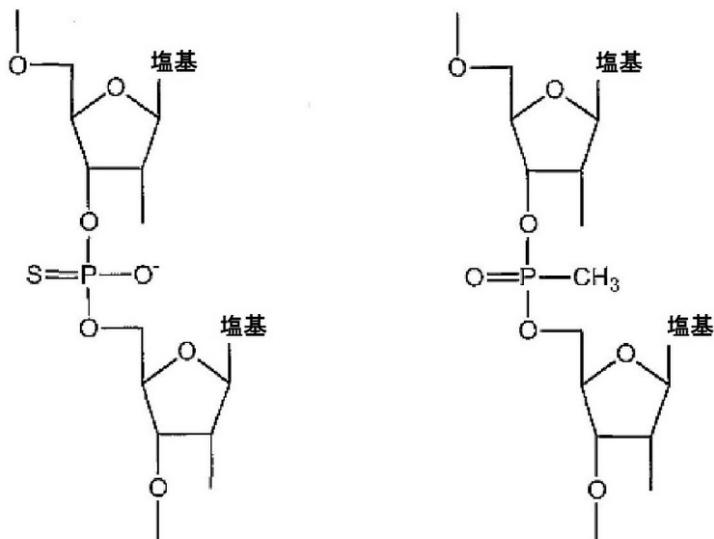
【0106】

50

いくつかの例では、修飾は、メチルホスホネートあるいはチオールホスホネート修飾などのメチルまたはチオール修飾である。典型的なチオールホスホネートヌクレオチド（左）およびメチルホスホネートヌクレオチド（右）が、以下に例証される。

【0107】

【化8】



10

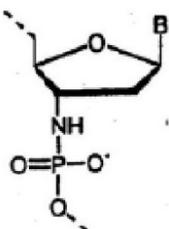
20

【0108】

いくつかの例では、修飾されたヌクレオチドは、限定されないが、以下のように例示される 2'-フルオロ N3'-P5'-ホスホロアミダイトを含む：

【0109】

【化9】



30

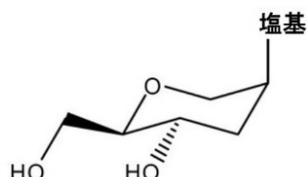
N3'-P5' ホスホロアミダイト

【0110】

いくつかの例では、修飾されたヌクレオチドは、限定されないが、以下のように例示されるヘキシトール核酸（あるいは、1'、5' - アンヒドロヘキシトール核酸（HNA））を含む：

【0111】

【化10】



HNA

40

【0112】

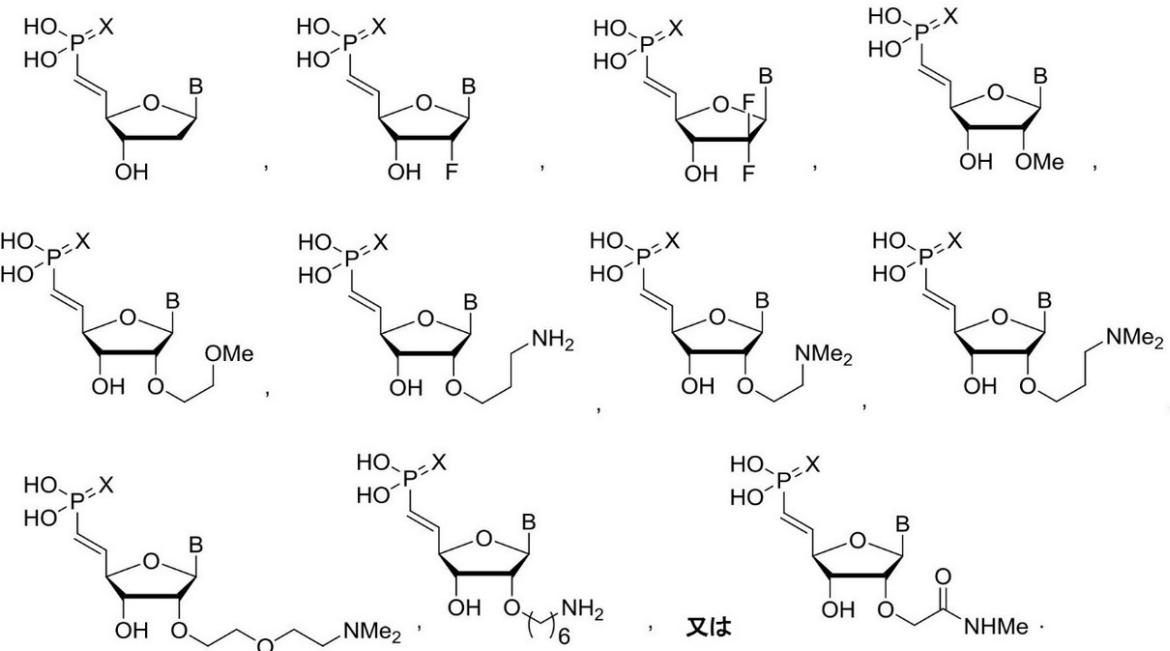
いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログあるいは人工ヌクレオチド塩基は

50

、リボース部分の5'水酸基における修飾を有する5' - ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド核酸を含む。いくつかの実施形態において、5' - ビニルホスホネート修飾ヌクレオチドは、以下から提供されたヌクレオチドから選択され、式中、XはOまたはSであり；および、Bは複素環式塩基部分である。

【0113】

【化11】



10

20

30

【0114】

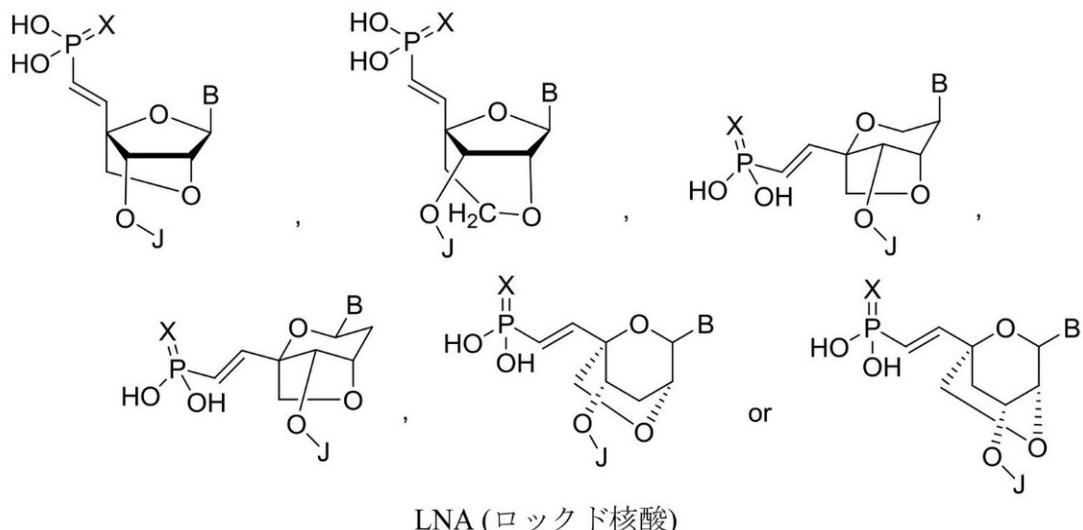
いくつかの実施形態では、2'ヒドロキシル基の修飾は、プロピルリンカーを含む伸長したアミン基がアミン基を2'酸素に結合する、2' - O - アミノプロピル修飾である。いくつかの例では、この修飾は、1糖当たりアミン基から1つの正電荷を導入することによってオリゴヌクレオチド分子のリン酸塩由来の全般的な負電荷を中和し、それによって、その双性イオン特性による細胞取り込み特性を改善する。

【0115】

いくつかの例では、5' - ビニルホスホネートはロックドまたは架橋リボース修飾（例えば、ロックド核酸またはLNA）でさらに修飾され、ここで、2'炭素で結合された酸素分子はメチレン基によって4'炭素に結合され、したがって、2' - C、4' - C - オキシ - メチレン結合二環式リボヌクレオチド単量体を形成する。5' - ビニルホスホネート修飾されたLNAの化学構造の例示的な表現が以下に例示され、式中、XはOまたはSであり；Bは複素環式塩基部分であり；および、Jは、ポリヌクレオチドの隣接するヌクレオチドに結合するヌクレオチド間結合基である。

【0116】

【化12】



【0117】

いくつかの実施形態では、2' - ヒドロキシル基での追加の修飾は、2' - デオキシ、T - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル (2' - O - A P)、2' - O - ジメチルアミノエチル (2' - O - D M A O E)、2' - O - ジメチルアミノプロピル (2' - O - D M A P)、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル (2' - O - D M A E O E)、または2' - O - N - メチルアセトアミド (2' - O - N M A) を含む。

20

【0118】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログは、修飾塩基、例えば、限定されないが、5 - プロピニルウリジン、5 - プロピニルシチジン、6 - メチルアデニン、6 - メチルグアニン、N , N , - ジメチルアデニン、2 - プロピルアデニン、2 - プロピルグアニン、2 - アミノアデニン、1 - メチルイノシン、3 - メチルウリジン、5 - メチルシチジン、5 - メチルウリジン、および、5 位置に修飾を有する他のヌクレオチド、5 - (2 - アミノ) プロピルウリジン、5 - ハロシチジン、5 - ハロウリジン、4 - アセチルシチジン、1 - メチルアデノシン、2 - メチルアデノシン、3 - メチルシチジン、6 - メチルウリジン、2 - メチルグアノシン、7 - メチルグアノシン、2 , 2 - ジメチルグアノシン、5 - メチルアミノエチルウリジン、5 - メトキシウリジン、デアザヌクレオチド (7 - デアザ - アデノシン、6 - アゾウリジン、6 - アゾシチジン、あるいは6 - アゾチミジンなど)、5 - メチル - 2 - チオウリジン、他のチオ塩基 (2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、および2 - チオシチジンなど)、ジヒドロウリジン、プソイドウリジン、キューオシン、アルカエオシン、ナフチルおよび置換されたナフチル基、O - およびN - アルキル化プリンおよびピリミジン、例えば、N 6 - メチルアデノシン、5 - メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン、5 - オキシ酢酸、ピリジン - 4 - オン、ピリジン - 2 - オン、フェニルおよび修飾フェニル基、例えば、アミノフェノールまたは2 , 4 , 6 - トリメトキシベンゼン、G クランプヌクレオチドとして作用する修飾されたシトシン、8 - 置換されたアデニンおよびグアニン、5 - 置換されたウラシルおよびチミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシアルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルアミノアルキルヌクレオチド、および、アルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドを含む。5 ' - ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドはさらに、リボシルではない糖あるいはそのアナログを有する5 ' - ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドと同様に、糖部に対して修飾されるこれらヌクレオチドを含む。例えば、場合によっては、糖部は、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4 ' - チオリボース、および、その他の糖類、複素環、あるいは炭素環であるか、または、これらがベースである。ヌクレオチドとの用語はさらに、普遍的な塩基として当技術分野で知られているものを含む。一例として、普遍的な塩基は、限定されないが、3 - ニトロピロール、5 - ニトロインドー

30

40

50

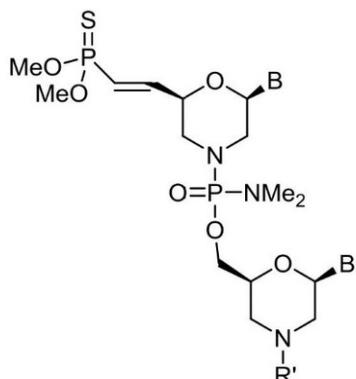
ル、またはネブラリンを含む。

【0119】

いくつかの実施形態において、5' - ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドアナログはさらに、モルホリノ、ペプチド核酸(PNA)、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2' - フルオロN3-P5'ホスホラミダイト、あるいは1', 5' - アンヒドロヘキシトール核酸(HNA)を含む。モルホリノまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴ(PMO)は合成分子を含み、その構造は、天然の核酸構造を模倣しているが、正常な糖とリン酸塩の構造からは逸脱している。いくつかの例では、5員のリボース環は、4つの炭素、1つの窒素、および1つの酸素を含有している6員のモルホリノ環で置換される。いくつかの場合では、リボース単量体は、リン酸基の代わりにホスホロジアミデート基によって結合される。そのような場合には、骨格の変質は、荷電オリゴヌクレオチドによって使用されるような細胞送達剤(cellular delivery agents)の助けを借りることなく細胞膜を横断することができるモルホリノ中性分子を作るすべての正および負の電荷を除去する。5' - ビニルホスホネート修飾されたモルホリノオリゴヌクレオチドの非限定的な例が例示され、式中、XはOまたはSであり；および、Bは複素環式塩基部分である。

【0120】

【化13】



【0121】

いくつかの実施形態において、上に記載された5' - ビニルホスホネート修飾されたモルホリノまたはPMOは、正電荷またはカチオン電荷を含むPMOである。いくつかの例では、PMOはPMO plus(Sarepta)である。PMO plusは、任意の数の(1 - ピペラジノ)ホスフィニリデンデオキシ(phosphinylideneoxy)、1 - (4 - (オメガ - グアニジノ - アルカノイル)) - ピペラジノ)ホスフィニリデンデオキシ結合(例えば、PCT公開公報WO2008/036127に記載されるものなど)を含むホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーを指す。いくつかの例では、PMOは、米国特許第7943762号に記載されるPMOである。

【0122】

いくつかの実施形態において、上に記載されたモルホリノまたはPMOはPMO-X(Sarepta)である。場合によっては、PMO-Xは、PCT公開公報WO2011/150408と米国公報2012/0065169号に記載されるものなどの、開示された末端修飾の少なくとも1つの結合あるいは少なくとも1つを含むホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーを指す。

【0123】

いくつかの実施形態において、上に記載されたモルホリノまたはPMOは、米国公開公報2014/0296321号の表5に記載されるようなPMOである。

【0124】

5' - ビニルホスホネート修飾された核酸の化学構造の例示的な表現が以下に例示され、式中、XはOまたはSであり；

10

20

30

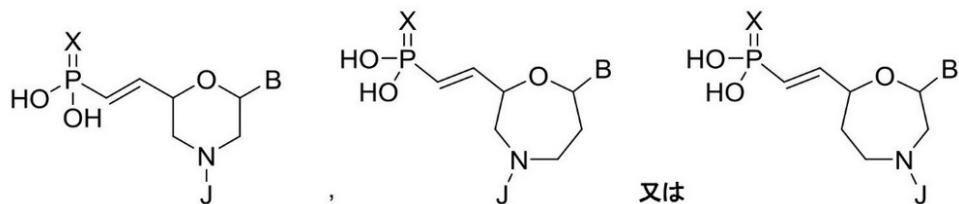
40

50

B は複素環式塩基部分であり；および、J はヌクレオチド間結合である。

【0125】

【化14】



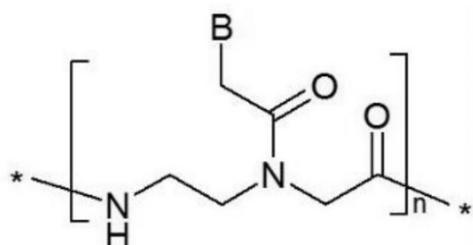
【0126】

10

いくつかの実施形態において、ペプチド核酸（PNA）は、糖骨格環もリン酸塩結合を含まず、塩基は結合し、オリゴグリシン様分子によって適切に間隔を置かれ、ゆえに、骨格電荷を除去する。

【0127】

【化15】



20

PNA

【0128】

30

いくつかの実施形態において、5' - ビニルホスホネート修飾されたオリゴヌクレオチドの1つ以上の修飾は、ヌクレオチド間結合で随意に生じる。いくつかの例では、修飾されたヌクレオチド間結合は、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；メチルホスホネート；5' - アルキレンホスホネート；5' - メチルホスホネート；3' - アルキレンホスホネート；三フッ化ホウ素；3' - 5' 結合あるいは2' - 5' 結合のボラノリン酸エステルとセレノホスフェート；ホスホトリエステル；チオノアルキルホスホトリエステル；水素ホスホネート結合；アルキルホスホネート；アルキルホスホノチオエート；アリールホスホノチオエート；ホスホロセレノアート；ホスホロジセレノアート；ホスフィネート；ホスホルアミデート；3' - アルキルホスホルアミデート；アミノアルキルホスホルアミデート；チオノホスホルアミデート；ホスホロピペラジデート；ホスホロアニロチオエート；ホスホロアニリデート；ケトン；スルホン；スルホンアミド；炭酸塩；カルバマート；メチレンヒドラゾ；メチレンジメチルジメチルヒドラゾ；ホルムアセタル；チオホルムアセタル；オキシム；メチレンイミノ；メチレンメチルイミノ；チオアミデート；リボアセチル基との結合；アミノエチルグリシン；シリルあるいはシロキサン結合；例えば、飽和または不飽和の、および／または、置換されたおよび／またはヘテロ原子を含む1 ~ 10の炭素のヘテロ原子を含むまたは含まないアルキルあるいはシクロアルキル結合；モルホリノ構造との結合、アミド、塩基が骨格のアザ窒素に直接的あるいは間接的に結合したポリアミド、またはこれらの組み合わせを含む。

40

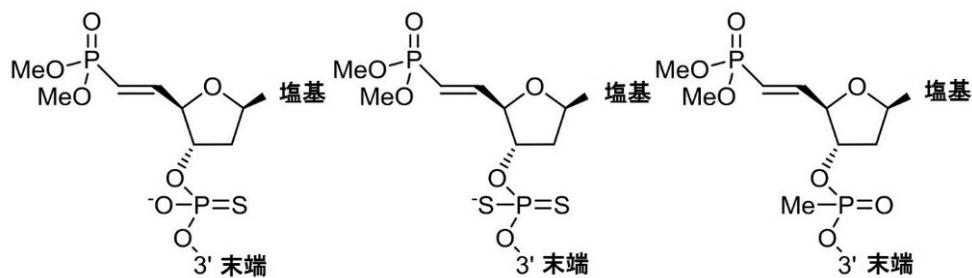
【0129】

いくつかの例では、修飾は、メチルホスホネートあるいはチオールホスホネート修飾などのメチルまたはチオール修飾である。典型的なチオールホスホネートヌクレオチド（左）、ホスホロジチオエート（中）、およびメチルホスホネートヌクレオチド（右）が、以下に例証される。

【0130】

50

【化16】



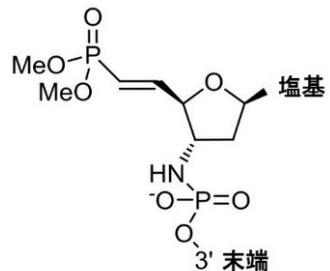
10

【0131】

いくつかの例では、5'-ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドは、限定されないが、以下として例示されるホスホラミダイトを含む。

【0132】

【化17】



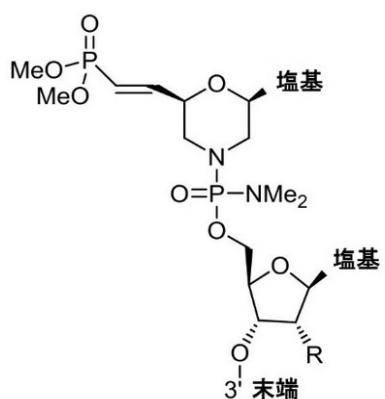
20

【0133】

いくつかの例では、修飾されたヌクレオチド間結合はホスホジアミデート結合である。モルホリノ系を用いるホスホジアミデート結合の非限定的な例が以下に示される。

【0134】

【化18】



30

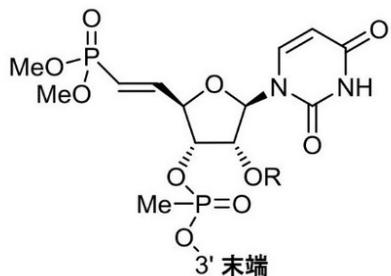
【0135】

いくつかの例では、修飾されたヌクレオチド間結合はメチルホスホネート結合である。メチルホスホネート結合の非限定的な例が以下に示される。

【0136】

40

【化19】



【0137】

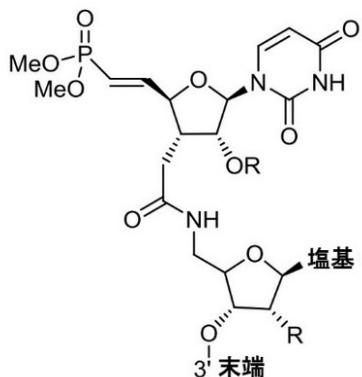
10

いくつかの例では、修飾されたヌクレオチド間結合はアミド結合である。アミド結合の非限定的な例が以下に示される。

【0138】

【化20】

20



【0139】

30

いくつかの例では、5' - ビニルホスホネート修飾されたヌクレオチドは、限定されないが、以下に例示される修飾された核酸を含む。

【0140】

40

いくつかの実施形態において、1つ以上の修飾は、修飾が中性または無荷電の骨格を生成する、修飾されたホスフェート骨格を含む。いくつかの例では、ホスフェート骨格は、無荷電または中性のホスフェート骨格を生成するアルキル化によって修飾される。本明細書で使用されるように、アルキル化は、メチル化、エチル化、およびプロピル化を含む。場合によっては、アルキル基は、アルキル化の文脈において本明細書で使用されるように、1 ~ 6 の炭素原子を含有している直鎖または分岐鎖の飽和炭化水素基を指す。いくつかの例では、例示的なアルキル基としては、限定されないが、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチル、イソブチル、sec - ブチル、tert - ブチル、n - ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、1 , 1 - ジメチルブチル、2 , 2 - ジメチルブチル、3 . 3 - ジメチルブチル、および2 - エチルブチルの基が挙げられる。場合によっては、修飾されたホスフェートは、米国特許第9481905号に記載されるホスフェート基である。

【0141】

いくつかの実施形態において、追加の修飾されたホスフェート骨格は、メチルホスホネート、エチルホスホネート、メチルチオホスホネート、あるいはメトキシホスホネートを含む。場合によっては、修飾されたホスフェートはメチルホスホネートである。場合によっては、修飾されたホスフェートはエチルホスホネートである。場合によっては、修飾されたホスフェートはメチルチオホスホネートである。場合によっては、修飾されたホスフェートはメトキシホスホネートである。

【0142】

50

いくつかの実施形態において、1つ以上の修飾はさらに、リボース部分、ホスフェート

骨格、およびヌクレオシドの修飾、あるいは3'または5'末端のヌクレオチドアナログ修飾を含む。例えば、3'末端は随意に3'カチオン基を含み、あるいは、3'-3'結合を含む3'-末端でヌクレオシドを反転させる。別の代替物では、3'-末端は随意に、アミノアルキル基、例えば、3'C5-アミノアルキルdTと共に役される。追加の代替物では、3'-末端は随意に、脱塩基部位、例えば、アプリン酸またはアピリミジン酸部位と共に役される。いくつかの例では、5'-末端は、アミノアルキル基、例えば、5'-O-アミノアルキル置換基と共に役される。場合によっては、5'-末端は、脱塩基部位、例えば、アプリン酸またはアピリミジン酸部位と共に役される。

【0143】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログの1つ以上を含む。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25以上の本明細書に記載される人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態では、人工ヌクレオチドアナログは、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、あるいは、修飾された2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイト、あるいはこれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、あるいは、修飾された2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイト、あるいはこれらの組み合わせから選択された1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25以上の人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25以上の2'-O-メチル修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー修飾された非天然のヌクレオチドを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、100%ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー修飾された非天然のヌクレオチドを含む。

【0144】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、複数のホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーあるいは複数のペプチド核酸修飾された非天然のヌクレオチドを含み、および、少なくとも1つの逆脱塩基部分を随意に含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー修飾された非天然のヌクレオチドを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、100%ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー修飾された非天然のヌクレオチドを含む。

【0145】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、少なくとも6、7、8、9、10、11、12、

10

20

30

40

50

13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のペプチド核酸修飾された非天然のヌクレオチドを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、100%ペプチド核酸修飾された非天然のヌクレオチドを含む。

【0146】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、各ヌクレオチドアナログが立体化学的に異性型である1つ以上のヌクレオチドアナログを含む。そのような例では、ポリ核酸分子はキラル分子である。場合によっては、ヌクレオチドアナログは骨格立体化学を含む。さらなる場合には、ヌクレオチドアナログは、米国特許9,982,257、9,695,211、あるいは9,605,019に記載されるようなキラルアナログを含む。

【0147】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、以下の少なくとも1つを含む：約5%から約100%の修飾、約10%から約100%の修飾、約20%から約100%の修飾、約30%から約100%の修飾、約40%から約100%の修飾、約50%から約100%の修飾、約60%から約100%の修飾、約70%から約100%の修飾、約80%から約100%の修飾、および、約90%から約100%の修飾。

【0148】

場合によっては、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つを含む：約10%から約90%の修飾、約20%から約90%の修飾、約30%から約90%の修飾、約40%から約90%の修飾、約50%から約90%の修飾、約60%から約90%の修飾、約70%から約90%の修飾、および、約80%から約100%の修飾。

【0149】

場合によっては、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つを含む：約10%から約80%の修飾、約20%から約80%の修飾、約30%から約80%の修飾、約40%から約80%の修飾、約50%から約80%の修飾、約60%から約80%の修飾、および、約70%から約80%の修飾。

【0150】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、以下の少なくとも1つを含む：約10%から約70%の修飾、約20%から約70%の修飾、約30%から約70%の修飾、約40%から約70%の修飾、約50%から約70%の修飾、および、約60%から約70%の修飾。

【0151】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、以下の少なくとも1つを含む：約10%から約60%の修飾、約20%から約60%の修飾、約30%から約60%の修飾、約40%から約60%の修飾、および約50%から約60%の修飾。

【0152】

場合によっては、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つを含む：約10%から約50%の修飾、約20%から約50%の修飾、約30%から約50%の修飾、および約40%から約50%の修飾。

【0153】

場合によっては、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つを含む：約10%から約40%の修飾、約20%から約40%の修飾、および約30%から約40%の修飾。

【0154】

場合によっては、ポリ核酸分子は以下の少なくとも1つを含む：約10%から約30%の修飾、および約20%から約30%の修飾。

【0155】

場合によっては、ポリ核酸分子は約10%から約20%の修飾を含む。

【0156】

場合によっては、ポリ核酸分子は約15%から約90%、約20%から約80%、約30%から約70%、あるいは約40%から約60%の修飾を含む。

【0157】

さらなる場合には、ポリ核酸分子は少なくとも約15%、20%、30%、40%、50%

0 %、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の修飾を含む。

【0158】

いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、またはそれ以上の修飾を含む。

【0159】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、またはそれ以上の修飾されたヌクレオチドを含む。

10

【0160】

いくつかの例では、約5から約100%のポリ核酸分子は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%は、本明細書に記載される人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約5%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約10%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約15%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約20%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約25%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約30%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約35%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約40%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約45%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約50%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約55%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約60%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約65%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約70%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約75%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約80%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約85%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約90%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約95%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約96%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約97%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約98%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約99%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約100%は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログは、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、あるいは、修飾された2'-O-N-メチルア

20

30

40

50

セトアミド(2'-O-NMA)、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイト、あるいはこれらの組み合わせを含む。

【0161】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約1～約25の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約1の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約2の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約3の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約4の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約5の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約6の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約7の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約8の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約9の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約10の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約11の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約12の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約13の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約14の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約15の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約16の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約17の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約18の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約19の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約20の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約21の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約22の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約23の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約24の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約25の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。

【0162】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は2つの別個のポリヌクレオチドから組み立てられ、ここで、1つのポリヌクレオチドはセンス鎖を含み、第2のポリヌクレオチドはポリ核酸分子のアンチセンス鎖を含む。他の実施形態では、センス鎖はリンカー分子に

10

20

30

40

50

よってアンチセンス鎖に接続され、これは、いくつかの例では、ポリヌクレオチドリンカーあるいは非ヌクレオチドリンカーである。

【0163】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、ここで、センス鎖中のピリミジンヌクレオチドは2'-O-メチルピリミジンヌクレオチドを含み、センス鎖中のプリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、ここで、センス鎖中に存在するピリミジンヌクレオチドは2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドを含み、センス鎖中に存在するプリンヌクレオチドは2'-デオキシプリンヌクレオチドを含む。

10

【0164】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、ここで、ピリミジンヌクレオチドは、前記アンチセンス鎖中に存在する場合、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、プリンヌクレオチドは前記アンチセンス鎖中に存在する場合、2'-O-メチルプリンヌクレオチドである。

【0165】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、ここで、ピリミジンヌクレオチドは、前記アンチセンス鎖中に存在する場合、2'-デオキシ-2'-フルオロピリミジンヌクレオチドであり、プリンヌクレオチドは前記アンチセンス鎖中に存在する場合、2'-デオキシ-プリンヌクレオチドを含む。

20

【0166】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、ここで、センス鎖は、センス鎖の5'-末端、3'-末端、あるいは5' と3' の末端の両方でキャップ部分を含む。他の実施形態では、末端のキャップ部分は反転デオキシ脱塩基部分である。

【0167】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖はアンチセンス鎖の3'末端にリン酸塩骨格修飾を含む。いくつかの例では、ホスフェート骨格修飾は、ホスホロチオエートである。場合によっては、パッセンジャー鎖は、ガイド鎖よりも多くのホスホロチオエート修飾を含む。他の場合では、ガイド鎖は、パッセンジャー鎖よりも多くのホスホロチオエート修飾を含む。追加の場合には、パッセンジャー鎖は、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のホスホロチオエート修飾を含む。追加の場合には、ガイド鎖は、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のホスホロチオエート修飾を含む。

30

【0168】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖はアンチセンス鎖の3'末端にグリセリル修飾を含む。

【0169】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、ここで、センス鎖は、1つ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または、1つ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）の2'-デオキシ、2'-O-メチル、2'-デオキシ-2'-フルオロ、ならびに/あるいは、1つ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）の間にに関するおよび/または、普遍的な塩基修飾ヌクレオチド、ならびに、随意にセンス鎖の3'-末端、5'-末端、あるいは3'-と5'-の末端の両方で末端キャップ分子を含み；および、アンチセンス鎖は、約1から約10の、とりわけ、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または、1つ以上（例えば、約1、2、3、4

40

50

、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ以上) の 2' - デオキシ、 2' - O - メチル、 2' - デオキシ - 2' - フルオロ、 ならびに / あるいは、 1つ以上(例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ以上) の普遍的な塩基修飾ヌクレオチド、 ならびに、 隨意にアンチセンス鎖の 3' - 末端、 5' - 末端、 あるいは 3' - と 5' - の末端の両方で末端キャップ分子を含む。他の実施形態において、 1つ以上、 例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ以上の、 センス鎖および / またはアンチセンス鎖のピリミジンヌクレオチドは、 2' - デオキシ、 2' - O - メチル、 および / または 2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチドを用いて、 あるいは 1つ以上、 例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、 および / または、 同じあるいは異なる鎖に存在する 3' - 末端、 5' - 末端、 あるいは 3' - と 5' - の末端の両方の末端キャップ分子を用いて、 または、 用いずに、 化学修飾される。

10

【0170】

いくつかの実施形態において、 ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、 ここで、 センス鎖は、 約 1 ~ 約 25、 例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 11、 12、 13、 14、 15、 16、 17、 18、 19、 20、 またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、 および / または、 1つ以上(例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ以上) の 2' - デオキシ、 2' - O - メチル、 2' - デオキシ - 2' - フルオロ、 ならびに / あるいは、 1つ以上(例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ以上) の普遍的な塩基修飾ヌクレオチド、 ならびに、 隨意にセンス鎖の 3' - 末端、 5' - 末端、 あるいは 3' - と 5' - の末端の両方で末端キャップ分子を含み； および、 アンチセンス鎖は、 約 1 から 約 25 の、 例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 11、 12、 13、 14、 15、 16、 17、 18、 19、 20、 またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、 および / または、 1つ以上(例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ以上) の 2' - デオキシ、 2' - O - メチル、 2' - デオキシ - 2' - フルオロ、 ならびに / あるいは、 1つ以上(例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ以上) の普遍的な塩基修飾ヌクレオチド、 ならびに、 隨意にアンチセンス鎖の 3' - 末端、 5' - 末端、 あるいは 3' - と 5' - の末端の両方で末端キャップ分子を含む。他の実施形態において、 1つ以上、 例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ以上の、 センス鎖および / またはアンチセンス鎖のピリミジンヌクレオチドは、 2' - デオキシ、 2' - O - メチル、 および / または 2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチドを用いて、 約 1 から 約 25 以上の、 例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 11、 12、 13、 14、 15、 16、 17、 18、 19、 20、 またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、 および / または、 同じあるいは異なる鎖に存在する 3' - 末端、 5' - 末端、 あるいは 3' - と 5' - の末端の両方の末端キャップ分子を用いて、 または、 用いずに、 化学修飾される。

20

30

30

【0171】

いくつかの実施形態において、 ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、 ここで、 アンチセンス鎖は、 1つ以上、 例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 11、 12、 13、 14、 15、 16、 17、 18、 19、 20、 またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、 および / または、 約 1つ以上(例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ以上) の 2' - デオキシ、 2' - O - メチル、 2' - デオキシ - 2' - フルオロ、 ならびに / あるいは、 1つ以上(例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ以上) の普遍的な塩基修飾ヌクレオチド、 ならびに、 隨意にセンス鎖の 3' - 末端、 5' - 末端、 あるいは 3' - と 5' - の末端の両方で末端キャップ分子を含み； および、 アンチセンス鎖は、 約 1 から 約 10 の、 とりわけ、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、 および / または、 1つ以上(例えば、 約 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 またはそれ以上) の 2' - デオキシ、 2' - O - メチ

40

50

ル、2' - デオキシ - 2' - フルオロ、ならびに / あるいは、1つ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）の普遍的な塩基修飾ヌクレオチド、ならびに、随意にアンチセンス鎖の3' - 末端、5' - 末端、あるいは3' - と5' - の末端の両方で末端キャップ分子を含む。他の実施形態において、1つ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上の、センス鎖および / またはアンチセンス鎖のピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ、2' - O - メチル、および / または2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチドを用いて、1つ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および / または、同じあるいは異なる鎖に存在する3' - 末端、5' - 末端、あるいは3' - と5' - の末端の両方の末端キャップ分子を用いて、または、用いずに、化学修飾される。

【0172】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は、約1から約25の、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および / または、1つ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）の2' - デオキシ、2' - O - メチル、2' - デオキシ - 2' - フルオロ、ならびに / あるいは、1つ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）の普遍的な塩基修飾ヌクレオチド、ならびに、随意にセンス鎖の3' - 末端、5' - 末端、あるいは3' - と5' - の末端の両方で末端キャップ分子を含み、および、アンチセンス鎖は、約1から約25の、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および / または、1つ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）の2' - デオキシ、2' - O - メチル、2' - デオキシ - 2' - フルオロ、ならびに / あるいは、1つ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上）の普遍的な塩基修飾ヌクレオチド、ならびに、随意にアンチセンス鎖の3' - 末端、5' - 末端、あるいは3' - と5' - の末端の両方で末端キャップ分子を含む。他の実施形態において、1つ以上、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9あるいは10以上の、センス鎖および / またはアンチセンス鎖のピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ、2' - O - メチル、および / または2' - デオキシ - 2' - フルオロヌクレオチドを用いて、約1から約5、例えば、約1、2、3、4、5以上（ホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および / または、同じあるいは異なる鎖に存在する3' - 末端、5' - 末端、あるいは3' - と5' - の末端の両方の末端キャップ分子を用いて、または、用いずに、化学修飾される。

【0173】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、以下の特性の1つ以上を用いる二本鎖ポリ核酸分子である：高い肝細胞安定性、全体的な電荷の減少、肝細胞の取り込みの減少、あるいは薬物動態の拡張。いくつかの実施形態において、二本鎖ポリ核酸分子は、複数の修飾を含むパッセンジャー鎖（例えば、センス鎖）とガイド鎖（例えば、アンチセンス鎖）を含む。

【0174】

いくつかの実施形態において、二本鎖ポリ核酸分子は、上に記載された修飾の1つ以上を有するガイド鎖（例えば、アンチセンス鎖）、および複数のホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーあるいは複数のペプチド核酸修飾された非天然のヌクレオチドを有するパッセンジャー鎖（例えば、センス鎖）を含む。

【0175】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、ポリ核酸分子の各鎖において、約1～約25、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、

10

20

30

40

50

11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学修飾された短干涉核酸分子である。

【0176】

別の実施形態では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は2' - 5' ヌクレオチド間結合を含む。いくつかの例では、2' - 5' ヌクレオチド間結合は、一方または両方の配列鎖の3' - 末端、5' - 末端、あるいは3' - 末端と5' - 末端の両方にある。追加の例では、2' - 5' ヌクレオチド間結合は、一方あるいは両方の配列鎖内の様々な他の位置に存在し、例えば、ポリ核酸分子の一方または両方の鎖中のピリミジンヌクレオチドのすべてのヌクレオチド間結合の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上は、2' - 5' ヌクレオチド間結合を含み、あるいは、ポリ核酸分子の一方または両方の鎖中にプリンヌクレオチドのすべてのヌクレオチド間結合の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上は、2' - 5' ヌクレオチド間結合を含む。

10

【0177】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、細胞中のRNAi活性を媒介するか、インビトロ系で再構成された単鎖ポリ核酸分子であり、ここで、ポリ核酸分子は、標的核酸配列に対する相補性を有する単鎖ポリヌクレオチドを含み、および、ポリ核酸中に存在する1つ以上のピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、ここで、ピリミジンヌクレオチドはすべて2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり、あるいは、代替的に、複数のピリミジンヌクレオチドは2' - デオキシ - 2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである）、および、ポリ核酸中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、2' - デオキシプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドは2' - デオキシプリンヌクレオチドであるか、あるいは代替的に、複数のプリンヌクレオチドは2' - デオキシプリンヌクレオチドである）、および、末端のキャップ修飾は、アンチセンス配列の3' - 末端、5' - 末端、あるいは3' と5' - 末端の両方で随意に存在する。ポリ核酸分子は、ポリ核酸分子の3' 末端に約1 ~ 約4（例えば約1、2、3、あるいは4）の末端2' - デオキシリボヌクレオチドを随意にさらに含み、ここで、末端のヌクレオチドはさらに、1つ以上（例えば、1、2、3、あるいは4）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、および、ポリ核酸分子は随意に5' - 末端リン酸基などの末端リン酸基をさらに含む。

20

【0178】

場合によっては、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログの1つ以上は、天然のポリ核酸分子と比較して、例えば、RNaseHなどのリボヌクレアーゼ、DNaseなどのデオキシリボヌクレアーゼ、または、5' - 3' エキソヌクレアーゼや3' - 5' エキソヌクレアーゼのようなエキソヌクレアーゼなどのヌクレアーゼに対して抵抗性である。いくつかの例では、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル（2' - O - MOE）、2' - O - アミノプロピル、2' - デオキシ、T - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル（2' - O - AP）、2' - O - ジメチルアミノエチル（2' - O - DMAOE）、2' - O - ジメチルアミノプロピル（2' - O - DMAAP）、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル（2' - O - DMAEOE）、あるいは、修飾された2' - O - N - メチルアセトアミド（2' - O - NMA）、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2' - フルオロN3 - P5' - ホスホラミダイト、あるいは、これらの組み合わせを含む人工ヌクレオチドアナログは、RNaseHなどのリボヌクレアーゼ、DNaseなどのデオキシリボヌクレアーゼ、または、5' - 3' エキソヌクレアーゼや3' - 5' エキソヌクレアーゼのようなエキソヌクレアーゼなどのヌクレアーゼに対して抵抗性である。いくつかの例では、2' - O メチル修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' O - メトキシエチル（2' - O - MOE）修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）

30

40

50

である。いくつかの例では、2' - O - アミノプロピル修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' - デオキシ修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、T - デオキシ - 2' - O - フルオロ修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' - O - アミノプロピル（2' - O - AP）修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' - O - ジメチルアミノエチル（2' - O - DMAOE）修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' - O - ジメチルアミノプロピル（2' - O - DMAP）修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル（2' - O - DMAEOE）修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' - O - N - メチルアセトアミド（2' - O - NMA）修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、LNA修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、ENA修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、HNA修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、モルホリノは、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、PNA修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼに対する耐性を有する（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）。いくつかの例では、メチルホスホネートヌクレオチド修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、チオールホスホネートヌクレオチド修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' - フルオロN3 - P5' - ホスホラミダイトを含むポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNase H、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、本明細書に記載された5' 抱合体は5' - 3' エキソヌクレアーゼ切断を阻害する。いくつかの例では、本明細書に記載された3' 抱合体は3' - 5' エキソヌクレアーゼ切断を阻害する。

【0179】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログの1つ以上は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル（2' - O - MOE）、2' - O - アミノプロピル、2' - デオキシ、T - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル（2' - O - AP）、2' - O - ジメチルアミノエチル（2' - O - DMAO

10

20

30

40

50

E)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、あるいは、修飾された2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、または2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイトを含む人工ヌクレオチドアナログの1つ以上を含むポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'-O-メチル修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'-O-アミノプロピル修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'-デオキシ修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、T-デオキシ-2'-フルオロ修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、LNA修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、ENA修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、PNA修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、HNA修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、モルホリノ修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、メチルホスホネートヌクレオチド修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、チオールホスホネートヌクレオチド修飾ポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。いくつかの例では、2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイトを含むポリ核酸分子は、同等の天然のポリ核酸分子と比して、そのmRNA標的に対する結合親和性を増大させた。場合によっては、増加した親和性は、低Kd、高融解温度(Tm)、あるいはその組み合わせで例証される。

【0180】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、キラル純粋(あるいはステレオ純粋)なポリ核酸分子、あるいは単一のエナンチオマーを含むポリ核酸分子である。いくつかの例では、ポリ核酸分子はL-ヌクレオチドを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子はD-ヌクレオチドを含む。いくつかの例において、ポリ核酸分子組成物は、その鏡像異性体の30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下を含む。場合によっては、ポリ核酸分子組成物は、ラセミ混合物の30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、また

10

20

30

40

50

はそれ以下を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、米国特許出願公開第：2014 / 194610号と2015 / 211006号；WO 2015107425に記載されるポリ核酸分子である。

【0181】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、アプタマー共役部分を含めるようにさらに修飾される。いくつかの例では、アプタマー共役部分はDNAアプタマー共役部分である。いくつかの例では、アプタマー共役部分は、Alphamer (Centauri Therapeutics)であり、これは、特定細胞表面標的と、循環抗体に結合するための特定のエピトープを示す部分とを認識するアプタマー部分を含んでいる。いくつかの例において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、米国特許第8,604,184号、8,591,910号、および、7,850,975号に記載されるようなアプタマー共役部分を含めるようにさらに修飾される：

【0182】

追加の実施形態では、本明細書に記載されたポリ核酸分子はその安定性を増大させるために修飾される。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はRNA（例えばsiRNA）である。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、その安定性を増大させるために上に記載された修飾の1つ以上によって修飾されている。場合によっては、ポリ核酸分子は、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、T-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、T-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾、あるいは、ロックドまたは架橋リボース構造（例えば、LNAまたはENA）によるなどして、2ヒドロキシル位置で修飾される。場合によっては、ポリ核酸分子は2'-O-メチルおよび/または2'-O-メトキシエチルリボースによって修飾される。場合によっては、ポリ核酸分子はさらに、その安定性を増大させるために、モルホリノ、PNA、HNA、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、および/または2'-フルオロN3-P5'-ホスホラミダイトを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子はキラル純粋な（あるいはステレオ純粋な）ポリ核酸分子である。いくつかの例では、キラル純粋な（あるいはステレオ純粂な）ポリ核酸分子はその安定性を増大させるために修飾されている。送達の安定性を増大させるためのRNAの適切な修飾は当業者には明らかである。

【0183】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、限定されないが、DMD、DUX4、DYSF、EMD、あるいはLMNAなどの筋ジストロフィーに関する遺伝子によってコードされたRNAの発現を調節するRNAi活性を有する。いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD、DUX4、DYSF、EMD、あるいはLMNAの少なくとも1つの発現をダウンレギュレートする二本鎖siRNA分子であり、ここで、二本鎖siRNA分子の鎖の1つは、DMD、DUX4、DYSF、EMD、あるいはLMNA、または、DMD、DUX4、DYSF、EMD、あるいはLMNAの少なくとも1つによってコードされたRNA、またはその一部の少なくとも1つのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、ここで、二本鎖siRNA分子の鎖の第2の鎖は、DMD、DUX4、DYSF、EMD、あるいはLMNAの少なくとも1つ、または、DMD、DUX4、DYSF、EMD、あるいはLMNAの少なくとも1つによってコードされたRNA、またはその一部のヌクレオチド配列に実質的に類似するヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD、DUX4、DYSF、EMD、あるいはLMNAの少なくとも1つの発現をダウンレギュレートする二本鎖siRNA分子であり、ここで、siRNA分子のそれぞれの鎖は、約15～25、18～24、あるいは19～約23のヌクレオチドを含み、および、それぞれの鎖は、別の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約14、17、ある

10

20

30

40

50

いは19のヌクレオチドを含む。場合によっては、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD、DUX4、DYSF、EMD、あるいはLMNAの少なくとも1つの発現をダウンレギュレートする二本鎖siRNA分子であり、ここで、siRNA分子のそれぞれの鎖は約19～約23のヌクレオチドを含み、および、それぞれの鎖は、別の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約19のヌクレオチドを含む。いくつかの例では、RNAi活性は細胞内で生じる。

【0184】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD遺伝子によってコードされたRNAの発現を調節するRNAi活性を有する。いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子はDMDの発現をダウンレギュレートする単鎖siRNA分子であり、ここで、単鎖siRNA分子は、DMD、または、DMDによってコードされたRNA、またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本明細書に記載されるポリ核酸分子はDMDの発現をダウンレギュレートする単鎖siRNA分子であり、ここで、siRNA分子は、約15～25、18～24、あるいは19～約23のヌクレオチドを含む。場合によっては、本明細書に記載されるポリ核酸分子はDMDの発現をダウンレギュレートする単鎖siRNA分子であり、ここで、siRNA分子は約19～約23のヌクレオチドを含む。いくつかの例では、RNAi活性は細胞内で生じる。

10

20

30

【0185】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、自己相補的なセンスおよびアンチセンス領域を含む、二本鎖ポリヌクレオチド分子であり、ここで、アンチセンス領域は、標的核酸分子またはその一部中のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。いくつかの例では、ポリ核酸分子は2つの別々のポリヌクレオチドから組み立てられ、1つの鎖はセンス鎖であり、もう一つの鎖はアンチセンス鎖であり、ここで、アンチセンス鎖とセンス鎖は自己相補的であり（例えば、それぞれの鎖は、別の鎖のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む；アンチセンス鎖とセンス鎖が二重鎖または二本鎖構造を形成する場合など）。例えば、二本鎖領域は約19、20、21、22、23、またはそれ以上の塩基対である）；アンチセンス鎖は、標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス鎖は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を含む。代替的に、ポリ核酸分子は単一のオリゴヌクレオチドから組み立てられ、ポリ核酸分子の自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域は、核酸ベースまたは非核酸ベースのリンカーによって結合される。

40

【0186】

場合によっては、ポリ核酸分子は、自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域を有する、二重の、非対称的で二重の、ヘアピン型の、または非対称的なヘアピン型の二次構造を有するポリヌクレオチドであり、ここで、アンチセンス領域は、別の標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。他の場合には、ポリ核酸分子は、2つ以上のループ構造と、自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域を含む基部とを有する、環状の単鎖ポリヌクレオチドであり、ここで、アンチセンス領域は、標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有し、環状ポリヌクレオチドは、RNAiを媒介することが可能な活性なポリ核酸分子を生成するためにインビボまたはインビトロで処理される。さらなる場合には、ポリ核酸分子はさらに、標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有する単鎖ポリヌクレオチドを含み（例えば、そのようなポリ核酸分子は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列のポリ核酸分子内に存在することを必要としない）、単鎖ポリヌ

50

クレオチドはさらに、5' - リン酸塩（例えば、Martinez et al., 2002, Cell., 110, 563 - 574と、Schwarz et al., 2002, Molecular Cell, 10, 537 - 568を参照）あるいは5', 3' - ニリン酸塩などの末端のリン酸基を含む。

【0187】

いくつかの例では、アンチセンス領域と、ヌクレオチドあるいは非ヌクレオチドを含むループ部分と、センス領域とを含む、直鎖のポリ核酸分子が非対称的であり、センス領域は、アンチセンス領域と塩基対をなすとともにループを有する二本鎖を形成するのに十分な相補的なヌクレオチドを有する程度に、アンチセンス領域よりも少ないヌクレオチドを含む。例えば、非対称的なヘアピン型のポリ核酸分子は、細胞中またはインビトロ系でRNAiを媒介するのに十分な長さを有し、かつ、および約4～約8のヌクレオチドを含むループ領域を有するアンチセンス領域（例えば約19～約22ヌクレオチド）と、アンチセンス領域に相補的な約3～約18のヌクレオチドを有するセンス領域とを含む。場合によつては、非対称的なヘアピン型のポリ核酸分子はさらに、化学修飾された5'末端のリン酸基を含む。さらなる場合には、非対称的なヘアピン型のポリ核酸分子のループ部分は、ヌクレオチド、非ヌクレオチド、リンカーモノマー、あるいは抱合体分子を含む。

10

【0188】

いくつかの実施形態において、非対称的な二重鎖は、センス領域およびアンチセンス領域を含む2つの別々の鎖を有するポリ核酸分子であり、センス領域は、アンチセンス領域と塩基対をなすのに十分な相補的なヌクレオチドを有し、かつ、二重鎖を形成する程度で、アンチセンス領域よりも少ないヌクレオチドを含む。例えば、非対称的な二重のポリ核酸分子は、細胞中またはインビトロ系でRNAiを媒介するのに十分な長さを有するアンチセンス領域（例えば約19～約22のヌクレオチド）、および、アンチセンス領域に相補的な約3～約18のヌクレオチドを有するセンス領域とを含む。

20

【0189】

場合によつては、普遍的な塩基とは、ほとんど識別されない天然のDNA/RNA塩基の各々と塩基対を形成するヌクレオチド塩基アナログを指す。普遍的な塩基の非限定的な例は、従来技術で知られているようなC-フェニル、C-ナフチル、および他の芳香族誘導体、イノシン、アゾールカルボキサミド、ならびに、3-ニトロピロール、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、および6-ニトロインドールなどのニトロアゾール誘導体を含む（例えば、Loakes, 2001, Nucleic Acids Research, 29, 2437 - 2447を参照）。

30

【0190】

ポリ核酸分子合成

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、当該技術分野で知られている手順を用いて、化学合成および/または酵素ライゲーション反応を用いて構築される。例えば、ポリ核酸分子は、自然発生のヌクレオチドを使用して、あるいは、分子の生体安定性を増大させるために、または、ポリ核酸分子と標的核酸との間で形成された二重鎖の物理安定度を増大させるために設計されたさまざまな修飾ヌクレオチドを用いて、化学合成される。例示的な方法は、米国特許第5,142,047号；第5,185,444号；第5,889,136号；第6,008,400号；および、第6,111,086号；PCT公開公報第WO2009099942号；あるいは、欧州公開公報第1579015号に記載されるものを含む。追加の例示的な方法は、以下に記載されるものを含む：Griffey et al., "2'-O-aminopropyl ribonucleotides: a zwitterionic modification that enhances the exonuclease resistance and biological activity of antisense oligonucleotides," J. Med. Chem. 39(26): 5100 - 5109 (1997)；Obika, et al. "Synthesis of 2'-O, 4'-C-methyleneuridine and

40

50

-cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3, -endo sugar puckerings". Tetrahedron Letters 38 (50): 8735 (1997); Koizumi, M. "ENA oligonucleotides as therapeutics". Current opinion in molecular therapeutics 8 (2): 144-149 (2006); and Abramova et al., "Novel oligonucleotide analogues based on morpholino nucleoside subunits-antisense technologies: new chemical possibilities," Indian Journal of Chemistry 48B: 1721-1726 (2009)。代替的に、ポリ核酸分子は、ポリ核酸分子がアンチセンス配向にサブクローニングされた発現ベクターを用いて生物学的に生成される(つまり、挿入されたポリ核酸分子の転写されたRNAは所望の標的ポリ核酸分子に対してアンチセンス配向になる)。

【0191】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はタンデム合成方法によって合成され、ここで、両方の鎖は切断リソマーによって分離された単一の隣接するオリゴヌクレオチドフラグメントあるいは鎖として合成され、これはその後切断されることで、二重鎖をハイブリダイズして二重鎖の精製を可能にする別々のフラグメントまたは鎖をもたらす。

【0192】

いくつかの例では、ポリ核酸分子も2つの特徴的な核酸鎖あるいはフラグメントから組み立てられ、ここで、1つのフラグメントはセンス領域を含み、第2のフラグメントは分子のアンチセンス領域を含む。

【0193】

例えば、糖、塩基、およびホスフェート修飾を組み込むためのさらなる修飾方法は、以下を含む: Eckstein et al., International Publication PCT No. WO 92/07065; Perrault et al. Nature, 1990, 344, 565-568; Pieken et al. Science, 1991, 253, 314-317; Usman and Cedergren, Trends in Biochem. Sci., 1992, 17, 334-339; Usman et al. International Publication PCT No. WO 93/15187; Sproat, U.S. Pat. No. 5,334,711 and Beigelman et al., 1995, J. Biol. Chem., 270, 25702; Beigelman et al., International PCT publication No. WO 97/26270; Beigelman et al., U.S. Pat. No. 5,716,824; Usman et al., U.S. Pat. No. 5,627,053; Wool et al., International PCT Publication No. WO 98/13526; Thompson et al., U.S. Ser. No. 60/082,404 which was filed on Apr. 20, 1998; Karpeisky et al., 1998, Tetrahedron Lett., 39, 1131; Earnshaw and Gait, 1998, Biopolymers (Nucleic Acid Sciences), 48, 39-55; Verma and Eckstein, 1998, Annu. Rev. Biochem., 67, 99-134;および、Burlina et al., 1997, Bioorg. Med. Chem., 5, 1999-2010. 上記公報は、触媒作用を調節することなく、核酸分子へ糖、塩基、および/またはリン酸塩修飾を取り込むための位置を決定するための方法や戦術を記載している。

10

20

30

40

50

【0194】

いくつかの例では、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、および／または5'-メチルホスホネート結合とのポリ核酸分子のヌクレオチド間結合の化学修飾が安定性を改善する一方で、過度の修飾はしばしば毒性または活性の減少を引き起こす。したがって、核酸分子を設計する場合、これらのヌクレオチド間結合の量は場合によっては最小限に抑えられる。そのような場合、これらの結合の濃度の減少は、これらの分子の毒性を低下させ、有効性と高い特異性を増加させる。

【0195】

核酸ポリペプチド抱合体

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はさらに、所望の部位へ送達されるポリペプチドAに共役される。場合によっては、ポリ核酸分子はポリペプチドAと隨意にポリマー部分に共役される。

10

【0196】

いくつかの例では、少なくとも1つのポリペプチドAは少なくとも1つのBに共役される。いくつかの例では、少なくとも1つのポリペプチドAは、A-B抱合体を形成するために少なくとも1つのBに共役される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのAは、Bの5'末端、Bの3'末端、Bの内部部位、あるいはその任意の組み合わせに共役される。いくつかの例では、少なくとも1つのポリペプチドAは少なくとも2つのBに共役される。いくつかの例では、少なくとも1つのポリペプチドAは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、あるいはそれ以上のBに共役される。

20

【0197】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つのポリペプチドAは少なくとも1つのBの1つの末端で共役し、その一方で、少なくとも1つのCは、A-B-C抱合体を形成するために少なくとも1つのBの反対側の末端で共役される。いくつかの例では、少なくとも1つのポリペプチドAは少なくとも1つのBの1つの末端で共役し、その一方で、Cの少なくとも1つは少なくとも1つのBの内部部位で共役される。いくつかの例では、少なくとも1つのポリペプチドAは少なくとも1つのCに直接共役される。いくつかの例では、少なくとも1つのBは、A-C-B抱合体を形成するために少なくとも1つのCを介して少なくとも1つのポリペプチドAに間接的に共役される。

30

【0198】

いくつかの例では、少なくとも1つのBおよび／または少なくとも1つのC、ならびに隨意に少なくとも1つのDは、少なくとも1つのポリペプチドAに共役される。いくつかの例では、少なくとも1つのBは、少なくとも1つのポリペプチドAに末端（例えば、5'末端あるいは3'末端）で共役され、あるいは少なくとも1つのポリペプチドAに内部部位を介して共役される。場合によっては、少なくとも1つのCは、少なくとも1つのポリペプチドAに直接的に、あるいは少なくとも1つのBによって間接的に共役される。間接的に、少なくとも1つのBによって、少なくとも1つのCは、B上の少なくとも1つのポリペプチドAと同じ末端で、少なくとも1つのポリペプチドAからの対抗する末端で、あるいは、独立して内部部位で共役される。いくつかの例では、少なくとも1つの追加のポリペプチドAはさらに、少なくとも1つのポリペプチドA、B、あるいはCに共役される。さらなる例では、少なくとも1つのDは隨意に、少なくとも1つのポリペプチドA、少なくとも1つのB、あるいは少なくとも1つのCに、直接的あるいは間接的に共役される。直接的に少なくとも1つのポリペプチドAに共役される場合、少なくとも1つのDもA-D-B抱合体を形成するために少なくとも1つのBに隨意に共役され、あるいは、A-D-B-C抱合体を形成するために少なくとも1つのBと少なくとも1つのCに隨意に共役される。いくつかの例では、D-A-B-C抱合体を形成するために、少なくとも1つのDは、少なくとも1つのポリペプチドAに直接的に、および少なくとも1つのBと少なくとも1つのCに間接的に共役される。間接的に少なくとも1つのポリペプチドAに共役される場合、少なくとも1つのDもA-B-D抱合体を形成するために少なくとも1つのBに隨意に共役され、あるいは、A-B-D-C抱合体を形成するために少なくとも1

40

50

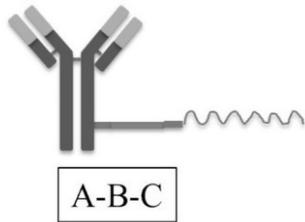
つのBと少なくとも1つのCに随意に共役される。いくつかの例では、少なくとも1つの追加のDはさらに、少なくとも1つのポリペプチドA、B、あるいはCに共役される。

【0199】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、例示されるような構築物を含む：

【0200】

【化21】



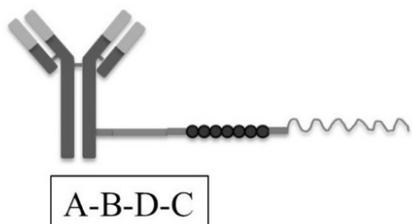
10

【0201】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、例示されるのような構築物を含む：

【0202】

【化22】



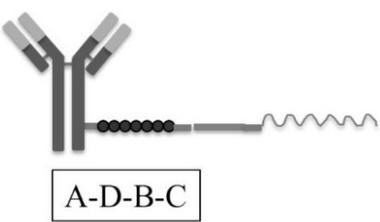
20

【0203】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、例示されるのような構築物を含む：

【0204】

【化23】



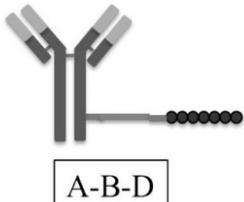
30

【0205】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、例示されるのような構築物を含む：

【0206】

【化24】



40

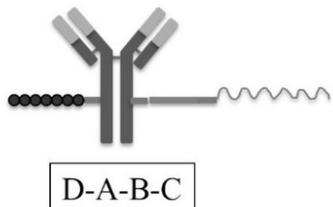
50

【0207】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、例示されるような構築物を含む：

【0208】

【化25】



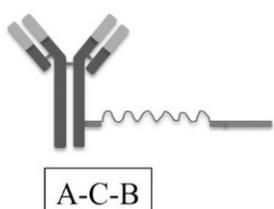
10

【0209】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、例示されるような構築物を含む：

【0210】

【化26】



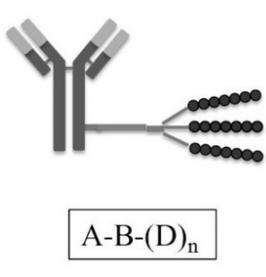
20

【0211】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、例示されるのような構築物を含む：

【0212】

【化27】



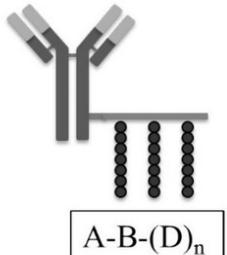
30

【0213】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、例示されるような構築物を含む：

【0214】

【化28】



40

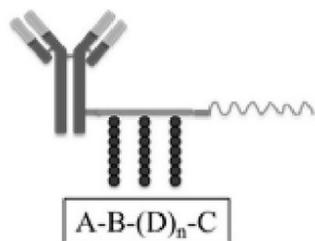
50

【0 2 1 5】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、例示されるような構築物を含む：

【0 2 1 6】

【化 2 9】



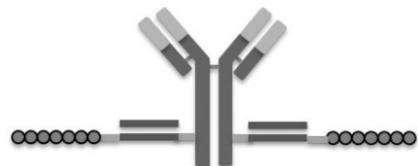
10

【0 2 1 7】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、例示されるのような構築物を含む：

【0 2 1 8】

【化 3 0】



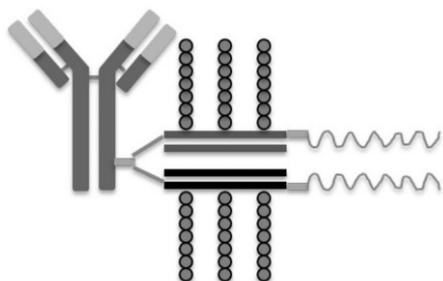
20

【0 2 1 9】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、例示されるのような構築物を含む：

【0 2 2 0】

【化 3 1】



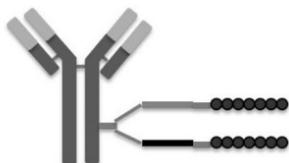
30

【0 2 2 1】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、例示されるのような構築物を含む：

【0 2 2 2】

【化 3 2】



40

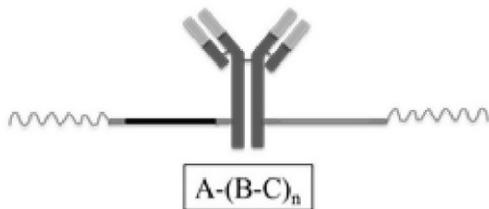
【0 2 2 3】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、例示されるのような構築物を含む：

【0 2 2 4】

50

【化33】



【0225】

【化34】

10



20

は、例示目的のために過ぎず、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価 F_{a b'}、二価 F_{a b₂}、一本鎖可変フラグメント (s c F v) 、ダイアボディ、ミニボディ (m i n i b o d y) 、ナノボディ、単ードメイン抗体 (s d A b) 、あるいは、ラクダ抗体またはその結合フラグメントを包含する。

【0226】

結合部分

いくつかの実施形態において、結合部分 A はポリペプチドである。いくつかの例では、ポリペプチドは、抗体またはそのフラグメントである。場合によっては、フラグメントは結合フラグメントである。いくつかの例では、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、マウス抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価 F_{a b'}、二価 F_{a b₂}、F (a b) ' ₃ フラグメント、単鎖可変フラグメント (s c F v) 、ビス - s c F v (s c F v) ₂ 、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、三重特異性抗体、四重特異性抗体、ジスルフィド安定化 F v タンパク質 (d s F v) 、単ードメイン抗体 (s d A b) 、I g N A R 、ラクダ科抗体またはその結合フラグメント、二重特異性抗体またはその結合フラグメント、あるいはその化学修飾された誘導体を含む。

30

【0227】

いくつかの例では、A は抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、A は、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、マウス抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価 F_{a b'}、二価 F_{a b₂}、F (a b) ' ₃ フラグメント、単鎖可変フラグメント (s c F v) 、ビス - s c F v (s c F v) ₂ 、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、三重特異性抗体、四重特異性抗体、ジスルフィド安定化 F v タンパク質 (d s F v) 、単ードメイン抗体 (s d A b) 、I g N A R 、ラクダ科抗体またはその結合フラグメント、二重特異性抗体またはその結合フラグメント、あるいはその化学修飾された誘導体である。いくつかの例では、A はヒト化抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、A はマウス抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、A はキメラ抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、A はモノクローナル抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、A は一価 F_{a b'} である。いくつかの例では、A は二価 F_{a b₂} である。いくつかの例では、A は単鎖可変フラグメント (s c F v) である。

40

【0228】

いくつかの実施形態では、結合部分 A は、二重特異性抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、二重特異性抗体は三機能性抗体あるいは二重特異性ミニ抗体

50

である。場合によっては、二重特異性抗体は三機能性抗体である。いくつかの例では、三機能性抗体は、2つの異なる抗原のための結合部位を含む完全長のモノクローナル抗体である。

【0229】

場合によっては、二重特異性抗体は二重特異性ミニ抗体である。いくつかの例では、二重特異性ミニ抗体は、二価 F_{a b}₂、F(a b)_{’3} フラグメント、ビス - s c F v (s c F v)₂、ダイアボディ、ミニボディ、三重特異性抗体、四重特異性抗体、あるいは二重特異性 T 細胞エンゲージャー (BiTE) を含む。いくつかの実施形態において、二重特異性 T 細胞エンゲージャーは、2つの s c F v s が2つの異なる抗原のエピトープを標的とする2つの単鎖可変フラグメント (s c F v s) を含む融合タンパク質である。

10

【0230】

いくつかの実施形態において、結合部分 A は二重特異性ミニ抗体である。いくつかの例では、A は二重特異性 F_{a b}₂ である。いくつかの例では、A は二重特異性 F(a b)_{’3} フラグメントである。場合によっては、A は二重特異性ビス - s c F v である。場合によっては、A は二重特異性 (s c F v) であるいくつかの実施形態では、A は二重特異性ダイアボディである。いくつかの実施形態では、A は二重特異性ミニボディである。いくつかの実施形態では、A は二重特異性の三重特異性抗体である。他の実施形態では、A は二重特異性の四重特異性抗体である。他の実施形態では、A は二重特異性の T 細胞エンゲージャー (BiTE) である。

20

【0231】

いくつかの実施形態において、結合部分 A は三重特異性抗体である。いくつかの例では、三重特異性抗体は F(a b)_{’3} フラグメントあるいは三重特異性抗体を含む。いくつかの例では、A は三重特異性 F(a b)_{’3} フラグメントである。場合によっては、A は三重特異性抗体である。いくつかの実施形態において、A は、Dimas, et al.、“Development of a trispecific antibody designed to simultaneously and efficiently target three different antigens on tumor cells,” Mol. Pharmaceutics, 12(9): 3490-3501 (2015) に記載されるような三重特異性抗体である。

30

【0232】

いくつかの実施形態において、結合部分 A は、細胞表面タンパク質を認識する抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、結合部分 A は、筋細胞上の細胞表面タンパク質を認識する抗体またはその結合フラグメントである。抗体またはその結合フラグメントによって認識される例示的な細胞表面タンパク質は、限定されないが、Sca-1、CD34、Myo-D、ミオゲニン、MRF4、NCAM、CD43、およびCD95 (Fas) を含む。

【0233】

いくつかの例では、細胞表面タンパク質は、分化 (CD) 細胞表面マーカーのクラスターを含む。例示的な CD 細胞表面マーカーは限定されないが、CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD15s、CD16、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD45RO、CD45RA、CD45RB、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CDw60、CD61、CD62E、CD62L (L - セレクチン)、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD79

40

50

(例えば、CD79a、CD79b)、CD90、CD95 (Fas)、CD103、CD104、CD125 (IL5RA)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD152 (CTLA-4)、CD221、CD274、CD279 (PD-1)、CD319 (SLAMF7)、CD326 (EpCAM)などを含む。

【0234】

いくつかの例では、結合部分Aは、CD細胞表面マーカーを認識する、抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、結合部分Aは、CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD15s、CD16、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD45RO、CD45RA、CD45RB、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CDw60、CD61、CD62E、CD62L (L-セレクチン)、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD79 (例えば、CD79a、CD79b)、CD90、CD95 (Fas)、CD103、CD104、CD125 (IL5RA)、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD152 (CTLA-4)、CD221、CD274、CD279 (PD-1)、CD319 (SLAMF7)、CD326 (EpCAM)、またはこれらの組み合わせを認識する、抗体またはその結合フラグメントである。

【0235】

いくつかの実施形態において、結合部分Aは、抗ミオシン抗体、抗トランスフェリン抗体、および、筋特異的キナーゼ (MuSK) を認識する抗体である。

【0236】

いくつかの例では、結合部分Aは抗ミオシン抗体である。場合によっては、抗ミオシン抗体はヒト化抗体である。他の場合では、抗ミオシン抗体はキメラ抗体である。さらなる場合には、抗ミオシン抗体は、一価、二価、あるいは多価の抗体である。

【0237】

いくつかの例では、結合部分Aは抗トランスフェリン (抗CD71) 抗体である。場合によっては、抗トランスフェリン抗体はヒト化抗体である。他の場合には、抗トランスフェリン抗体はキメラ抗体である。さらなる場合には、抗トランスフェリン抗体は、一価、二価、あるいは多価の抗体である。いくつかの実施形態において、例示的な抗トランスフェリン抗体は、R&D SystemsのMAB5746、Bio-Rad LaboratoriesのAHP858、Bethyl Laboratories, Inc. のA80-128A、およびMilliporeSigmaのT2027を含む。

【0238】

いくつかの例では、結合部分AはMuSKを認識する抗体である。場合によっては、抗MuSK抗体はヒト化抗体である。他の場合には、抗MuSK抗体はキメラ抗体である。さらなる場合には、抗MuSK抗体は、一価、二価、あるいは多価の抗体である。

【0239】

いくつかの実施形態において、結合部分Aは、ポリ核酸分子 (B) に非特異的に共役される。いくつかの例では、結合部分Aは、非部位特異的なやり方で、リシン残基またはシステイン残基を介してポリ核酸分子 (B) に共役される。いくつかの例では、結合部分Aは、非部位特異的なやり方で、リシン残基を介してポリ核酸分子 (B) に共役される。場合によっては、結合部分Aは、非部位特異的なやり方で、システイン残基を介してポリ核酸分子 (B) に共役される。

10

20

30

40

50

【0240】

いくつかの実施形態において、結合部分Aは、非部位特異的なやり方で、ポリ核酸分子(B)に共役される。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で、リシン残基、システイン残基を介して、5'-末端で、3'-末端で、非天然アミノ酸、あるいは酵素修飾または酵素触媒された残留物で、ポリ核酸分子(B)に共役される。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で、リシン残基を介してポリ核酸分子(B)に共役される。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で、システイン残基を介してポリ核酸分子(B)に共役される。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で、5'末端でポリ核酸分子(B)に共役される。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で、3'末端でポリ核酸分子(B)に共役される。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で、非天然アミノ酸を介してポリ核酸分子(B)に共役される。いくつかの例では、結合部分Aは、部位特異的なやり方で酵素修飾または酵素触媒された残留物を介してポリ核酸分子(B)に共役される。

【0241】

いくつかの実施形態において、1つ以上のポリ核酸分子(B)は結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、またはそれ以上のポリ核酸分子は、1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約1のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約2のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約3のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約4のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約5のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約6のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約7のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約8のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約9のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約10のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約11のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約12のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約13のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約14のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約15のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。いくつかの例では、約16のポリ核酸分子が1つの結合部分Aに共役される。場合によっては、1つ以上のポリ核酸分子が同じである。他の例では、1つ以上のポリ核酸分子が異なる。

【0242】

いくつかの実施形態において、結合部分Aに共役したポリ核酸分子(B)の数は、ある比率を形成する。いくつかの例では、比率はDAR(薬物対抗体の)比率と呼ばれ、本明細書で言及されるような薬物はポリ核酸分子(B)である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、またはそれ以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約1以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約2以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約3以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約4以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約5以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約6以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約7以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約8以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約9以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約10以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約11以上である。

10

20

30

40

50

するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約11以上である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約12以上である。

【0243】

いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約1である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約2である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約3である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約4である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約5である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約6である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約7である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約8である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約9である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約10である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約11である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約12である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約13である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約14である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約15である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、約16である。

10

20

30

40

50

【0244】

いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、1である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、2である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、4である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、6である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、8である。いくつかの例では、結合部分Aに対するポリ核酸分子(B)のDAR比率は、12である。

【0245】

いくつかの例では、結合部分Aを伴わないポリ核酸分子(B)を含む抱合体と比較して、ポリ核酸分子(B)と結合部分Aを含む抱合体は、活性を改善させた。いくつかの例では、改善された活性は、生物学的に関連する機能の増強、例えば、疾患状態の処置または予防における安定性、親和性、結合、機能的な活性、および有効性の改善をもたらす。いくつかの例では、疾患状態は、遺伝子の1つ以上の突然変異エクソンの結果である。いくつかの例では、結合部分Aを伴わないポリ核酸分子(B)を含む抱合体と比較して、ポリ核酸分子(B)と結合部分Aを含む抱合体は、1つ以上の突然変異したエクソンのエクソンスキッピングの増加をもたらす。いくつかの例では、結合部分Aを伴わないポリ核酸分子(B)を含む抱合体と比較して、エクソンスキッピングは、ポリ核酸分子(B)と結合部分Aを含む抱合体において、少なくともまたは約5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、あるいは、95%以上増加する。

【0246】

いくつかの実施形態において、抗体またはその結合フラグメントは、単独であるいは組み合わせて、当該技術分野で知られている従来の技術を使用して、例えば、アミノ酸の欠失、挿入、置換、追加を用いることによって、および/または、組換え、ならびに/あるいは、当該技術分野で知られている他の修飾(例えば、グリコシル化とリン酸化などの翻

訳後および化学的な修飾)によって、さらに修飾される。いくつかの例では、修飾は、Fc受容体との相互作用を調節するための修飾をさらに含む。いくつかの例では、1つ以上の修飾は、例えば、国際公開第WO97/34631に記載されるものを含み、当該文献はFcドメインとFcRn受容体との間の相互作用に関するアミノ酸残基を開示している。抗体またはその結合フラグメントのアミノ酸配列の基礎となる核酸配列にそのような修飾を導入する方法は、当業者に周知である。

【0247】

いくつかの例では、抗体結合フラグメントはさらにその誘導体を包含し、少なくとも1つのCDRを含むポリペプチド配列を含んでいる。

【0248】

いくつかの例では、本明細書に記載されるような「単鎖」との用語は、二重特異性の単鎖構築物の第1と第2のドメインが、好ましくは、单一核酸分子によってコードすることができる共線形アミノ酸配列の形態で共有結合されるということを意味する。

【0249】

いくつかの例では、二重特異性単鎖抗体構築物は、2つの抗体由来の結合ドメインを含む構築物に関する。そのような実施形態では、二重特異性の単鎖抗体構築物はタンデム $b_1 - s_c F_v$ あるいはダイアボディである。いくつかの例では、 $s_c F_v$ は、リンカーペプチドによって接続されたVHとVLのドメインを含む。いくつかの例では、リンカーは、第1と第2のドメインのそれぞれが、互いから独立して、その差次的な結合特異性を保持することができる十分な長さと配列である。

【0250】

いくつかの実施形態において、本明細書で使用されるように、~との結合または~による相互作用とは、互いに少なくとも2つの抗原相互作用部位の結合/相互作用を定義する。いくつかの例では、抗原相互作用部位は、特異性抗原または抗原の特異的な群との特定の相互作用の能力を示すポリペプチドのモチーフを定義する。場合によっては、結合/相互作用は特定の認識を定義するとも理解される。そのような場合、特定の認識は、抗体あるいはその結合フラグメントが、標的分子の各々の少なくとも2つのアミノ酸に特異的に相互作用および/または結合することができるということを指す。例えば、特定の認識は、抗体分子の特異性、あるいは標的分子の特定の範囲を区別するその能力に関する。追加の例では、抗原相互作用部位のその特異性抗原との特定の相互作用は、例えば、抗原の立体配座の変化、抗原のオリゴマー化などの誘導による、シグナルの開始をもたらす。さらなる実施形態では、結合は「鍵と鍵穴の原則(key-lock-principle)」の特異性によって例証される。したがって、いくつかの例では、抗原相互作用部位および抗原のアミノ酸配列における特定のモチーフは、上記構造の第2の修飾の結果と同様に、その1次、2次、または3次構造の結果として互いに結合する。そのような場合、抗原相互作用部位のその特異性抗原との特定の相互作用は、その部位の抗原への簡単な結合をもたらす。

【0251】

いくつかの例では、特異的な相互作用はさらに、抗体またはその結合フラグメントの減少した交差反応性、あるいは減少したオフターゲット効果を指す。例えば、所望のポリペプチド/タンパク質に結合するが、他のポリペプチドのいずれにも本質的には結合しない抗体あるいはその結合フラグメントは、所望のポリペプチド/タンパク質に対して特異的であるとみなされる。抗原相互作用部位の特異性抗原との特定の相互作用の例は、リガンドのその受容体との特異性、例えば、抗原決定基群(エピトープ)の、抗体の抗原結合部位との相互作用を含む。

【0252】

追加の結合部分

いくつかの実施形態において、結合部分は血漿タンパク質である。いくつかの例では、血漿タンパク質はアルブミンを含む。いくつかの例では、結合部分Aはアルブミンである。いくつかの例では、アルブミンは、本明細書に記載される結合化学の1つ以上によって

10

20

30

40

50

、ポリ核酸分子に結合される。いくつかの例では、アルブミンは、天然のライゲーション化学によってポリ核酸分子に結合される。いくつかの例では、アルブミンは、リジン結合によってポリ核酸分子に結合される。

【0253】

いくつかの例では、結合部分はステロイドである。例示的なステロイドは、コレステロール、リン脂質、ジアシルグリセロールおよびトリアシルグリセロール、脂肪酸、炭化水素（飽和、不飽和であり、置換を含む）、あるいはそれらの組み合わせである。いくつかの例では、ステロイドはコレステロールである。いくつかの例では、結合部分はコレステロールである。いくつかの例では、コレステロールは、本明細書に記載される結合化学の1つ以上によってポリ核酸分子に結合される。いくつかの例では、コレステロールは、天然のライゲーション化学によってポリ核酸分子に結合される。いくつかの例では、コレステロールは、リジン結合によってポリ核酸分子に結合される。

10

【0254】

いくつかの例では、結合部分は、限定されないが、細胞上の特定の表面マーカーに結合するポリ核酸分子アプタマーを含むポリマーである。この例では、結合部分は、標的遺伝子またはmRNAにハイブリダイズしないが、その代りに、細胞表面マーカーのその特定のエピトープに結合する抗体と同様に、細胞表面マーカーに選択的に結合することができるポリ核酸である。

【0255】

場合によっては、結合部分はペプチドである。場合によっては、ペプチドは約1～約3kDaを含む。場合によっては、ペプチドは、約1.2～約2.8kDa、約1.5～約2.5kDa、あるいは約1.5～約2kDaを含む。幾つかの例では、ペプチドは二環式ペプチドである。場合によっては、二環式ペプチドはコンストレインド二環式ペプチド(*constrained bicyclic peptide*)である。いくつかの例では、ペプチド部分は二環式ペプチド(例えば、*Bicycle Therapeutics*の**bicycles**)である。

20

【0256】

さらなる場合では、結合部分は小分子である。いくつかの例では、小分子は抗体動員小分子(*antibody-recruiting small molecule*)である。場合によっては、抗体動員小分子は、標的結合末端および抗体結合末端を含み、標的結合末端はそれで細胞表面受容体を認識して、相互作用することができる。例えば、いくつかの例では、グルタミン酸塩尿素(*glutamate urea*)化合物を含む標的結合末端は、PSMAとの相互作用を可能にし、それにより、PSMAを発現する細胞との抗体相互作用を増強する。いくつかの例では、結合部分は、Zhang et al., “A remote arene-binding site on prostate specific membrane antigen revealed by antibody-recruiting small molecules,” *J Am Chem Soc.* 132(36): 12711-12716 (2010)；あるいは、McEnaney, et al., “Antibody-recruiting molecules: an emerging paradigm for engaging immune function in treating human disease,” *ACS Chem Biol.* 7(7): 1139-1151 (2012)に記載される小分子である。

30

【0257】

結合化学

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは結合部分に結合される。いくつかの例では、結合部分は、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、抗原、毒素、ホルモン、脂質、ヌクレオチド、ヌクレオシド、糖類、炭水化物、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールなどのポリマー、ならびに、これらのクラスの物質のすべてのアナログあるいは誘導体を含む。結合部分の追加の例はさらに、コレステロール、

40

50

リン脂質、ジアシルグリセロールおよびトリアシルグリセロール、脂肪酸、炭化水素（例えば、飽和、不飽和、または、置換を含む）、酵素基質、ビオチン、ジゴキシゲニン、および多糖類などのステロイドを含む。いくつかの例では、結合部分は、抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、ポリ核酸分子はさらにポリマーに結合され、随意にエンドソーム溶解性部分に結合される。

【0258】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、化学的なライゲーションプロセスによって結合部分に結合される。いくつかの例では、ポリ核酸分子は天然のライゲーションによって結合部分に結合される。いくつかの例において、結合は以下に記載される通りである：Dawson, et al. “Synthesis of proteins by native chemical ligation,” Science 1994, 266, 776-779; Dawson, et al. “Modulation of Reactivity in Native Chemical Ligation through the Use of Thiol Additives,” J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 4325-4329; Hackeng, et al. “Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology,” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 10068-10073；あるいは、Wu, et al. “Building complex glycopeptides: Development of a cysteine-free native chemical ligation protocol,” Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 4116-4125。いくつかの例では、結合は米国特許第8,936,910号に記載されるとおりである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、天然のライゲーション化学を介して、結合部分に部位特異的あるいは非特異的に結合される。

【0259】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、「トレースレス(traceless)」カップリング技術(Philochem)を利用する部位指定的な方法によって結合部分に結合される。いくつかの例では、「トレースレス」カップリング技術は、アルデヒド基を含むポリ核酸分子とその後結合される結合部分のN末端1,2-アミノチオール基を利用する。(see Casi et al., “Site-specific traceless coupling of potent cytotoxic drugs to recombinant antibodies for pharmacodelivery,” JACS 134(13): 5887-5892 (2012)を参照)

【0260】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、結合部分に組み込まれた非天然のアミノ酸を利用する部位指定的な方法によって結合部分に結合される。いくつかの例では、非天然アミノ酸はp-アセチルフェニルアラニン(pAcPhe)を含む。いくつかの例では、pAcPheのケト基は、オキシム結合を形成するために、アルコキシ-アミン由来の結合部分に選択的に結合される。(Axup et al., “Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids,” PNAS 109(40): 16101-16106 (2012))を参照)。

【0261】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、酵素触媒プロセスを利用する部位指定的な方法によって結合部分に結合される。いくつかの例では、部位指定的な方法はSMARTag(商標)技術(Redwood)を利用する。いくつかの例では、SMARTag(商標)技術は、アルデヒドタグの存在下での酸化プロセスを介するホルミルグリシン生成酵素(

FGE)によるシステインからのホルミルグリシン(FGly)残留物の生成、および、ヒドラジノ-Pictet-Spengler(HIPS)ライゲーションを介するアルキルヒドラジン機能化ポリ核酸分子へのFGlyのその後の結合を含む。(Wu et al., "Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using the genetically encoded aldehyde tag," PNAS 106(9): 3000-3005 (2009); Agarwal, et al., "A Pictet-Spengler ligation for protein chemical modification," PNAS 110(1): 46-51 (2013)を参照) 10

【0262】

いくつかの例では、酵素触媒プロセスは、微生物トランスクルタミナーゼ(mTG)を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、微生物トランスクルタミナーゼ触媒プロセスを用いて結合部分に結合される。いくつかの例では、mTGは、認識配列内のグルタミンのアミド側鎖と機能化されたポリ核酸分子の一級アミンとの間の共有結合の形成を触媒する。いくつかの例では、mTGはストレプトマイセス・モバラエンシス(*Streptomyces mobarensis*)から產生される。(Strop et al., "Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates," Chemistry and Biology 20(2): 161-167 (2013)を参照) 20

【0263】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、配列に特異的なトランスペプチダーゼを利用する、PCT公開公報第WO2014/140317号に記載される方法によって結合部分に結合される。

【0264】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、米国特許公報第2015/0105539号および第2015/0105540号に記載される方法によって結合部分に結合される。

【0265】

抗体あるいはその結合フラグメントの產生

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリペプチド(例えば、抗体との結合フラグメント)は、ポリペプチド(例えば抗体)の合成に有用な当該技術分野で知られている任意の方法を使用して、特に化学合成によって、あるいは組換え発現によって生成され、および、好ましくは組換え体発現技術によって生成される。

【0266】

いくつかの例では、抗体あるいはその結合フラグメントは組み換えて発現され、および、抗体またはその結合フラグメントをコードする核酸は、化学的に合成されたオリゴヌクレオチド(例えば、Kutmeier et al., 1994, *BioTechniques* 17: 242に記載される)から組み立てられ、それは、抗体をコードする配列の部分を含有するオリゴヌクレオチドをオーバーラップする合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよびライゲーション、その後の、ライゲートされたオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅に關与する。 40

【0267】

代替的に、抗体をコードする核酸分子は、配列の3' と 5' の末端へハイブリダイズすることができる合成プライマーを使用するPCR増幅によって、あるいは特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用してクローニングを作ることによって、適切なソース(例えば、抗体cDNAライブラリ、あるいは免疫グロブリンを発現する任意の組織あるいは細胞から生成されたcDNAライブラリ)から隨意に生成される。

【0268】

10

20

30

40

50

いくつかの例では、抗体またはその結合は、ポリクローナル抗体を生成するためにウサギなどの動物を免疫化することにより、あるいは、より好ましくは、例えば Kohler and Milstein (1975, Nature 256: 495 - 497) によって記載される、あるいは、Kozbor et al. (1983, Immunology Today 4: 72) または Cole et al. (1985 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96) によって記載されるようなモノクローナル抗体を生成することによって、随意に生成される。代替的に、少なくとも抗体の Fab 部分をコードするクローニングは、特異性抗原に結合する Fab フラグメントのクローニングのために Fab 発現ライプラリ (例えば、Huse et al . , 1989 , Science 246 : 1275 - 1281 に記載される) をスクリーニングすることにより、あるいは抗体ライプラリ (Clackson et al . , 1991 , Nature 352 : 624 ; Hane et al . , 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 4937 を参照) をスクリーニングすることにより、随意に得られる。

10

20

30

40

50

【0269】

いくつかの実施形態において、適切な生物学的活性のヒト抗体分子の遺伝子と一緒に、適切な抗原特異性のマウス抗体分子からの遺伝子をスプライシングすることにより、「キメラ抗体」 (Morrison et al . , 1984 , Proc. Natl. Acad. Sci. 81 : 851 - 855 ; Neuberger et al . , 1984 , Nature 312 : 604 - 608 ; Takeda et al . , 1985 , Nature 314 : 452 - 454) を生成するために開発された技術が使用される。キメラ抗体は、異なる部分が、マウスのモノクローナル抗体に由来する可変領域、およびヒト免疫グロブリン定常領域 (例えば、ヒト化抗体) を有する動物種などの様々な動物種に由来する分子である。

【0270】

いくつかの実施形態において、単鎖抗体 (米国特許第 4,694,778 号 ; Bird , 1988 , Science 242 : 423 - 42 ; Huston et al . , 1988 , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 5879 - 5883 ; および Ward et al . , 1989 , Nature 334 : 544 - 54) の生成のために記載される技術は、単鎖抗体を生成するのに適している。単鎖抗体は、アミノ酸ブリッジによって Fv 領域の重鎖または軽鎖のフラグメントを結合することによって形成され、結果として単鎖ポリペプチドを生じさせる。大腸菌中の機能的な Fv フラグメントの組み立てのための技術も随意に使用される (Skerra et al . , 1988 , Science 242 : 1038 - 1041) 。

【0271】

いくつかの実施形態において、抗体のヌクレオチド配列を含む発現ベクターあるいは抗体のヌクレオチド配列は、従来の技術 (例えば、エレクトロポレーション、リポソームトランスフェクション、およびリン酸カルシウム沈澱反応) によって宿主細胞に導入され、その後、トランスフェクトされた細胞は、抗体を生成するために従来の技術によって培養される。特定の実施形態では、抗体の発現は、構成的、誘導可能、あるいは組織特異的なプロモーターによって調節される。

【0272】

いくつかの実施形態において、様々な宿主発現ベクター系は、本明細書に記載される抗体またはその結合フラグメントを発現するために利用される。そのような宿主発現系は、抗体のコード配列が生成され、その後精製されるビヒクルを表すだけでなく、適切なヌクレオチドコード配列で変形されるか、あるいはトランスフェクトされるときに、抗体またはその結合フラグメントをインサイチュで発現する細胞も表す。これらは、限定されないが、組み換え体バクテリオファージ DNA 、プラスミド DNA 、あるいは抗体またはその結合フラグメントコード配列を含むコスミド DNA 発現ベクターで形質転換された細菌 (

例えば、大腸菌と枯草菌)などの微生物;抗体あるいはその結合フラグメントコード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、サッカロミケス・ピキア);抗体あるいはその結合フラグメントコード配列を含む組替えウイルス発現ベクターに感染した昆虫細胞系(例えばバキュロウィルス);組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)およびタバコモザイクウイルス(TMV))に感染した、または、抗体あるいはその結合フラグメントコード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞系;あるいは、哺乳動物細胞(例えば、メタロチオネイン・プロモーター)のゲノム、あるいは、哺乳動物ウイルス(例えば、アデノウイルス後期プロモーター;ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)に由来するプロモーターを含む、組換え発現構築物を保護する哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BH、293、293T、3T3細胞)を含む。

10

【0273】

組換え型タンパク質の長期的かつ高収率の生成のためには、安定した発現が好ましい。いくつかの例では、安定して抗体を発現する細胞株が随意に操作される。ウイルスの複製開始点を含む発現ベクターを使用するのではなく、宿主細胞は、適切な発現制御要素(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)および選択可能なマーカーによって制御されたDNAで形質転換される。外来性DNAの導入後に、細胞を操作して栄養強化培地で1-2日間成長させ、その後、選択培地に切り替える。組換えプラスミドにおける選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を与え、細胞が、プラスミドをその染色体に安定的に統合させ、成長し、クローン化されて細胞株へと拡張するフォーカスを形成するのを可能にする。この方法は、抗体またはその結合フラグメントを発現する細胞株を操作するために有利に使用することができる。

20

【0274】

いくつかの例では、限定されないが、それぞれtk細胞、hprt細胞、あるいはaprt細胞で採用される単純疱疹ウイルス・チミジンキナーゼ(Wigler et al., 1977, Cell 11:223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski, 192, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy et al., 1980, Cell 22:817)遺伝子を含む、多くの選択系が使用される。同様に、代謝拮抗薬の耐性は、以下の遺伝子の選定基準として使用される:メトトレキサートに対する耐性を与えるdhfr(Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527);ミコフェノール酸に対する耐性を与えるgpt(Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072);アミノグリコシドG-418に対する耐性を与えるneo(Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932;およびMorgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215)、ならびに、ヒグロマイシンに対する耐性を与えるhygro(Santerre et al., 1984, Gene 30:147)。使用可能な組換えDNA技術の当該技術分野で知られている既知の方法は一般に、Ausubel et al. (eds., 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press

30

40

50

, N Y ; and in Chapters 12 and 13, Dracopo
li et al. (eds), 1994, Current Protocols
in Human Genetics, John Wiley & Sons, N
Y. ; Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mo
l. Biol. 150: 1)に記載される。

【0275】

いくつかの例では、抗体の発現レベルはベクター増幅によって増大する(レビューのために、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987を参照)。抗体を発現するベクター系におけるマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞の培養物中に存在する阻害剤のレベルが増大すると、標識遺伝子のコピーの数が増大する。増幅した領域が抗体のヌクレオチド配列に関連しているため、抗体の産生も増加する(Crouse et al., 1983, Mol. Cell Biol. 3: 257)。

【0276】

いくつかの例では、抗体または抗体抱合体の精製あるいは分析のための当該技術分野で既知の任意の方法が使用され、例えば、クロマトグラフィー(例えは、イオン交換、親和性、とりわけ、プロテインAの後の特異性抗原への親和性、および、サイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、差次の溶解性、あるいはタンパク質の精製のための他の標準的な技術による方法が使用される。例示的なクロマトグラフィー方法としては、限定されないが、強力な陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、および高速タンパク質液体クロマトグラフィーが挙げられる。

【0277】

ポリマー結合部分

いくつかの実施形態において、ポリマー部分Cは、本明細書に記載されるポリ核酸分子、本明細書に記載される結合部分、あるいはこれらの組み合わせにさらに結合される。いくつかの例では、ポリマー部分Cはポリ核酸分子に結合される。場合によっては、ポリマー部分Cは結合部分に結合される。他の場合には、ポリマー部分Cはポリ核酸分子結合部分分子に結合される。さらなる場合には、ポリマー部分Cは上で例証されるように結合される。

【0278】

いくつかの例では、ポリマー部分Cは分枝したあるいは分枝していない単量体、および/または、二次元または三次元の単量体の架橋したネットワークの長鎖からなる、天然または合成のポリマーである。いくつかの例では、ポリマー部分Cは多糖、リグニン、ゴム、あるいはポリアルキルエンオキシド(例えは、ポリエチレングリコール)を含む。いくつかの例では、少なくとも1つのポリマー部分Cとしては、限定されないが、アルファ-ジヒドロキシルポリエチレングリコール、オメガ-ジヒドロキシルポリエチレングリコール、生物分解性ラクトンベースのポリマー、例えは、ポリアクリル酸、ポリラクチド酸(PLA)、ポリ(グリコール酸)(PGA)、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリシアノアクリレート、ポリイミド、ポリエチレンテレフタレート(PET、PETG)、ポリエチレン・テレフタレート(PETE)、ポリテトラメチレン・グリコール(PTG)、あるいはポリウレタン、およびこれらの混合物が挙げられる。本明細書で使用されるように、混合物は、ブロックコポリマーに関連する場合と同様に、同じ化合物内の様々なポリマーの使用を指す。場合によっては、ブロックコポリマーは、ポリマーの少なくとも1つの部分が別のポリマーの単量体から構築されるポリマーである。いくつかの例では、ポリマー部分Cはポリアルキレンオキシドを含む。いくつかの例では、ポリマー部分CはPEGを含む。いくつかの例では、ポリマー部分Cはポリエチ

レン・イミド(P E I)またはヒドロキシエチルデンプン(H E S)を含む。

【 0 2 7 9 】

いくつかの例では、CはPEG部分である。いくつかの例では、PEG部分はポリ核酸分子の5'末端で結合されるが、結合部分はポリ核酸分子の3'末端で結合される。いくつかの例では、PEG部分はポリ核酸分子の3'末端で結合されるが、結合部分はポリ核酸分子の5'末端で結合される。いくつかの例では、PEG部分はポリ核酸分子の内部部位に結合される。いくつかの例では、PEG部分、結合部分、あるいはその組み合わせは、ポリ核酸分子の内部部位に結合される。いくつかの例において、抱合体は直接抱合体である。いくつかの例では、結合は天然のライゲーションを介する。

【 0 2 8 0 】

いくつかの実施形態において、ポリアルキレンオキシド(例えば、PEG)は多分散または单分散の化合物である。いくつかの例では、多分散材料は、平均重量(重量平均)サイズおよび分散度を特徴とする、異なる分子量の材料の分散した分布を含む。いくつかの例では、单分散のPEGは1つのサイズの分子を含む。いくつかの実施形態において、Cは多分散または单分散のポリアルキレンオキシド(例えば、PEG)であり、示された分子量は、ポリアルキレンオキシド(例えば、PEG)分子の分子量の平均を表す。

【 0 2 8 1 】

いくつかの実施形態において、ポリアルキレンオキシド(例えば、PEG)の分子量は、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、あるいは100,000Daである。

【 0 2 8 2 】

いくつかの実施形態において、Cはポリアルキレンオキシド(例えば、PEG)であり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、あるいは100,000Daの分子量を有する。いくつかの実施形態において、CはPEGであり、約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、あるいは100,000Daの分子量を有する。いくつかの例では、Cの分子量は約200Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約300Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約400Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約600Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約700Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約800Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1100Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約

10

20

30

40

50

1200Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1300Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1400Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1450Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1600Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1700Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1800Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2100Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2200Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2300Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2400Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2600Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2700Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2800Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約2900Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約3000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約3250Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約3350Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約3500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約3750Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約4000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約4250Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約4500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約4600Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約5000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約5500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約6000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約6500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約7500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約8000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約10,000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約12,000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約20,000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約35,000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約40,000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約50,000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約60,000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約100,000Daである。

【0283】

いくつかの実施形態において、ポリアルキレンオキシド（例えば、PEG）は、分散PEGであり、分散PEGは、1以上の反復エチレンオキサイド単位を含む高分子PEGである。いくつかの例では、分散PEG（dPEG）は、2～60、2～50、あるいは2～48の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、35、40、42、48、50、またはそれ以上を含む。いくつかの例では、dPEGは約2以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約3以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約4以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約5以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約6以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約7以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約8以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約9以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約10以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約11以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約12以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約13以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約14以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約15以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、dPEGは約16以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例

10

20

30

40

50

では、d P E G は約 1 7 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は約 1 8 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は約 1 9 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は約 2 0 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は約 2 2 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は約 2 4 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は約 2 6 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は約 2 8 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は約 3 0 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は約 3 5 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は約 4 0 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は約 4 2 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は約 4 8 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。いくつかの例では、d P E G は約 5 0 以上の反復エチレンオキサイド単位を含む。場合によっては、d P E G は、純粋な（例えば、約 9 5 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 9 9 . 5 %）出発物質から単一の分子量化合物として段階的に合成される。場合によっては、d P E G は平均分子量ではなく、特定の分子量を有する。場合によっては、本明細書に記載される d P E G は Quanta Biodesign, LMD の d P E G である。

10

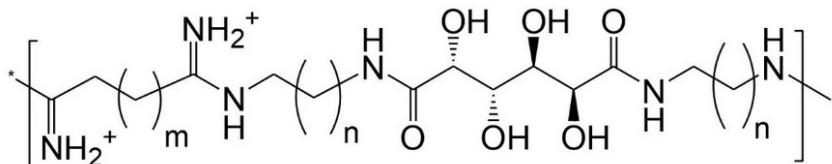
【0284】

いくつかの実施形態において、ポリマー部分 C はカチオン性ムチン酸ベースのポリマー（c M A P）を含む。いくつかの例では、c M A P は、少なくとも 1 つの反復サブユニットの 1 つ以上のサブユニットを含み、サブユニット構造は式（V）として表される：

20

【0285】

【化 35】



式 V

30

【0286】

式中、m は、各出現時、独立して 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10、好ましくは、4 - 6、あるいは 5 であり；および、n は、各出現時、独立して、1、2、3、4、または 5 である。いくつかの実施形態において、m と n は、例えば、約 1 0 である。

【0287】

いくつかの例では、c M A P は P E G 部分にさらに結合され、c M A P - P E G コポリマー、m P E G - c M A P - P E G m トリブロックポリマー、あるいは c M A P - P E G - c M A P トリブロックポリマーを生成する。いくつかの例では、P E G 部分は約 5 0 0 D a ~ 約 5 0 , 0 0 0 D a の範囲である。いくつかの例では、P E G 部分は、約 5 0 0 D a ~ 約 1 0 0 0 D a、1 0 0 0 D a より大きい ~ 約 5 0 0 0 D a、5 0 0 0 D a より大きい ~ 約 1 0 , 0 0 0 D a、1 0 , 0 0 0 より大きい ~ 約 2 5 , 0 0 0 D a、2 5 , 0 0 0 D a より大きい ~ 約 5 0 , 0 0 0 D a、あるいはこれらの範囲の 2 つ以上の任意の組み合わせである。

40

【0288】

いくつかの例では、ポリマー部分 C は、c M A P - P E G コポリマー、m P E G - c M A P - P E G m トリブロックポリマー、あるいは c M A P - P E G - c M A P トリブロックポリマーである。場合によっては、ポリマー部分 C は c M A P - P E G コポリマーである。他の場合には、ポリマー部分 C は m P E G - c M A P - P E G m トリブロックポリマーである。さらなる場合には、ポリマー部分 C は c M A P - P E G - c M A P トリブロック

50

クポリマーである。

【0289】

いくつかの実施形態において、ポリマー部分Cは、上で例証されるように、ポリ核酸分子、結合部分、および、随意にエンドソーム溶解性部分に結合される。

【0290】

エンドソーム溶解性部分

いくつかの実施形態において、式(I)：A-X-B-Y-Cの分子は追加の抱合部分をさらに含む。いくつかの例では、追加の結合部分はエンドソーム溶解性部分である。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は、細胞区画放出成分、例えば、エンドソーム、リソソーム、小胞体(ER)、ゴルジ体、微小管、ペルオキシソーム、あるいは細胞を有する他の小胞体などの、当該技術分野で知られている細胞の区分のいずれかから放出することができる化合物である。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は、エンドソーム溶解性ポリペプチド、エンドソーム溶解性ポリマー、エンドソーム溶解性脂質、あるいはエンドソーム溶解性小分子を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性ポリペプチドを含む。他の場合では、エンドソーム溶解性部分はエンドソーム溶解性ポリマーを含む。

10

【0291】

エンドソーム溶解性ポリペプチド

いくつかの実施形態において、式(I)：A-X-B-Y-Cの分子はエンドソーム溶解性ポリペプチドとさらに結合される。いくつかの実施形態において、式(V)：A-(X¹-B)_nあるいは式(II)：A-X¹-(B-X²-C)_nの分子は、エンドソーム溶解性ポリペプチドとさらに結合する。場合によっては、エンドソーム溶解性ポリペプチドはpH依存性膜活性ペプチドである。場合によっては、エンドソーム溶解性ポリペプチドは両親媒性ポリペプチドである。追加の場合には、エンドソーム溶解性ポリペプチドはペプチド模倣薬である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性ポリペプチドは、INF、メリチン、ムチン(mucin)、あるいはそのそれぞれの誘導体を含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性ポリペプチドは、INFまたはその誘導体を含む。他の場合には、エンドソーム溶解性ポリペプチドは、メリチンまたはその誘導体を含む。さらなる場合には、エンドソーム溶解性ポリペプチドは、ムチンまたはその誘導体を含む。

20

【0292】

いくつかの例では、INF7は24残基物ポリペプチドであり、これらの配列は、CGIFGEIEELIEEGLENLIDWGNA(SEQ ID NO:1)、あるいはGLFEAIEGFIENGWEGMIDGHWYGC(SEQ ID NO:2)を含む。いくつかの例では、INF7またはその誘導体は、以下の配列を含む：GLFEAIEGFIENGWEGMIDGHWYGC(SEQ ID NO:3)、GLFEAIEGFIENGWEGMIDGHWYGC-(PEG)6-NH2(SEQ ID NO:4)、またはGLFEAIEGFIENGWEGMIDGHWYGC-SGSC-K(GalNAc)2(SEQ ID NO:5)。

30

【0293】

場合によっては、メリチンは26残基ポリペプチドであり、この配列は、CLIGAIALKVLATGLPTLISWIKNKRKQ(SEQ ID NO:6)、あるいはIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ(SEQ ID NO:7)を含む。いくつかの例では、メリチンは、米国特許第8,501,930号に記載されるポリペプチド配列を含む。

40

【0294】

いくつかの例では、ムチンは、サソリ(Mesobuthus eupeus)の毒液腺に由来する抗菌ペプチド(AMP)である。いくつかの例では、ムチンはムチン-13(これらの配列は、IFGAIAGLLKNIF-NH2(SEQ ID NO:8)を含む)およびムチン-18(これらの配列は、FFGHLFKLATKIIIPSLFQ(SEQ ID NO:9)を含む)から構成される。

50

【0295】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性ポリペプチドは、配列が I N F 7 あるいはその誘導体、メリチンあるいはその誘導体、または、ムチンあるいはその誘導体に対して、少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95%、あるいは 99% の配列同一性であるポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、I N F 7 またはその誘導体、メリチンまたはその誘導体、あるいはムチンまたはその誘導体を含む。

【0296】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は I N F 7 またはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 1 - 5 に対して少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 1 に対して少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 2 - 5 に対して少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は S E Q I D N O : 1 を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は S E Q I D N O : 2 - 5 を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は S E Q I D N O : 1 からなる。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は S E Q I D N O : 2 - 5 からなる。

10

20

30

【0297】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はメリチンまたはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 6 または 7 に対して少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 6 に対して少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 7 に対して少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は S E Q I D N O : 6 を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は S E Q I D N O : 7 を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は S E Q I D N O : 6 からなる。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は S E Q I D N O : 7 からなる。

40

【0298】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はムチンまたはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 8 または 9 に対して少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 8 に対して少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 9 に対して少なくとも 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

50

配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は SEQ ID NO : 8 を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は SEQ ID NO : 9 を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は SEQ ID NO : 8 からなる。場合によっては、エンドソーム溶解性部分は SEQ ID NO : 9 からなる。

【0299】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は以下の表 1 に示される配列を含む。

【0300】

【表1-1】

名称	起源	アミノ酸配列	SEQ ID NO:	型
Pep-1	シミアンウイルス40 ラージ抗原からの NLS およびHIVの逆 転写酵素	KETWWETWWTEWSQPKKKR KV	10	一次両親媒性
pVEC	VE-カドヘリン	LLIILRRRRIRKQAHHSK	11	一次両親媒性
VT5	合成ペプチド	DPKGDPKGVTVTVTGTGK GDPKPD	12	β シート両親 媒性
C105Y	I-アンチトリプシン	CSIPPEVKFNKPFVYLI	13	-
トランスポーター	ガラニンおよびマス トパラン	GWTLNSAGYLLGKINLKALA ALAKKIL	14	一次両親媒性
TP10	ガラニンおよびマス トパラン	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	15	一次両親媒性
MPG	HIV gp41およびSV40 T抗原のNLSの融合配 列からの疎水性ドメイ ン	GALFLGFLGAAGSTMGA	16	β シート両親 媒性
gH625	HSV 1型の糖タンパ ク質 gH	HGLASTLTRWAHYNALIRAF	17	二次両親媒性 α ヘリックス
CADY	PPTG1 ペプチド	GLWRALWRLRSLSWRLLWRA	18	二次両親媒性 α ヘリックス
GALA	合成ペプチド	WEAALAEALAEALAEHLAEA LAEALEALAA	19	二次両親媒性 α ヘリックス
INF	インフルエンザ HA2 融合ペプチド	GLFEAIEGFIENGWEGMIDGW YGC	20	二次両親媒性 α ヘリックス/ H依存性膜活性 ペプチド
HA2E5-TAT	インフルエンザウイ ルス X31 株融合ペプ チドのインフルエン ザ HA2 サブユニット	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGW YG	21	二次両親媒性 α ヘリックス/ p H依存性膜 活性ペプチド
HA2- ペネトラチ ン	インフルエンザウイ ルス X31 株融合ペプ チドのインフルエン ザ HA2 サブユニット	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGR QIKIWFFQNRRMKW KK-amide	22	p H依存性膜 活性ペプチド
HA-K4	インフルエンザウイ ルス X31 株融合ペプ チドのインフルエン ザ HA2 サブユニット	GLFGAIAGFIENGWEGMIDG- SSKKKK	23	p H依存性膜 活性ペプチド
HA2E4	インフルエンザウイ ルス X31 株融合ペプ チドのインフルエン ザ HA2 サブユニット	GLFEAIAGFIENGWEGMIDGG GYC	24	p H依存性膜 活性ペプチド

10

20

30

40

【0301】

【表1-2】

H5WYG	HA2 アナログ	GLFHAIAHFIHGGWH GLIHGWYG	25	pH依存性膜活性ペプチド
GALA-INF3-(PEG)6-NH	INF3 融合ペプチド	GLFEAIEGFIENGWEGLAEALA EALEALAA-(PEG)6-NH2	26	pH依存性膜活性ペプチド
CM18-TAT11	セクロビン-A-メリチン ₂₋₁₂ (CM ₁₈)融合ペプチド	KWKLFKKIGAVLKVLTTGYGRKKRRQRRR	27	pH依存性膜活性ペプチド

10

【0302】

場合によっては、エンドソーム溶解性部分は、Bcl-2および/またはBcl-xLなどの抑制遺伝子標的の拮抗を介してアポトーシスを誘発するBak BH3ポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、Albarran, et al., "Efficient intracellular delivery of a pro-apoptotic peptide with a pH-responsive carrier," Reactive & Functional Polymers 71: 261-265 (2011)に記載されるBak BH3ポリペプチドを含む。

【0303】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、PCT公開公報第WO2013/166155号および第WO2015/069587号に記載されるポリペプチド(例えば、細胞透過性ポリペプチド)を含む。

20

【0304】

エンドソーム溶解性ポリマー

いくつかの実施形態において、式(V): A - (X¹ - B)_nあるいは式(VI): A - X¹ - (B - X² - C)_nの分子は、エンドソーム溶解性ポリマーとさらに結合される。本明細書で使用される場合、エンドソーム溶解性ポリマーは、線状、分岐ネットワーク、星型、くし型、あるいは、はしご型のポリマーを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性ポリマーは、2つ以上の異なる型の単量体を含むホモポリマーあるいはコポリマーである。場合によっては、エンドソーム溶解性ポリマーはポリカチオンポリマーである。他の場合において、エンドソーム溶解性ポリマーはポリアニオンポリマーである。

30

【0305】

いくつかの例では、ポリカチオンポリマーは、正の電荷、中性の電荷、あるいは負の電荷であるモノマー単位を含み、正味の電荷は正である。他の場合において、ポリカチオンポリマーは、2つ以上の正電荷を含有する非ポリマー分子を含む。例示的なカチオンポリマーとしては、限定されないが、ポリ(L-リジン)(PLL)、ポリ(L-アルギニン)(PLA)、ポリエチレンイミン(PEI)、ポリ[-(4-アミノブチル)-L-グリコール酸](PAGA)、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート(DMAEMA)、あるいはN,N-ジエチルアミノエチルメタクリレート(DEAEMA)が挙げられる。

40

【0306】

場合によっては、ポリアニオンポリマーは、正の電荷、中性の電荷、あるいは負の電荷であるモノマー単位を含み、正味の電荷は負である。他の場合において、ポリアニオンポリマーは、2つ以上の負の荷電を含有する非ポリマー分子を含む。例示的なアニオンポリマーは、p(アルキルアクリレート)(例えば、ポリ(プロピルアクリル酸)(PPAA))、あるいはポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(NIPAM)を含む。さらなる例は、PP75、Khormae, et al., "Edosomolytic anionic polymer for the cytoplasmic delivery of siRNAs in localized in vivo app

50

lications," Advanced Functional Materials 23: 565-574 (2013) に記載される L - フェニルアラニン - ポリ (L - リジン イソフタルアミド) ポリマーを含む。

【0307】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるエンドゾーム溶解性ポリマーは、pH応答性のエンドゾーム溶解性ポリマーである。pH応答性ポリマーは、環境のpHに応じてサイズを増大させる(膨潤させる)か、崩壊するポリマーを含む。ポリアクリル酸およびキトサンはpH応答性ポリマーの例である。

【0308】

いくつかの例では、本明細書に記載されるエンドゾーム溶解性部分は、膜破壊的ポリマー (membrane-disruptive polymer) である。場合によっては、膜破壊的ポリマーは、カチオンポリマー、中性または疎水性ポリマー、あるいはアニオニンポリマーを含む。幾つかの例では、膜破壊的ポリマーは親水性ポリマーである。

【0309】

いくつかの例では、本明細書に記載されるエンドゾーム溶解性部分は、pH応答性の膜破壊的ポリマーである。例示的なpH応答性の膜破壊的ポリマーは、p(アルキルアクリル酸)、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(NIPAM)コポリマー、サクシル化されたp(グリシドール)、およびp(-リンゴ酸)ポリマーを含む。

【0310】

いくつかの例では、p(アルキルアクリル酸)は、ポリ(プロピルアクリル酸)(ポリPAA)、ポリ(メタクリル酸)(PMAA)、ポリ(エチルアクリル酸)(PEAA)、およびポリ(プロピルアクリル酸)(PPAA)を含む。いくつかの例では、p(アルキルアクリル酸)は、Jones, et al., *Biochemistry Journal* 372: 65-75 (2003) に記載されるp(アルキルアクリル酸)を含む。

【0311】

いくつかの実施形態において、pH応答性膜破壊的ポリマーは、p(ブチルアクリレート-co-メタクリル酸)を含む。(Bulmus, et al., *Journal of Controlled Release* 93: 105-120 (2003); and Yessine, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1613: 28-38 (2003) を参照)

【0312】

いくつかの実施形態において、pH応答性膜破壊的ポリマーは、p(スチレン-alt-無水マレイン酸)を含む。(Henry, et al., *Biomacromolecules* 7: 2407-2414 (2006) を参照)

【0313】

いくつかの実施形態において、pH応答性膜破壊的ポリマーは、ピリジルジスルフィド(pyridyl disulfide)アクリレート(PDSA)ポリマー、例えば、ポリ(MAA-co-PDSA)、ポリ(EAA-co-PDSA)、ポリ(PAA-co-PDSA)、ポリ(MAA-co-BA-co-PDSA)、ポリ(EAA-co-BA-co-PDSA)、あるいはポリ(PAA-co-BA-co-PDSA)ポリマーを含む。(El-Sayed, et al., "Rational design of composition and activity correlation for pH-responsive and glutathione-reactive polymer therapeutics," *Journal of Controlled Release* 104: 417-427 (2005);あるいはFlanary et al., "Antigen delivery with poly(propyl acrylic acid) conjugation enhanced MHC-1 presentation and T-cell activation," *Bioconjugate Chem.* 20: 241-248

10

20

30

40

50

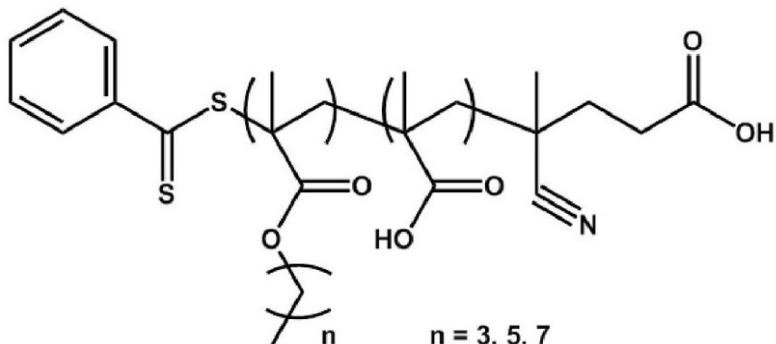
(2009)を参照)

【0314】

いくつかの実施形態において、pH応答性膜破壊的ポリマーは、下記の基本構造を含む細胞溶解性ポリマーを含む：

【0315】

【化36】



10

【0316】

20

いくつかの例では、本明細書に記載されるエンドソーム溶解性部分は、追加の抱合体、例えば、ポリマー（例えば、PEG）あるいは修飾されたポリマー（例えば、コレステロールで修飾されたポリマー）にさらに結合される。

【0317】

30

いくつかの例では、追加の抱合体は、界面活性剤（例えば、トリトンX-100）を含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるエンドソーム溶解性部分は、界面活性剤（例えば、トリトンX-100）と結合されたポリマー（例えば、ポリ（アミドアミン））を含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるエンドソーム溶解性部分は、ポリ（アミドアミン）-トリトンX-100抱合体（Duncan, et al., "A polymer-Triton X-100 conjugate capable of pH-dependent red blood cell lysis: a model system illustrating the possibility of drug delivery within acidic intracellular compartments," Journal of Drug Targeting 2: 341-347 (1994)）を含む。

40

【0318】

エンドソーム溶解性脂質

いくつかの実施形態において、エンドソーム溶解性部分は、脂質（例えば、融合性脂質）である。いくつかの実施形態において、式(V)：A-(X¹-B)_nあるいは式(VI)：A-X¹-(B-X²-C)_nの分子は、エンドソーム溶解性脂質（例えば、融合性脂質）とさらに結合する。例示的な融合性脂質は、1,2-ジレオイル(dileoyl)-sn-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、ホスファチジルエタノールアミン(POPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-オール(Di-Lin)、およびN-メチル(2,2-ジ(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル)-1,3-ジオキソラン-4-イル)メタンアミン(DLin-k-DMA)ならびにN-メチル-2-(2,2-ジ(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエニル)-1,3-ジオキソラン-4-イル)エタンアミン(XTC)を含む。

50

【0319】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、PCT公開公報第WO09/126,933号に記載される脂質（例えば、融合性脂質）である。

【0320】

エンドソーム溶解性小分子

いくつかの実施形態では、エンドソーム溶解性部分は小分子である。いくつかの実施形態において、式(I) : A - (X¹ - B)_nあるいは式(II) : A - X¹ - (B - X² - C)_nの分子は、エンドソーム溶解性小分子とさらに結合される。エンドソーム溶解性部分として適切な例示的な小分子としては、限定されないが、キニーネ、クロロキン、水酸化クロロキン、アモジアキン(carnoquines)、アモピロキン、プリマキン、メフロキン、nivaquines、ハロファントリル、キノンイミン、あるいはそれらの組み合わせを含む。いくつかの例では、キノリンエンドソーム溶解性部分としては、限定されないが、7-クロロ-4-(4-ジエチルアミノ-1-メチルブチル-アミノ)キノリン(クロロキン)；7-クロロ-4-(4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチル-アミノ)キノリン(ヒドロキシクロロキン)；7-フルオロ-4-(4-ジエチルアミノ-1-メチルブチル-アミノ)キノリン；4-(4-ジエチルアミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-ヒドロキシ-4-(4-ジエチル-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-クロロ-4-(4-ジエチルアミノ-1-ブチルアミノ)キノリン(デスマチルクロロキン)；7-フルオロ-4-(4-ジエチルアミノ-1-ブチルアミノ)キノリン；4-(4-ジエチル-アミノ-1-ブチルアミノ)キノリン；7-ヒドロキシ-4-(4-ジエチルアミノ-1-ブチルアミノ)キノリン；7-クロロ-4-(1-カルボキシ-4-ジエチルアミノ-1-ブチルアミノ)キノリン；7-フルオロ-4-(1-カルボキシ-4-ジエチル-アミノ-1-ブチルアミノ)キノリン；4-(1-カルボキシ-4-ジエチルアミノ-1-ブチルアミノ)キノリン；7-ヒドロキシ-4-(1-カルボキシ-4-ジエチルアミノ-1-ブチルアミノ)キノリン；7-クロロ-4-(1-カルボキシ-4-ジエチルアミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-フルオロ-4-(1-カルボキシ-4-ジエチル-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；4-(1-カルボキシ-4-ジエチルアミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-ヒドロキシ-4-(1-カルボキシ-4-ジエチルアミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-フルオロ-4-(4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；4-(4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-ヒドロキシ-4-(4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-フルオロ-4-(4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；4-(4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-ヒドロキシ-4-(4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-クロロ-4-(1-カルボキシ-4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-フルオロ-4-(1-カルボキシ-4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；4-(1-カルボキシ-4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-ヒドロキシ-4-(1-カルボキシ-4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-クロロ-4-(1-カルボキシ-4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-フルオロ-4-(1-カルボキシ-4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；4-(1-カルボキシ-4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；7-ヒドロキシ-4-(1-カルボキシ-4-エチル-(2-ヒドロキシエチル)-アミノ-1-メチルブチルアミノ)キノリン；8-[(4-アミノペンチル)アミノ-6-メトキシジヒドロクロリド]キノリン；1-アセチル-1,2,3,4-テトラヒドロキノリン；3-クロロ-4-(4-ヒドロキシ-1,2-ビス(2-メチル-1-ピロリジニル)-2,5-キシリジノキノリ

ン) (4-[(4-ジエチル-アミノ)-1-メチルブチル-アミノ]-6-メトキシキノリン；3-フルオロ-4-(4-ヒドロキシ-、'-ビス(2-メチル-1-ピロリジニル)-2,5-キシリジノキノリン(4-[(4-ジエチルアミノ)-1-メチルブチル-アミノ]-6-メトキシキノリン；4-(4-ヒドロキシ-、'-ビス(2-メチル-1-ピロリジニル)-2,5-キシリジノキノリン；4-[(4-ジエチルアミノ)-1-メチルブチル-アミノ]-6-メトキシキノリン；3,4-ジヒドロ-1-(2H)-キノリンカルボキシアルデヒド；1,1'-ペンタメチレンキノリニウムヨード；8-硫酸キノリノールおよびアミノ、アルデヒド、カルボン酸、ヒドロキシル、ハロゲン、ケト、スルフヒドリル、ならびにビニル誘導体またはそのアナログが挙げられる。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、Na is bitt et al (1997, J Pharmacol Exp Therapy 280: 884-893) および米国特許第5,736,557号に記載される小分子である。いくつかの実施形態において、エンドソーム溶解性部分は、ニゲリシンあるいはその抱合体、例えば、葉酸-ニゲリシンのエステル抱合体、葉酸-ニゲリシンのアミド抱合体、または葉酸-ニゲリシンのカルバマート結合などである。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、R angasamy, et al., "New mechanism for release of endosomal contents: osmotic lysis via nigericin-mediated K⁺/H⁺ exchange," Bioconjugate Chem. 29: 1047-1059 (2018) に記載されるニゲリシンである。

【0321】

リンカー

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるリンカーは、切断可能なリンカーまたは切断不可能なリンカーである。いくつかの例では、リンカーは切断可能なリンカーである。他の例では、リンカーは切断不可能なリンカーである。

【0322】

場合によっては、リンカーは非ポリマーリンカーである。非ポリマーリンカーは、重合プロセスによって生成された単量体の反復単位を含まないリンカーを指す。例示的な非ポリマーリンカーとしては、限定されないが、C₁-C₆アルキル基(例えば、C₅、C₄、C₃、C₂、あるいはC₁アルキル基)、ホモ二機能性架橋リンカー、ヘテロ二機能性架橋リンカー、ペプチドリンカー、トレースレスリンカー、自壊性リンカー、マレイミドベースのリンカー、あるいはこれらの組み合わせが挙げられる。場合によっては、非ポリマーリンカーは、C₁-C₆アルキル基(例えば、C₅、C₄、C₃、C₂、あるいはC₁アルキル基)、ホモ二機能性架橋リンカー、ヘテロ二機能性架橋リンカー、ペプチドリンカー、トレースレスリンカー、自壊性リンカー、マレイミドベースのリンカー、あるいはこれらの組み合わせを含む。さらなる場合には、非ポリマーリンカーは、2つを超える同じタイプのリンカー、例えば、2つを超えるホモ二機能性架橋リンカー、あるいは2つを超えるペプチドリンカーを含まない。さらなる場合には、非ポリマーリンカーは隨意に1つ以上の反応性官能基を含む。

【0323】

いくつかの例では、非ポリマーリンカーは、上に記載されたポリマーを包含しない。いくつかの例では、非ポリマーリンカーは、ポリマー部分Cによって包含されるポリマーを包含しない。場合によっては、非ポリマーリンカーはポリアルキレンオキシド(例えばPEG)を包含しない。場合によっては、非ポリマーリンカーはPEGを包含しない。

【0324】

いくつかの例では、リンカーはホモ二機能性リンカーを含む。例示的なホモ二機能性リンカーとしては、限定されないが、L o m a n t の試薬ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)D S P、3'3'-ジチオビス(スルホスクシンイミジルプロブリオネート(D T S S P)、ジスクシンイミジルスペレート(D S S)、ビス(スルホスクシンイミジル)スペレート(B S)、ジスクシンイミジルタルトルート(D S T)、ジスルホス

10

20

30

40

50

クシンイミジルタルトレート(スルホD S T)、エチレングリコビス(スクシンイミジルスクシネット)(E G S)、ジスクシンイミジルグルタレート(D S G)、N、N'-ジスクシンイミジルカルボナート(D S C)、ジメチルアジピミデート(D M A)、ジメチルピメリミデートピメリミデート(D M P)、ジメチルスペリミデート(D M S)、ジメチル-3,3'-ジチオビスプロピオンイミデート(D T B P)、1,4-ジ-3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド)ブタン(D P D P B)、ビスマレイミドヘキサン(B M H)、例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン、1,3-ジフルオロ-4,6-ジニトロベンゼンなどのハロゲン化アリール含有化合物(D F D N B)、4,4'-ジフルオロ-3,3'-ジニトロフェニルスルホン(D F D N P S)、ビス-[- (4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィド(B A S E D)、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテル、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、o-トルイジン、3,3'-ジメチルベンジジン、ベンジジン、-,-p-ジアミノジフェニル、ジヨード-p-キシレンスルホン酸、N,N'-エチレン-ビス(ヨードアセトアミド)、あるいは、N,N'-ヘキサメチレン-ビス(ヨードアセトアミド)が挙げられる。

【0325】

いくつかの実施形態では、リンカーはヘテロ二機能性リンカーを含む。例示的なヘテロ二機能性リンカーとしては、限定されないが、アミン反応的およびスルフヒドリル架橋リンカー、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、(s P D P)、長鎖N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、(L C - s P D P)、水溶性の長鎖N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(スルホ-L C - s P D P)、スクシンイミジルオキシカルボニル--メチル- - (2-ピリジルジチオ)トルエン(s M P T)、スルホスクシンイミジル-6-[- メチル- - (2-ピリジルジチオ)トルアミド]ヘキサノアート(スルホL C - s M P T)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(s M C C)、スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-s M C C)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル(M B s)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル(スルホ-M B)、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(s I A B)、スルホスクシンイミジル(4-iodoacteyl)アミノベンゾエート(スルホ-s I A B)、スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(s M P B)、スルホスクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(スルホ-s M P B)、N-(- マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド・エステル(G M B)、N-(- マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステル(スルホ-G M B)、スクシンイミジル-6-((ヨードアセチル)アミノ)ヘキサノアート(s I A X)、スクシンイミジル-6-[6-((ヨードアセチル)アミノ)ヘキサノイル)アミノ]ヘキサノアート(s I A X X)、スクシンイミジル-4-(((ヨードアセチル)アミノ)メチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(s I A C)、スクシンイミジル-6-(((4-ヨードアセチル)アミノ)メチル)シクロヘキサン-1-カルボニル)アミノ)ヘキサノアート(s I A C X)、p-ニトロフェニルヨードアセテート(N P I A)、4-(4-N-マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド(M P B H)、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシル-ヒドラジド-8(M₂C₂H)、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオニルヒドラジド(P D P H)などのカルボニル反応的およびスルフヒドリル反応的な架橋リンカー、アミン反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸(NH-A s A)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸(スルホ-NH-A s A)、スルホスクシンイミジル-(4-アジドサリチルアミド)ヘキサノアート(スルホ-NH-L C-A s A)、スルホスクシンイミジル-2-(- アジドサリチルアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネート(s A s D)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾ

10

20

30

40

50

エート(HsAB)、N - ヒドロキシスルホスクシンイミジル - 4 - アジドベンゾエート(スルホ - HsAB)、N - スクシンイミジル - 6 - (4 ' - アジド - 2 ' - ニトロフェニルアミノ)ヘキサノアート(sANPAH)、スルホスクシンイミジル - 6 - (4 ' - アジド - 2 ' - ニトロフェニルアミノ)ヘキサノアート(スルホ - sANPAH)、N - 5 - アジド - 2 - ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド(ANB - NOs)、スルホスクシンイミジル - 2 - (m - アジド - o - ニトロベンズアミド) - エチル - 1 , 3 ' - ジチオプロピオネート(sAND)、N - スクシンイミジル - 4 (4 - アジドフェニル) 1 , 3 ' - ジチオプロピオネート(sADP)、N - スルホスクシンイミジル (4 - アジドフェニル) - 1 , 3 ' - ジチオプロピオネート(スルホ - sADP)、スルホスクシンイミジル - 4 - (- アジドフェニル) ブチレート(スルホ - sAPB)、スルホスクシンイミジル - 2 - (7 - アジド - 4 - メチルクマリン - 3 - アセトアミド) エチル - 1 , 3 ' - ジチオプロピオネート(sAED)、スルホスクシンイミジル - 7 - アジド - 4 - メチルクマリン - 3 - アセテート(スルホ - sAMCA)、- ニトロフェニル・ジアゾピルバート(NPDp)、- ニトロフェニル - 2 - ジアゾ - 3 , 3 , 3 - トリフルオロプロピオネート(PNp - DTP)、スルフヒドリル反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、1 - (- アジドサリチルアミド) - 4 - (ヨードアセトアミド) ブタン(AsIB)、N - [4 - (- アジドサリチルアミド) ブチル] - 3 ' - (2 ' - ピリジルジチオ) プロピオンアミド(APDP)、ベンゾフェノン - 4 - ヨードアセトアミド、ベンゾフェノン - 4 - マレイミドカルボニル反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、- アジドベンゾイルヒドラジド(ABH)、カルボン酸塩反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、4 - (- アジドサリチルアミド) ブチルアミン(AsBA)、および、アルギニン反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、- アジドフェニルグリオキサール(APG)が挙げられる。

【0326】

いくつかの例では、リンカーは反応性官能基を含む。場合によっては、反応性官能基は、結合部分に存在する求電子基に反応性の求核基を含む。例示的な求電子基は、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、エステル、アミド、エノン、ハロゲン化アシル、または酸無水物などのカルボニル基を含む。いくつかの実施形態において、反応性官能基はアルデヒドである。例示的な求核基は、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジドを含む。

【0327】

いくつかの実施形態では、リンカーはマレイミド基を含む。いくつかの例では、マレイミド基はマレイミドスペーサーとも呼ばれる。いくつかの例では、マレイミド基はカプロン酸をさらに包含し、マレイミドカブロイル(mc)を形成する。場合によっては、リンカーはマレイミドカブロイル(mc)を含む。場合によっては、リンカーはマレイミドカブロイル(mc)である。他の例では、マレイミド基は、上に記載されたスクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート(sMCC)、あるいは、スルホスクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート(スルホ - sMCC)などのマレイミドメチル基を含む。

【0328】

いくつかの実施形態において、マレイミド基は自己安定化マレイミドである。いくつかの例では、自己安定化マレイミドは、チオスクシンイミド環加水分解の分子内の触媒作用をもたらすために、マレイミドに隣接する塩基性アミノ基を取り込むべくジアミノプロピオ酸(DPR)を利用し、それによって、マレイミドがレトロマイケル反応による脱離反応を経験することのないようにする。いくつかの例では、自己安定化マレイミドは、Lyon, et al., "Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates," Nat. Biotechnol. 32 (10) : 1059 - 1062 (2014) に記載されるマレイミド基である。いくつかの例では、リンカーは自己安定化

10

20

30

40

50

マレイミドを含む。いくつかの例では、リンカーは自己安定化マレイミドである。

【0329】

いくつかの実施形態では、リンカーはペプチド部分を含む。いくつかの例では、ペプチド部分は、少なくとも1、2、3、4、5、あるいは6より多くのアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、ペプチド部分は、多くとも1、2、3、4、5、6、7、あるいは8のアミノ酸残基を含む。いくつかの例では、ペプチド部分は、約2、約3、約4、約5、あるいは約6アミノ酸残基を含む。いくつかの例では、ペプチド部分は、切断可能なペプチド部分（例えば、酵素的または化学的に）である。いくつかの例では、ペプチド部分は切断不可能なペプチド部分である。いくつかの例では、ペプチド部分は、Val-Cit（バリン-シトルリン）、Gly-Gly-Phe-Gly、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu、あるいはGly-Phe-Leu-Glyを含む。いくつかの例では、リンカーは、Val-Cit（バリン-シトルリン）、Gly-Gly-Phe-Gly、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu、あるいはGly-Phe-Leu-Glyなどのペプチド部分を含む。場合によっては、リンカーはVal-Citを含む。場合によっては、リンカーはVal-Citである。10

【0330】

いくつかの実施形態において、リンカーは安息香酸基あるいはその誘導体を含む。いくつかの例では、安息香酸基あるいはその誘導体はパラアミノ安息香酸（PABA）を含む。いくつかの例では、安息香酸基あるいはその誘導体は-アミノ酪酸（GABA）を含む。20

【0331】

いくつかの実施形態において、リンカーは、任意の組み合わせで、マレイミド基、ペプチド部分、および/または、安息香酸基の1つ以上を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、マレイミド基、ペプチド部分、および/または、安息香酸基の組み合わせを含む。いくつかの例では、マレイミド基はマレイミドカプロイル（mc）である。いくつかの例では、ペプチド基はval-citである。いくつかの例では、安息香酸基はPABAである。いくつかの例では、リンカーはmc-val-cit基を含む。場合によっては、リンカーはval-cit-PABA基を含む。さらなる場合には、リンカーはmc-val-cit-PABA基を含む。30

【0332】

いくつかの実施形態において、リンカーは自壊性リンカーあるいは自己排除リンカーである。場合によっては、リンカーは自壊性リンカーである。他の場合には、リンカーは自己排除リンカー（例えば、環化自己排除リンカー）である。いくつかの例では、リンカーは、米国特許第9,089,614号あるいはPCT公開公報WO2015038426に記載されるリンカーを含む。40

【0333】

いくつかの実施形態において、リンカーは樹状型リンカーである。いくつかの例では、樹状型リンカーは分岐した多機能リンカー部分を含む。いくつかの例では、樹状型リンカーは、ポリヌクレオチドB対結合部分Aのモル比を増加させるために使用される。いくつかの例では、樹状型リンカーはPAMAMデンドリマーを含む。

【0334】

いくつかの実施形態において、リンカーは、トレースレスリンカーあるいは切断後にリンカー部分（例えば、原子あるいはリンカー基）を結合部分A、ポリヌクレオチドB、ポリマーC、またはエンドソーム溶解性部分Dに残さないリンカーである。例示的なトレースレスリンカーとしては、限定されないが、ゲルマニウムリンカー、ケイ素リンカー（s50

elenium linker)、硫黄リンカー、セレンリンカー、窒素リンカー、リンリンカー、ホウ素リンカー、クロムリンカー、あるいはフェニルヒドラジドリンカーが挙げられる。場合によっては、リンカーは、Hejlesen, et al., "A traceless aryl-triazene linker for DNA-directed chemistry," Org Biomol Chem 11(15): 2493-2497 (2013)に記載されるトレースレスアリール-トリアゼンリンカーである。いくつかの例では、リンカーは、Blaney, et al., "Traceless solid-phase organic synthesis," Chem. Rev. 102: 2607-2024 (2002)に記載されるトレースレスリンカーである。いくつかの例では、リンカーは、米国特許第6,821,783号に記載されるトレースレスリンカーである。

10

【0335】

幾つかの実施形態では、リンカーは、米国特許第6,884,869号；第7,498,298号；第8,288,352号；第8,609,105号；あるいは、第8,697,688号；米国特許公開第2014/0127239号；第2013/028919号；第2014/286970号；第2013/0309256号；第2015/037360号；あるいは、第2014/0294851号；または、PCT公開公報WO2015057699；WO2014080251；WO2014197854；WO2014145090；あるいは、WO2014177042に記載されるリンカーである。

20

【0336】

いくつかの実施形態において、X、Y、およびLは独立して単結合またはリンカーである。いくつかの例では、X、Y、およびLは独立して単結合である。場合によっては、X、Y、およびLは独立してリンカーである。

【0337】

いくつかの例では、Xは単結合またはリンカーである。いくつかの例では、Xは単結合である。いくつかの例では、Xはリンカーである。いくつかの例では、リンカーはC₁-C₆アルキル基である。場合によっては、Xは、例えば、C₅、C₄、C₃、C₂、あるいはC₁アルキル基などのC₁-C₆アルキル基である。場合によっては、C₁-C₆アルキル基は非置換のC₁-C₆アルキル基である。リンカーの文脈において、とりわけ、Xの文脈において使用される場合、アルキルは、最大で6つの炭素原子を含む飽和した直鎖または分岐鎖の炭化水素ラジカルを意味する。いくつかの例では、Xは非ポリマーリンカーである。いくつかの例では、Xは上に記載されたホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーを含む。場合によっては、Xはヘテロ二機能性リンカーを含む。場合によっては、XはSMCCを含む。他の例では、Xは、C₁-C₆アルキル基に随意に結合したヘテロ二機能性リンカーを含む。他の例では、Xは、C₁-C₆アルキル基に随意に結合したSMCCを含む。いくつかの追加の例では、Xは、上に記載されたホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーを含まない。

30

【0338】

いくつかの例では、Yは単結合またはリンカーである。いくつかの例では、Yは単結合である。他の場合には、Yはリンカーである。いくつかの実施形態において、YはC₁-C₆アルキル基である。いくつかの例では、Yは上に記載されたホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの例では、Yは上に記載されたホモ二機能性リンカーである。いくつかの例では、Yは上に記載されたヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの例では、Yは、上に記載されたマレイミドカプロイル(mc)などのマレイミド基、あるいは自己安定化マレイミド基を含む。いくつかの例では、YはVal-Citなどのペプチド部分を含む。いくつかの例では、YはPABAなどの安息香酸基を含む。さらなる例では、Yは、マレイミド基、ペプチド部分、および/または、安息香酸基の組み合わせを含む。追加の例では、Yはmc基を含む。追加の例では、Yはmc-val-cit基を含む。追加の例では、Yはval-cit-PABA基を含む。追加の例では、Yはmc-val-cit-PABA基を含む。

40

50

【0339】

いくつかの例では、Lは単結合またはリンカーである。場合によっては、Lは単結合である。場合によっては、Lはリンカーである。いくつかの実施形態では、LはC₁-C₆アルキル基である。いくつかの例では、Lは上に記載されたホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの例では、Lは上に記載されたホモ二機能性リンカーである。いくつかの例では、Lは上に記載されたヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの例では、Lは、上に記載されたマレイミドカブロイル(m c)などのマレイミド基、あるいは自己安定化マレイミド基を含む。いくつかの例では、LはV a l - C i tなどのペプチド部分を含む。いくつかの例では、LはP A B Aなどの安息香酸基を含む。さらなる例では、Lは、マレイミド基、ペプチド部分、および/または、安息香酸基の組み合わせを含む。さらなる例では、Lはm c 基を含む。さらなる例では、Lはm c - v a l - c i t 基を含む。さらなる例では、Lはv a l - c i t - P A B A 基を含む。さらなる例では、Lはm c - v a l - c i t - P A B A 基を含む。

10

【0340】

いくつかの実施形態において、X¹とX²はそれぞれ独立して、単結合あるいは非ポリマー・リンカーである。いくつかの例では、X¹とX²はそれぞれ独立して単結合である。場合によっては、X¹とX²はそれぞれ独立して非ポリマー・リンカーである。

【0341】

いくつかの例では、X¹は単結合または、非ポリマー・リンカーを含む。いくつかの例では、X¹は単結合である。いくつかの例では、X¹は非ポリマー・リンカーである。いくつかの例では、リンカーはC₁-C₆アルキル基である。場合によっては、X¹は、例えば、C₅、C₄、C₃、C₂、あるいはC₁アルキル基などのC₁-C₆アルキル基である。場合によっては、C₁-C₆アルキル基は非置換のC₁-C₆アルキル基である。リンカーの文脈において、とりわけ、X¹の文脈において使用される場合、アルキルは、最大で6つの炭素原子を含む飽和した直鎖または分岐鎖の炭化水素ラジカルを意味する。いくつかの例では、X¹は上に記載されたホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーを含む。場合によっては、X¹はヘテロ二機能性リンカーを含む。場合によっては、X¹はs M C Cを含む。他の例では、X¹は、C₁-C₆アルキル基に随意に結合したヘテロ二機能性リンカーを含む。他の例では、X¹は、C₁-C₆アルキル基に随意に結合したs M C Cを含む。いくつかの追加例では、X¹は、上に記載されたホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーを含まない。

20

【0342】

いくつかの例では、X²は単結合またはリンカーである。いくつかの例では、X²は単結合である。その他の場合において、X²はリンカーである。さらなる場合には、X²は非ポリマー・リンカーである。いくつかの実施形態では、X²はC₁-C₆アルキル基である。いくつかの例では、X²は上に記載されたホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの例では、X²は上に記載されたヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの例では、X²は、上に記載されたマレイミドカブロイル(m c)などのマレイミド基、あるいは自己安定化マレイミド基を含む。いくつかの例では、X²はV a l - C i tなどのペプチド部分を含む。いくつかの例では、X²はP A B Aなどの安息香酸基を含む。さらなる例では、X²は、マレイミド基、ペプチド部分、および/または、安息香酸基の組み合わせを含む。追加の例では、X²はm c 基を含む。追加の例では、X²はm c - v a l - c i t 基を含む。追加の例では、X²はv a l - c i t - P A B A 基を含む。追加の例では、X²はm c - v a l - c i t - P A B A 基を含む。

30

【0343】

医薬製剤

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される医薬製剤は、限定されないが、非経口(例えば、静脈内、皮下、筋肉内)、経口、鼻腔内、頸側、直腸、または経皮の投与経路を含む、複数の投与経路によって被験体に投与される。いくつかの例では、本明細書

40

50

に記載される医薬組成物は、非経口（例えば、静脈内、皮下、筋肉内、動脈内、腹腔内、髄腔内、大脳内、脳室内、あるいは頭蓋内）投与のために製剤化される。他の例において、本明細書に記載される医薬組成物は、経口投与のために製剤化される。また他の例において、本明細書に記載される医薬組成物は、経鼻投与のために製剤化される。

【0344】

いくつかの実施形態において、医薬組成物としては、限定されないが、水性分散液、自己乳化分散液、固溶体、リポソーム分散液、エアロゾル、固体剤形、粉末、即時放出製剤、制御放出製剤、速溶製剤、錠剤、カプセル、丸剤、遅延放出製剤、拡張放出製剤、パルス放出製剤、多粒子製剤（例えば、ナノ粒子製剤）、および、即時放出と制御放出の混合製剤が挙げられる。

10

【0345】

いくつかの例では、医薬製剤は多粒子製剤を含む。いくつかの例では、医薬製剤はナノ粒子製剤を含む。いくつかの例では、ナノ粒子は、cMAPP、シクロデキストリン、あるいは脂質を含む。場合によっては、ナノ粒子は、固体脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、自己乳化ナノ粒子、リポソーム、マイクロエマルジョン、あるいはミセル溶液を含む。さらなる例示的なナノ粒子としては、限定されないが、常磁性ナノ粒子、超常磁性ナノ粒子、金属ナノ粒子、フラーレン様材料、無機ナノチューブ、デンドリマー（共有結合した金属キレートを有するものなど）、ナノファイバー、ナノホーン、ナノオニオン、ナノロッド、ナノロープ、および量子ドットが挙げられる。いくつかの例では、ナノ粒子は、金属ナノ粒子、例えば、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、イットリウム、ジルコニウム、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、銀、カドミウム、ハフニウム、タンタル、タングステン、レニウム、オスミウム、イリジウム、白金、金、ガドリニウム、アルミニウム、ガリウム、インジウム、スズ、タリウム、鉛、ビスマス、マグネシウム、カルシウム、ストロンチウム、バリウム、リチウム、ナトリウム、カリウム、ホウ素、シリコン、リン、ゲルマニウム、ヒ素、アンチモン、およびこれらの組み合わせ、その合金またはオキシドのナノ粒子である。

20

【0346】

いくつかの例では、ナノ粒子は、コア、あるいは、コアシェルナノ粒子のようにコアとシェルを含む。

30

【0347】

いくつかの例では、ナノ粒子は、機能要素の結合のために分子、例えば、本明細書に記載されるポリ核酸分子または結合部分の1つ以上でさらにコーティングされる。いくつかの例では、コーティングは、硫酸コンドロイチン、硫酸デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、アルギン酸、ペクチン、カラギーナン、フコイダン、アガロペクチン、ポルフィラン、カラヤゴム、ジェランガム、キサンタンガム、ヒアルロン酸、グルコサミン、ガラクトサミン、キチン（あるいはキトサン）、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、リゾチーム、チトクロムC、リボヌクレアーゼ、トリプシンogen、キモトリプシンogen、-キモトリプシン、ポリリシン、ポリアルギニン、ヒ斯顿、プロタミン、オバルブミン、またはデキストリンあるいはシクロデキストリンを含む。いくつかの例では、ナノ粒子はグラフェンコーティングされたナノ粒子を含む。

40

【0348】

場合によっては、ナノ粒子は、約500nm、400nm、300nm、200nm、あるいは100nm未満の少なくとも1つの寸法を有する。

【0349】

いくつかの例では、ナノ粒子製剤は、常磁性ナノ粒子、超常磁性ナノ粒子、金属ナノ粒子、フラーレン様材料、無機ナノチューブ、デンドリマー（共有結合した金属キレートを有するものなど）、ナノファイバー、ナノホーン、ナノオニオン、ナノロッド、ナノロープ、または量子ドットを含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子あるいは結合部分は、ナノ粒子に直接的あるいは間接的に結合される。いくつかの例では、

50

本明細書に記載される少なくとも 1、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、あるいは 100 以上のポリ核酸分子あるいは結合部分は、ナノ粒子に直接的あるいは間接的に結合される。

【0350】

いくつかの実施形態において、医薬製剤は、送達ベクター、例えば、細胞中へのポリ核酸分子の送達のための組換えベクターを含む。いくつかの例では、組換えベクターは DNA プラスミドである。他の例において、組換えベクターは、ウイルスベクターである。例示的なウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、あるいはアルファウイルスに由来したベクターを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子を発現することができる組換えベクターは、標的細胞中での安定した発現をもたらす。さらなる例では、ポリ核酸分子の一時的発現をもたらすウイルスベクターが使用される。10

【0351】

いくつかの実施形態において、医薬製剤は、本明細書に開示される組成物との適合性ならびに所望の剤形の放出プロフィール特性に基づいて選択された担体または担体材料を含む。例示的な担体物質としては、例えば、結合剤、懸濁剤、崩壊剤、充填剤、界面活性剤、可溶化剤、安定化剤、滑沢剤、加湿剤、希釈剤などが含まれる。薬学的に適合可能な担体材料としては、限定されないが、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、マルトデキストリン、グリセリン、ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン (PVP)、コレステロール、コレステロールエステル、カゼイン酸ナトリウム、大豆レシチン、タウロコール酸、ホスファチジルコリン、塩化ナトリウム、リン酸三カルシウム、リン酸二カリウム、セルロースおよびセルロース抱合体、糖ステアロイル乳酸ナトリウム (sugars sodium stearoyl lactylate)、カラギーナン、モノグリセリド、ジグリセリド、化デンプンなどが挙げられる。参考 (例えばレミングトン) : The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa. : Mack Publishing Company, 1995)、Höover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975、Liberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1980、および、Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999).2030

【0352】

いくつかの例では、医薬製剤は、酢酸、ホウ酸、クエン酸、乳酸、リン酸、および、塩酸などの酸；水酸化ナトリウム、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、およびトリスヒドロキシメチルアミノメタンなどの塩基、ならびに、クエン酸塩 / デキストロース、重炭酸ナトリウム、および塩化アンモニウムなどの緩衝剤を含む、pH 調節剤または緩衝剤をさらに含む。このような酸、塩基、および緩衝液は、組成物の pH を許容可能な範囲で維持するのに必要な量で含まれる。40

【0353】

いくつかの例では、医薬製剤は、組成物の浸透圧重量モル濃度を許容範囲にするのに必要な量の 1 以上の塩を含む。こうした塩は、ナトリウム、カリウム、またはアンモニウムのカチオン、ならびに塩化物、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、ホウ酸塩、リン酸塩、炭酸水素塩、硫酸塩、チオ硫酸塩、または重亜硫酸塩のアニオンを含み、適切な塩は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、チオ硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、および、硫酸アンモニウムを含む。

【0354】

10

20

30

40

50

いくつかの例では、希釈液がより安定した環境を提供することができるため、医薬製剤は、化合物を安定化するために使用される希釈液をさらに含む。限定されないが、リン酸緩衝生理食塩水を含む緩衝液中に溶解した塩（pHの制御あるいは維持ももたらす）が、当該技術分野の希釈剤として利用される。特定の例において、希釈剤は、組成物の大きさを増大させて、圧縮を促進するか、またはカプセル充填のための均質な混合のために十分な大きさ（bulk）を作り出す。そのような化合物は、例えば、ラクトース、デンプン、マンニトール、ソルビトール、デキストロース、Avicel（登録商標）などの微結晶性セルロース；リン酸水素カルシウム、リン酸カルシウム二水和物；リン酸三カルシウム、リン酸カルシウム；無水乳糖、噴霧乾燥したラクトース；化デンプン、Diacetyl（登録商標）（Amstair）などの圧縮可能な糖；マンニトール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース・アセタート・ステアラート、スクロース系の希釈剤、粉砂糖；一塩基の硫酸カルシウムー水和物、硫酸カルシウム二水和物；乳酸カルシウム三水和物、デキストラート（dextroses）；加水分解したシリアル固体物、アミロース；粉末セルロース、炭酸カルシウム；グリシン、カオリン；マンニトール、塩化ナトリウム；イノシトール、ベントナイトなどを含む。

【0355】

場合によっては、医薬製剤は、物質の分解または崩壊を促進する崩壊剤（disintegrants or disintegrants）を含む。用語「分解する」は、胃腸液と接触した際の剤形の溶解および分散の両方を含む。崩壊剤の例は、デンプン、例えば、天然のデンプン、例えば、トウモロコシデンプンまたはジャガイモデンプン、化デンプン、例えば、National 1551またはAmijel（登録商標）、またはナトリウムデンブングリコラート、例えば、Promogel（登録商標）またはExplatab（登録商標）、セルロース、例えば、木製品、メチル結晶セルロース、例えばAvicel（登録商標）、Avicel（登録商標）PH101、Avicel（登録商標）PH102、Avicel（登録商標）PH105、Elecema（登録商標）P100、Emcocel（登録商標）、Vivace（登録商標）、Min-Tia（登録商標）、およびSolkafloc（登録商標））、メチルセルロース、クロスカルメロース、または架橋セルロース、例えば、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム（Ac-Di-Sol（登録商標））、架橋カルボキシメチルセルロース、または架橋クロスカルメロースの架橋デンプン、例えば、ナトリウムデンブングリコラート、クロスポビドンなどの架橋ポリマー、架橋ポリビニルピロリドン、アルギン酸塩、例えばアルギン酸またはアルギン酸ナトリウムなどのアルギン酸の塩、Veegum（登録商標）HV（ケイ酸アルミニウムマグネシウム）などの粘土、ゴム、例えば、寒天、グアー、ローカストビーン、カラヤ、ペクチン、またはトラガカント、ナトリウムデンブングリコラート、ベントナイト、天然のスポンジ、界面活性剤、陽イオン交換樹脂などの樹脂、柑橘類のパルプ、ラウリル硫酸ナトリウム、デンプンを組み合わせたラウリル硫酸ナトリウムなど、を含む。

【0356】

いくつかの例では、医薬製剤としては、ラクトース、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、硫酸カルシウム、微結晶性セルロース、セルロース粉末、デキストロース、デキストラート、デキストラン、デンプン、化デンプン、スクロース、キシリトール、ラクチトール、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウム、ポリエチレングリコール、などの充填剤が挙げられる。

【0357】

材料の接着または摩擦を防ぎ、減少させ、あるいは阻害するために、潤滑剤および滑剤が本明細書に記載される医薬製剤に随意にさらに含まれる。典型的な潤滑剤は、例えば、ステアリン酸、水酸化カルシウム、タルク、ナトリウム・ステアリル・フマラート、鉛油などの炭化水素、水素添加大豆油（Sterotex（登録商標））などの硬化植物油、高級脂肪酸、およびアルカリ金属とアルカリ土類金属塩、例えばアルミニウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、ステアリン酸、ステアリン酸ナトリウム、グリセロール、タル

ク、ワックス、Stearowet(登録商標)、ホウ酸、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ロイシン、ポリエチレングリコール(例えばPEG-400)またはメトキシポリエチレン・グリコール、例えばCarbowax(商標)、オレイン酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、ベヘン酸グリセリル、ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸マグネシウムまたはラウリル硫酸ナトリウム、Sylloid(商標)などのコロイダルシリカ、Cabil-O-Sil(登録商標)、トウモロコシデンプンなどのデンプン、シリコーン油、界面活性剤などを含む。

【0358】

可塑剤は、マイクロカプセル化材料またはフィルムコーティングを軟化して、それらの脆性を低減するために使用される化合物を含む。適切な可塑剤は、例えば、PEG300、PEG400、PEG600、PEG1450、PEG3350、およびPEG800などのポリエチレングリコール、ステアリン酸、プロピレングリコール、オレイン酸、トリエチルセルロース、トリアセチンを含む。可塑剤は、分散剤または潤滑剤としても機能する。

10

【0359】

可溶化剤は、トリアセチン、クエン酸トリエチル、オレイン酸エチル、カブリル酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、ドクセートナトリウム(sodium docosate)、ビタミンE TPGS、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、N-ヒドロキシエチルピロリドン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピル・シクロデキストリン、エタノール、n-ブタノール、イソプロピルアルコール、コレステロール、胆汁酸塩、ポリエチレングリコール200-600、グリコフルール、トランスククトール(transcutool)、プロピレングリコール、およびジメチル・イソソルビドなどの化合物を含む。

20

【0360】

安定化剤は、任意の抗酸化剤、緩衝剤、酸、防腐剤などの混合物を含む。

【0361】

懸濁化剤は、例えば、ポリビニルピロリドンK12、ポリビニルピロリドンK17、ポリビニルピロリドンK25、またはポリビニルピロリドンK30などのポリビニルピロリドン、ビニルピロリドン/酢酸ビニル共重合体(S630)、ポリエチレングリコール(例えば、ポリエチレングリコールは、約300～約6000、約3350～約4000、または約7000～約5400の分子量を有する)、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロースアセテートステアレート、ポリソルベート80、ヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ゴム、例えばトラガカントゴム、アラビアゴム、グーゴム、キサンタンガムを含むキサンタン、糖、セルロース化合物、例えばカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリソルベート80、アルギン酸ナトリウム、ポリエトキシル化ソルビタンモノラウレート、ポリエトキシル化ソルビタンモノラウレート、ポビドンなどの化合物を含む。

30

【0362】

サーファクタントは、ラウリル硫酸ナトリウム、ドクセートナトリウム、またはTween 60または80、トリアセチン、ビタミンE TPGS、ソルビタンモノオレアート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート(polyoxyethylene sorbitan monooleate)、ポリソルベート、ポロクサマー(pola xomers)、胆汁酸塩、モノステアリン酸グリセリン、エチレンオキシドおよびプロピレンオキシドのコポリマー、例えば、Pluronics(登録商標)(BASF)などの化合物を含む。付加的な界面活性剤は、ポリオキシエチレン脂肪酸グリセリドおよび植物油(例えば、ポリオキシエチレン(60)水素化ヒマシ油)；および、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとアルキルフェニルエーテル、例えば、オクトキシノール10、オクトキシノール40などを含む。しばしば、界面活性剤は、物理的安定性を高めるために

40

50

、または他の目的のために含まれる。

【0363】

粘度増強剤は、例えば、メチルセルロース、キサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートステアレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタラート、カルボマー、ポリビニルアルコール、アルギン酸塩、アカシア、キトサン、およびこれらの組み合わせを含む。

【0364】

湿潤剤は、オレイン酸、モノステアリン酸グリセリル、モノオレイン酸ソルビタン、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ドクサートナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ドキュセートナトリウム、トリアセチン、T w e e n 8 0 、ビタミンE T P G S 、アンモニウム塩などの化合物を含む。
10

【0365】

治療レジメン

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される医薬組成物は治療用途のために投与される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、1日に一回、1日に2回、1日に3回、またはそれ以上投与される。医薬組成物は、毎日、1日おき、週5日、週1日、1週おき、月2週間、月3週間、月1回、月2回、月3回、またはそれ以上投与される。医薬組成物は、少なくとも1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、18か月、2年、3年、またはそれ以上の間投与される。
20

【0366】

いくつかの実施形態では、1以上の医薬組成物は、同時に、連続して、またはある時間間隔で投与される。いくつかの実施形態では、1以上の医薬組成物は同時に投与される。場合によっては、1つ以上の医薬組成物は連続して投与される。さらなる場合には、1以上の医薬組成物は、ある時間間隔で投与される（例えば、第1の医薬組成物の第1の投与は1日目であり、その後、少なくとも第2の医薬組成物の投与前に少なくとも1、2、3、4、5日またはそれ以上の間隔を空ける）。
30

【0367】

いくつかの実施形態において、2つ以上の様々な医薬組成物は同時投与される。いくつかの例では、2以上の異なる医薬組成物が同時に投与される。場合によっては、2つ以上の異なる医薬組成物が、投与間の間隔なく連続して同時投与される。他の場合には、2つ以上の異なる医薬組成物が、投与間に約0.5時間、1時間、2時間、3時間、12時間、1日、2日の間隔をおいて連続して投与される。

【0368】

患者の状態が改善する場合、医者の判断で、組成物の投与は継続的に行われ；代替的に、投与されている組成物の用量は、一時的に減少されるか、または特定の期間の間一時的に中断される（つまり、「休薬期間」）。いくつかの例では、休薬期間の長さは、ほんの一例として、2日、3日、4日、5日、6日、7日、10日、12日、15日、20日、28日、35日、50日、70日、100日、120日、150日、180日、200日、250日、280日、300日、320日、350日、または365日を含む、2日～1年の間で変わる。休薬日中の投与量の減少は、ほんの一例として、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、あるいは100%を含む、10%～100%である。
40

【0369】

いったん患者の状態が改善すると、必要に応じて維持量が投与される。その後、投与量または投与頻度、あるいはその両方は、症状に応じて、改善された疾患、障害、または疾
50

病が保持されるレベルにまで減少可能である。

【0370】

いくつかの実施形態では、そのような量に相当する所定の薬剤の量は、特定の化合物、疾患の重症度、処置を必要としている被験体または宿主の性質（例えば、体重）などの要因に左右されるが、それにもかかわらず、例えば、投与されている特定の薬剤、投与経路、および処置されている被験体または宿主を含む、症例を取り巻く特定の環境に従って、当該技術分野で既知の方法で日常的に判定される。いくつかの例では、所望の投与量は一回量で、あるいは、同時に（または短時間にわたって）、あるいは適切な間隔を置いて投与された分割量、例えば、1日当たり2、3、あるいは4以上の分割用量（*s u b - d o s e s*）として、都合よく提示される。

10

【0371】

個々の処置レジメンに関する変数の数が大きいため、前述の範囲は単なる示唆的なものに過ぎず、これらの推奨値からかなり逸脱することは珍しいことではない。そのような投与量は、限定されないが、使用される化合物の活性、処置される疾患または疾病、投与の様式、個々の被験体の必要条件、処置されている疾患または疾病の重症度、および医師の判断を含む、多くの変数に依存して変更される。

【0372】

いくつかの実施形態では、こうした治療レジメンの毒性と治療の有効性は、限定されないが、LD50（集団の50%までの致死投与量）と、ED50（集団の50%に治療上有効な投与量）の決定を含む、細胞培養または実験動物における標準的な製薬手順によって決定される。毒性と治療効果との間の用量比が治療指数であり、これは、LD50とED50との間の比率として表される。高い治療指数を示す化合物が好ましい。細胞培養アッセイと動物研究から得られたデータは、ヒトで使用される一連の投与量を製剤化するのに使用される。こうした化合物の投与量は、最小限の毒性を備えるED50を含む一連の循環濃度内に位置するのが好ましい。投与量は、使用される剤形と利用される投与経路に応じて、この範囲内で変わる。

20

【0373】

キット／製品

ある実施形態において、本明細書に記載される1つ以上の組成物および方法とともに使用されるキットおよび製品が本明細書で開示される。このようなキットは、バイアル、チューブなどの1つ以上の容器を収容するために仕切られた運搬装置、包装または容器を含み、各容器は、本明細書中に記載されている方法を使用するための別個の要素の1つを備える。適切な容器は、例えば、ボトル、バイアル、シリング、および試験管を含む。一実施形態において、容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成される。

30

【0374】

本明細書で提供される製品は包装材料を含む。製薬用包装材料の例としては、限定されないが、プリスター・パック、瓶、チューブ、バッグ、容器、瓶、および選択された製剤と意図した投与および処置のモードに適する任意の包装材料が挙げられる。

40

【0375】

例えば、容器は、本明細書に記載される標的核酸分子を含む。そのようなキットは、識別用の記載またはラベル、あるいは本明細書に記載される方法における使用に関する説明書を随意に含む。

【0376】

キットは典型的には、内容物および／または使用説明書を列挙するラベルと、使用説明書を備えた添付文書とを含んでいる。1セットの説明書も典型的に含まれる。

【0377】

一実施形態において、ラベルが容器上にあるか容器に付随する。一実施形態において、ラベルを形成する文字、数字または他の表示が、容器自体に貼り付けられるか、成形されるか、あるいは刻まれている場合は、ラベルは容器上に取付けられる。ラベルは、例えば、添付文書として容器を保持するレセプタクルまたは運搬装置内に存在するとき、容器に

50

付隨する。一実施形態において、ラベルは、内容物が特定の治療用途に用いられるべきものであるということを示すために使用される。ラベルは、例えば、本明細書に記載の方法で、内容物の使用方法も示している。

【0378】

ある実施形態では、医薬組成物は、本明細書で提供される化合物を含む1以上の単位剤形を含有するパックまたはディスペンサーデバイスで提示される。パックは、例えば、ブリスター・パックなどの金属またはプラスチックホイルを含む。一実施形態において、パックまたはディスペンサーデバイスには、投与のための説明書が添付してある。一実施形態において、パックまたはディスペンサーには、医薬品の製造、使用または販売を制御する政府機関によって規定された形態の容器に付属の通知書が添付してあり、この通知書は、ヒトまたは動物の投与のための薬物の形態についての、政府機関の承認を反映するものである。このような通知書は、例えば、処方薬または承認された添付文書に関して、米国食品医薬品局により承認されたラベルである。一実施形態において、適合する製薬担体で製剤化される本明細書で提供される化合物を含む組成物も調製され、適切な容器に入れられ、示された疾病の処置のためにラベル付けされる。

10

【0379】

特定の用語

別段の定めのない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語はすべて、主題が属する当該技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。前述の一般的な記載および以下の詳細な記載は例示的かつ説明的なものに過ぎず、任意の主題に限定されるものではないことが理解されよう。本出願では、単数の使用は、特別に別記しない限り複数を含む。明細書および添付の請求項内で用いられる場合、単数形「a」、「a n」、および「t h e」は、その文脈が明確に他のことを定めていない限り、複数の指示対象を含む。本出願において、「または」の使用は特に明記しない限り、「および/または」を意味する。さらに、用語「含む（i n c l u d i n g ）」の使用は、「含む（i n c l u d e ）」、「含む（i n c l u d e s ）」、および「含まれる（i n c l u d e d ）」といった他の形態と同じく、限定的なものではない。

20

【0380】

本明細書で使用される場合、範囲および量は、「約」特定の値または範囲として表現可能である。「約」は正確な量も含んでいる。したがって、「約5 μL」は、「約5 μL」と「5 μL」も意味する。一般に、用語「約」は、実験誤差内にあると予想される量を含んでいる。

30

【0381】

本明細書に使用される段落の見出しが、組織化するためのものに過ぎず、記載される主題を制限するものと解釈されてはならない。

【0382】

本明細書で使用される場合、用語「個体」、「被験体」、および「患者」は、任意の哺乳動物を意味する。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。いくつかの実施形態では、哺乳動物は非ヒトである。いかなる用語も、保健従事者（例えば、医者、正看護師、臨床看護師、医師助手、看護助手、あるいはホスピスの職員）の監督（例えば、常時または断続的）を特徴とする状況に制限されない。

40

【実施例】

【0383】

これらの実施例は説明目的のために提供されるにすぎず、請求項の範囲を制限するものではない。

【0384】

実施例1。アンチセンスオリゴヌクレオチド配列および合成

【0385】

ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（PMO）、ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド（PS A SO）、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド（A

50

S O) を合成した。

【 0 3 8 6 】

P M O 配列は、 5' G G C C A A A C C T C G G C T T A C C T G A A A T 3' 一級アミン (S E Q I D N O : 2 8) であり、 末端ヌクレオチドが拡張されて図 1 で見られる。 P M O は、 結合のために分子の 3' 末端に C 3 - N H 2 結合ハンドルを含む。 P M O は、 標準的な固相合成プロトコルを使用して固相上で完全に組み立てられ、 H P L C で精製された。

【 0 3 8 7 】

P S A S O 配列は、 アミン - C 6 - G G C C A A A C C U C G G C U U A C C U (S E Q I D N O : 2 9) であり、 末端ヌクレオチドが拡張されて図 2 A - 2 B で見られる。 P S A S O の構造は、 100% のホスホロチオエート結合であるリン酸塩骨格を含み、 リボース糖類はすべて 2' , 2' O M e 修飾を含んでいた。 P S A S O は、 結合のために分子の 5' 末端に C 6 - N H 2 結合ハンドルも含んでいた。 P M O は、 標準的な固相ホスホラミダイト化学を使用して固相上で完全に組み立てられ、 H P L C で精製された。

【 0 3 8 8 】

A S O は、 標準的な固相ホスホラミダイト化学を使用して固相上で完全に組み立てられ、 H P L C で精製された。 A S O は、 結合のために分子の 5' 末端に C 6 - N H 2 結合ハンドルを含んでいた。

【 0 3 8 9 】

実施例 2 : D M D エクソンスキッピングの検出

【 0 3 9 0 】

分化した C 1 C 1 2 細胞における D M D エクソン 2 3 スキッピングを判定するための方法

【 0 3 9 1 】

マウス筋芽細胞 C 2 C 1 2 細胞を、 0.5 m L の 10% F B S R P M I 1640 培地中の 24 ウェルプレートに 50,000 - 100,000 / ウェルで蒔き、 5% の C O 2 を用いて 37 °C で夜通しインキュベートした。 2 日目に、 細胞を分化培地 (2% のウマ血清 R P M I 1640 および 1 μM インスリン) に移し、 3 - 5 日間インキュベートした。 インキュベーション後、 サンプルを加え、 24 時間インキュベートした。 サンプル処理の後、 1 m L の新鮮な培地 (化合物を含まない) をさらに 2 日間、 毎日交換した。 処置開始から 72 時間後に、 細胞を採取した。 In vi Trap RNA 細胞 H T S 96 キット (B - B ridge International # 7061300400) を用いて RNA を単離して、 High Capacity c D N A 逆転写キット (Thermo Fisher # 4368813) を使用して逆転写した。 DreamTaq (商標) P C R マスター ミックス (Thermo Fisher # K1072) を使用して P C R 反応を実施した。 一次 P C R は、 エクソン 2 0 (E x 2 0 F 5' - C A G A A T T C T G C C A A T T G C T G A G) (S E Q I D N O : 3 0) および エクソン 2 6 (E x 2 6 R 5' - T T C T T C A G C T T G T G T C A T C C) (S E Q I D N O : 3 1) におけるプライマーを使用して、 スキッピングされたおよびスキッピングされていない両方の分子を、 表 2 のプロトコルを用いて増幅した。

【 0 3 9 2 】

10

20

30

40

【表2】

表2.PCRプロトコル

ホットスタート	95°Cで2分間
変性	95°Cで0.5分間
プライマーのアニーリング	50°Cで0.5分間
プライマー伸長	72°Cで1分間
最終伸張	72°Cで5分間
サイクルの数	10

10

【0393】

ネステッドPCRについては、一次PCR反応を水で100倍に希釈し、5μlをネステッドPCR反応に使用した(50μlの総反応量)。ネステッドPCRは、エクソン20(Ex20F2: 5'-ACCAGTCTACCACCCTATC)(SEQ ID NO:32)およびエクソン25(Ex25R: 5'-CTCTTTATCTTCTGCCAACCTT)(SEQ ID NO:33)におけるプライマーを使用して、スキッピングされたおよびスキッピングされていない両方の分子を、表3のプロトコルを用いて増幅した。

20

【0394】

【表3】

表3.ネステッドPCRプロトコル

ホットスタート	95°Cで2分間
変性	95°Cで0.5分間
プライマーのアニーリング	50°Cで0.5分間
プライマー伸長	72°Cで1分間
最終伸張	72°Cで5分間
サイクルの数	35

30

【0395】

PCR反応を4%のTAEアガロースゲルを使用して分析した。野生型(WT)のDM生成物は、予想されたサイズの788の塩基対と、575の塩基対のスキッピングされたDMD23とを有していた。

40

【0396】

動物

【0397】

USDA Animal Welfare Actで概説された規則を厳守する、Explora BioLabsのInstitutional Animal Care and Use Committee(IACUC)、ならびに“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”(National Research Council publication, 8th Ed., revised in 2011)に基づくプロトコルに従って、動物研究を実施した。マウスはすべて、Charles River LaboratoriesまたはHarlan Laboratoriesのいずれかから入手した。

50

【0398】

インビボのマウスモデル

【0399】

指示されたアンチセンス抱合体（A S C）および投与量を、静脈内（i v）注射によってW T C D - 1マウス（4 - 6 週齢）に投与した。「ネイキッド」P M OあるいはA S Oを、指示された投与量で筋肉内注射によって投薬した。4、7、あるいは14日後、心臓および肺腹筋の組織を採取して液体窒素で急速凍結した。R N AをT r i z o l and R Ne a s y P l u s 9 6 K i t (Q i a g e n , # 7 4 1 9 2)で単離し、H i g h C a p a c i t y c D N A R e v e r s e t r a n s c r i p t i o n K i t (T h e r m o F i s h e r # 4 3 6 8 8 1 3)を用いて逆転写した。
10 ネステッドP C R反応を記載の通りに実施した。P C R反応を4%のT A Eアガロースゲル中で分析し、デンシトメトリーによって定量化した。

【0400】

処置されたマウスのエクソン23スキッピングを確認するために、D N Aフラグメントを4%のアガロースゲルから単離して配列決定した。

【0401】

スキッピングされたD M D m R N Aのコピー数を定量的に決定するために、q P C Rプライマー／プローブセットを設計して、スキッピングされたおよびW T D M D m R N A（図3）を定量化した。表4で見られるような設計されたP C Rプライマーを使用し、P C Rによって、q P C R定量化標準を設計および生成した。W TおよびD M Dのためのq P C R標準については、P C R後に、733の塩基対フラグメントをアガロースゲルから単離した。スキッピングされたD M Aのq P C R標準については、ネステッドプライマーを使用した。
20

【0402】

q P C Rプライマー／プローブの増幅効率は、予想された効率の10%以内であると判定された。q P C R反応を、メーカーの説明書に従って、Q u a n t S t u d i o 7 およびT a q m a n (商標) P C R U n i v e r s a l M a s t e r m i x I I (T h e r m o F i s h e r # 4 4 4 0 0 4 1)で実施した。

【0403】

【表4】

表4.

	SEQ ID NO	プライマー/ プローブ	配列
Ex23スキッピングのためのDMD Δ-23	34	フォワードプライマー	5' GCGCTATCAGGAGACAATGAG
	35	リバースプライマー	5' GTTTTATGTGATTCTGTAATTCCC
	36	プローブ	5' CTCTCTGTACCTTATCTTAGTGTT
WT DMDのみのためのDMD Ex22-23	37	フォワードプライマー	5' TGGAGGAGAGACTCGGGAAA
	38	リバースプライマー	5' TTGAAGCCATTTGTTGCTCTT
	39	プローブ	5' ACAGGCTCTGCAAAGT
全てのDMDためのDMD Ex20-21	40	フォワードプライマー	5' AACAGATGACAACACTGCGAAA
	41	リバースプライマー	5' TTGGCTCTGATAAGGTGGTAGAC
	42	プローブ	5' CTTGTTGAAAACCC
WT及び全てのDMD qPCR標準	43	フォワードプライマー	5' TGAGGGTGTTAATGCTGAAAGTA
	44	リバースプライマー	5' CACCAACTGGGAGGAAAGTT

【0404】

実施例3：抱合体合成

【0405】

分析および精製方法

【0406】

分析および精製方法を表5-11に従って実施した。

【0407】

【表5】

表5. サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）方法

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）方法	カラム	移動相	流量
方法1	TOSOH Biosciences, TSKgelG3000SW XL, 7.8 X 300 mm, 5 μM	150 mM のリン酸塩緩衝液	1.0 mL/分 for 20 分
方法2	TOSOH Biosciences, TSKgelG3000SW, 21.5 X 600 mm, 5 μM	PBS pH 7.4	1.0 mL/分 for 180 分

【0408】

10

20

30

40

【表6】

表6. 疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）方法1

カラム	溶媒	勾配		
		カラム 体積	%A	%B
GE, HiScreen Butyl HP, 4.7 mL	溶媒 A: 50 mM のリン酸塩緩衝液, 0.8M の硫酸アンモニウム, pH 7.0 溶媒 B: 80%の 50 mM のリン酸塩緩衝液, 20%の IPA, pH 7.0 流量: 1.0 mL/分	1.00 30 5	95 0 0	5 100 100

10

【0409】

【表7】

表7. 疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）方法2

カラム	溶媒	勾配		
		時間	%A	%B
Thermo Scientific, MAbPac HIC-20, 4.6 mm ID X 10 cm, 5 um	溶媒 A: 100 mM のリン酸塩緩衝液, 1.8 M の硫酸アンモニウム, pH 7.0 溶媒 B: 80% 100 mM のリン酸塩緩衝液, 20%の IPA, pH 7.0 流量: 0.7 mL/分	0.00 2.00 22.00 25.00 26.00 30.00	100 100 0 0 100 100	0 0 100 100 0 0

20

【0410】

【表8】

表8. 疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）方法3

カラム	溶媒	勾配		
		カラム 体積	%A	%B
GE, HiScreen Butyl HP, 4.7 mL	溶媒 A: 50 mM のリン酸塩緩衝液, 0.8 M の硫酸アンモニウム, pH 7.0 溶媒 B: 80%の 50 mM のリン酸塩緩衝液, 20%の IPA, pH 7.0 流量: 1.0 mL/分	1 25 1 2	100 0 0 0	0 80 100 100

30

【0411】

【表9】

表9. 疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 方法4

カラム	溶媒	勾配		
		時間	%A	%B
Thermo Scientific, MAbPac HIC-20, 4.6 mm ID X 10 cm, 5 um	溶媒 A: 100 mM のリン酸塩緩衝液, 1.8 M の硫酸アンモニウム, pH 7.0 溶媒 B: 80%の 100 mM のリン酸塩緩衝液, 20%の IPA, pH 7.0 流量: 0.5 mL/分	0.00 5.00 20.00 25.00 26.00 30.00	100 100 0 0 100 100	0 0 100 100 0 0

10

【0412】

【表10】

表10. 強力な陰イオン交換クロマトグラフィー (SAX) 方法1

カラム	溶媒	勾配		
		カラム 体積	%A	%B
Tosoh Bioscience, TSKGel SuperQ- 5PW, 21.5 mm ID X 15 cm, 13 um	溶媒 A: 20 mM の TRIS buffer, pH 8.0; 溶媒 B: 20 mM の TRIS, 1.5 M の NaCl, pH 8.0 流量: 6.0 mL/分	0.5 0.5 17 0.5 0.5	100 80 20 0 0	0 20 80 100 100

20

【0413】

【表11】

表11. 強力な陰イオン交換クロマトグラフィー (SAX) 方法2

カラム	溶媒	勾配		
		時間	%A	%B
Thermo Scientific, ProPac (商標) SAX-10, Bio LC (商標), 4 X 250 mm	溶媒 A: 80%の 10 mM の TRIS pH 8, 20% のエタノール 溶媒 B: 80%の 10 mM の TRIS pH 8, 20% のエタノール, 1.5 M の NaCl 流量: 0.75 mL/分	0.0 3.00 17.00 21.00 22.00 25.00	90 90 0 0 90 90	10 10 100 100 10 10

30

【0414】

抗トランスフェリン受容体抗体

【0415】

使用された抗マウストランスフェリン受容体抗体あるいは抗CD71 mAbは、マウスCD71またはマウストランスフェリン受容体1(mTfR1)を結合するラットIgG2aサブクラスモノクローナル抗体であった。抗体はBiologixによって産生され、市販で入手可能である(カタログ# BE0175)。

40

【0416】

抗CD71抗体モルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチド抱合体(抗CD71 mAb - PMO)

【0417】

抗CD71 mAb - PMO抱合体

【0418】

50

水中に4当量のトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)を加えて、4時間37°Cでインキュベートすることによって、ホウ酸塩緩衝液(25mMの四ホウ酸ナトリウム、25mMのNaCl、1mMのジエチレントリアミンペニタ酢酸、pH8.0)中の抗CD71抗体(10mg/mL)を還元した。DMSO中の10当量のSMCC(10mg/mL)を用いてDMSO中のPMO(50mg/mL)を1時間インキュベートすることにより、4(N-メチルマレイミド)シクロヘキサンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SMCC)を、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(PMO)の3'末端で一级アミンに結合させた。3kDaのMWCOを有するAmicon Ultra-15遠心濾過機ユニットを使用した限外濾過により、非結合SMCCを除去した。PMO-SMCCを、緩衝酢酸溶液(10mMの酢酸ナトリウム、pH6.0)で3回洗浄して、すぐに使用した。還元された抗体を、2.25当量のPMO-SMCCと混合し、4°Cで夜通しインキュベートした。その後、反応混合物のpHを7.5まで減らし、8当量のN-エチルマレイミドを室温で30分間にわたって混合物に加えて、未反応のシステインをクエンチした。疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)方法2による反応混合物の分析は、未反応の抗体およびPMOと共に、抗体-PMO抱合体を示した(図4)。図4は、HIC方法2で產生された抗CD71 mAb-PMO反応混合物のクロマトグラムを示しており、遊離抗体ピーク(1)、遊離PMO(2)、DAR 1(3)、DAR 2(4)、DAR 3(5)、DAR > 3(6)を示している。「DAR」は薬物対抗体比を指す。括弧の中の数はクロマトグラムのピークを指す。

10

20

【0419】

精製

【0420】

HIC方法1を使用して、AKTA Explorer FPLCで反応混合物を精製した。1(DAR1)と2(DAR2)の薬物対抗体比を有する抱合体を含む画分を組み合わせ、2を超えるDARを有する抱合体とは別に、50kDaのMWCOを有するAmicon Ultra15遠心濾過機ユニットで濃縮した。濃縮抱合体を、分析のために、Amicon Ultra15遠心濾過機ユニットを使用して、PBS(pH7.4)と緩衝液交換した。

【0421】

精製された抱合体の分析

30

【0422】

単離させた抱合体を、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)およびHICで特徴づけた。高分子量の凝集塊と非結合PMOが存在しないことを確認するために、SEC方法1を使用した(図5A-5C)。図5Aは、SEC方法1を使用して產生された抗CD71 mAbのクロマトグラムを示す。図5Bは、SEC方法1を使用して產生された抗CD71 mAb-PMO DAR 1および2のクロマトグラムを示す。図5Cは、SEC方法1を使用して產生された2を超える抗CD71 mAb-PMO DARのクロマトグラムを示す。「DAR」は薬物対抗体比を指す。

【0423】

HIC方法2を使用して分析的HPLCによって、抱合体の純度を評価した(図6A-6C)。図6Aは、HIC方法2を使用して產生された抗CD71 mAbのクロマトグラムを示す。図6Bは、HIC方法2を使用して產生された抗CD71 mAb-PMO

DAR 1および2抱合体のクロマトグラムを示す。図6Cは、HIC方法2を使用して產生された抗CD71 mAb-PMO DAR > 2抱合体のクロマトグラムを示す。各サンプルの260/280nmのUV吸光度比率を、PMOと抗体の既知の比率の標準曲線と比較して、DARを確認した。DAR 1および2のサンプルは~1.6の平均DARを有していたが、2を超えるDARのサンプルは~3.7の平均DARを有していた。「DAR」は薬物対抗体比を指す。

【0424】

抗CD71Fabモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチド抱合体(抗CD71 F

50

a b - P M O)

【 0 4 2 5 】

ペプシンによる抗体消化

【 0 4 2 6 】

20 mM の緩衝酢酸溶液 (pH 4 . 0) 中の抗 C D 7 1 抗体 (5 mg / mL) を、 37 °C で 3 時間、固定されたペプシンを用いてインキュベートした。樹脂を取り除き、反応混合物を、 30 kDa の MWCO を有する Amicon Ultra 15 遠心濾過機ユニットを使用して、 PBS (pH 7 . 4) で洗浄した。残留物を集めて、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 方法 2 を使用して精製し、 F (a b ') 2 フラグメントを単離した。

10

【 0 4 2 7 】

抗 C D 7 1 (F a b) - P M O 抱合体

【 0 4 2 8 】

水中に 10 当量の TCEP を加えて、 37 °C で 2 時間インキュベートすることによって、ホウ酸塩緩衝液 (pH 8 . 0) 中の F (a b ') 2 フラグメント (15 mg / mL) を還元した。DMSO 中の 10 当量の SMCC (10 mg / mL) を用いて DMSO 中の PMO (50 mg / mL) を 1 時間インキュベートすることにより、 SMCC を PMO の 3' 末端の一級アミンに加えた。30 kDa の MWCO を有する Amicon Ultra - 15 遠心濾過機ユニットを使用した限外濾過により、非結合 SMCC を除去した。PMO - SMCC を、緩衝酢酸溶液 (pH 6 . 0) で 3 回洗浄してすぐに使用した。10 kDa の MWCO を有する Amicon Ultra 15 遠心濾過機ユニットを使用して、還元された F (a b ') フラグメント (F a b) をホウ酸塩緩衝液 (pH 8 . 0) へと緩衝液交換し、 1 . 75 当量の PMO - SMCC を加えて、 4 °C で夜通しインキュベートした。その後、反応混合物の pH を 7 . 5 まで減らし、 6 当量の N - エチルマレイミドを室温で 30 分間にわたって混合物に加えて、未反応のシステインをクエンチした。疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 方法 3 による反応混合物の分析は、未反応の F a b とともに抗 C D 7 1 (F a b) - PMO 抱合体を示した (図 14 a)。図 7 A は、 HIC 方法 3 を使用した抗 C D 7 1 F a b - PMO の FPLC 精製のクロマトグラムを示す。

20

【 0 4 2 9 】

精製

30

【 0 4 3 0 】

HIC 方法 3 を使用して、 AKTA Explorer FPLC で反応混合物を精製した。1、2、および 3 の DAR の抱合体を含む画分を組み合わせて、別々に濃縮した。濃縮抱合体を、分析の前に、 10 kDa の MWCO を有する Amicon Ultra 15 遠心濾過機ユニットを使用して、 PBS (pH 7 . 4) と緩衝液交換した。

【 0 4 3 1 】

精製された抱合体の分析

【 0 4 3 2 】

単離させた抱合体を SEC と HIC で特徴づけた。高分子量の凝集塊および未結合 PMO が存在しないことを確認するために、 SEC 方法 1 を使用した。図 7 B - 図 7 E を参照する。図 7 B は、 SEC 方法 1 を使用して產生された抗 C D 7 1 F a b のクロマトグラムを示す。図 7 C は、 SEC 方法 1 を使用して產生された抗 C D 7 1 F a b - PMO DAR 1 抱合体のクロマトグラムを示す。図 7 D は、 SEC 方法 1 を使用して產生された抗 C D 7 1 F a b - PMO DAR 2 抱合体のクロマトグラムを示す。図 7 E は、 SEC 方法 1 を使用して產生された抗 C D 7 1 F a b - PMO DAR 3 抱合体のクロマトグラムを示す。HIC 方法 4 を使用した分析的 HPLC によって、抱合体の純度を評価した。図 7 F - 図 7 I を参照。図 7 F は、 HIC 方法 4 を使用して產生された抗 C D 7 1 F a b のクロマトグラムを示す。図 7 G は、 HIC 方法 4 を使用して產生された抗 C D 7 1 F a b - PMO DAR 1 抱合体のクロマトグラムを示す。図 7 H は、 HIC 方法 4 を使用して產生された抗 C D 7 1 F a b - PMO DAR 2 抱合体のクロマトグラムを

40

50

示す。図7 Iは、HIC方法4を使用して產生された抗CD71 Fab - PMO DAR3抱合体のクロマトグラムを示す。「DAR」は薬物対抗体比を指す。各サンプルの260 / 280 nmのUV吸光度比率を、PMOとFabの既知の比率の標準曲線と比較して、DARを確認した。

【0433】

抗CD71抗体ホスホチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド抱合体（抗CD71 mAb - PS ASO）

【0434】

抗CD71 mAb - PS ASO

【0435】

水中に4当量のTCEPを加えて、4時間37°Cでインキュベートすることにより、ホウ酸塩緩衝液(pH8.0)中の抗CD71(10mg/mL)を還元した。DMSO中の10当量のSMCC(10mg/mL)を有する250mMのPB(pH7.5)およびDMSOの1:1混合物においてPS ASO(50mg/mL)を1時間インキュベートすることにより、4(N-マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SMCC)を、PS-ASOの5'末端の一級アミンに加えた。3kDaのMWCOを有するAmicon Ultra-15遠心濾過機ユニットを使用した限外濾過により、非結合SMCCを除去した。PS ASO-SMCCを、緩衝酢酸溶液(pH6.0)で3回洗浄してすぐに使用した。還元された抗体を、1.7当量のPS ASO-SMCCと混合して、4°Cで夜通しインキュベートした。その後、反応混合物のpHを7.4まで減らし、8当量のN-エチルマレイミドを室温で30分間にわたって混合物に加えて、未反応のシステインをクエンチした。強力な陰イオン交換クロマトグラフィー(SAX)方法2による反応混合物の分析は、未反応の抗体およびASOと共に抗体-PS ASO抱合体を示した(図8A)。図8Aは、SAX方法2で產生された抗CD71 mAb-PS ASO反応混合物のクロマトグラムを示しており、遊離抗体ピーク(1)、遊離PS ASO(5)、DAR1(2)、DAR2(3)、DAR>2(4)を示している。「DAR」は薬物対抗体比を指す。括弧の中の数はピークを指す。

【0436】

精製

【0437】

SAX方法1を使用して、AKTA Explorer FPLCで反応混合物を精製した。1、2、および3の薬物対抗体比(DAR)の抱合体を含む画分を組み合わせて、別々に濃縮し、分析の前に、50kDaのMWCOを有するAmicon Ultra 15遠心濾過機ユニットを使用して、PBS(pH7.4)で緩衝液交換した。

【0438】

精製された抱合体の分析

【0439】

単離させた抱合体を、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)およびSAXで特徴づけた。高分子量の凝集塊と非結合ASOが存在しないことを確認するために、サイズ排除クロマトグラフィー方法1を使用した。図8B-図8Eを参照する。図8Bは、SEC方法1を使用して產生された抗CD71 mAbのクロマトグラムを示す。図8Cは、SEC方法1を使用して產生された抗CD71 mAb-PS ASO DAR1抱合体のクロマトグラムを示す。図8Dは、SEC方法1を使用して產生された抗CD71 mAb-PS ASO DAR2抱合体のクロマトグラムを示す。図8Eは、SEC方法1を使用して產生された抗CD71 mAb-PS ASO DAR3抱合体のクロマトグラムを示す。抱合体の純度を、SAX方法2を使用した分析的HPLCによって評価した。図8F-図8Hを参照する。図8Fは、SAX方法2を使用して產生された抗CD71 mAb-PS ASO DAR1抱合体のクロマトグラムを示す。図8Gは、SAX方法2を使用して產生された抗CD71 mAb-PS ASO DAR2抱合体のクロマトグラムを示す。図8Hは、SAX方法2を使用して產生された抗CD71 mAb-PS ASO DAR3抱合体のクロマトグラムを示す。

10

20

30

40

50

ラムを示す。図 8 H は、SAX 方法 2 を使用して產生された抗 CD71 mAb - PS ASO DAR3 抱合体のクロマトグラムを示す。各サンプルの 260 / 280 nm の UV 吸光度比率を、ASO と抗体の既知の比率の標準曲線と比較して、薬物対抗体比 (DAR) を確認した。

【0440】

実施例 4：抗 CD71 mAb - PMO 抱合体のインビトロ活性

【0441】

実施例 3 に記載されるように、抗 CD71 mAb - PMO 抱合体が作られ、特徴づけられた。実施例 2 と同様の方法を使用するネステッド PCR を利用して、分化した C2C12 細胞においてインビトロのエクソンスキッピングを媒介する能力について抱合体を評価した。簡潔に言えば、「ネイキッド」モルホリノ ASO ('PMO') の効能を、関連するビヒクル対照を用いて、複数の濃度の抗 CD71 mAb - PMO 抱合体と比較した。対照はビヒクル ('Veh')、50 uM のスクランブル・モルホリノ ('Scr50') を含んでおり、抗体 ('Neg - Ab') は含んでいなかった。使用した PMO の濃度は、50 uM、1 uM、および 0.02 uM を含んでいた。使用した抗 CD71 mAb - PMO DAR 1 および 2 の濃度は、200 nM、20 nM、および 2 nM を含んでいた。「DAR」は薬物対抗体比を指す。

10

【0442】

cDNA 合成後に、2 回の PCR 増幅（一次 PCR およびネステッド PCR）を使用して、エクソンスキッピングを検出した。PCR 反応を 4 % の TAE アガロースゲル中で分析した（図 9）。

20

【0443】

図 9 を参照すると、抗 CD71 mAb - PMO 抱合体は、分化した C2C12 細胞において、「ネイキッド」PMO 対照よりも低い濃度の、測定可能なエクソン 23 スキッピングをもたらした。野生型の生成物は、予想されたサイズの 788 の塩基対と、575 の塩基対のスキッピングされた DMD 23 とを有していた。

【0444】

別の実験は、抗 CD71 Fab - PMO 抱合体と、陰性対照として抗 EGFR ('Z - PMO') で標的化された PMO を含んでいた（図 10）。使用した PMO の濃度は、10 uM と 2 uM を含んでいた。使用した抗 CD71 mAb - PMO の濃度は、0.2 uM と 0.04 uM を含んでいた。抗 CD71 mAb - PMO は 2 の DAR を有していた。Z - PMO は 0.2 uM の濃度で使用され、2 の DAR を有していた。抗 CD71 Fab - PMO の濃度は 0.6 uM と 0.12 uM を含んでいた。0.6 uM および 0.12 uM の抗 CD71 mAb - PMO の 1、2、および、3 の DAR を分析した。

30

【0445】

図 10 を参照すると、トランスフェリン受容体、抗 CD71 mAb - PMO、および抗 CD71 Fab - PMO 抱合体を利用する受容体を媒介とする取り込みは、C2C12 細胞において、「ネイキッド」PMO 対照よりも低い濃度の、測定可能なエクソン 23 スキッピングをもたらした。抗 CD71 抱合体からスキッピングをもたらした試験濃度において、Z - PMO からの測定可能なエクソン 23 スキッピングはなかった。

40

【0446】

実施例 5。抗 - CD71 - ASO mAb PS 抱合体のインビトロ活性

【0447】

実施例 3 に記載されるように、抗 CD71 mAb - PS ASO 抱合体を作り、特徴づけた。実施例 2 に記載される方法と同様の方法を使用し、ネステッド PCR を利用して、分化した C2C12 細胞においてインビトロのエクソンスキッピングを媒介する能力について抱合体を評価した。簡潔に言えば、「ネイキッド」ホスホロチオエート ASO (PS ASO) の効能を、関連するビヒクル対照を用いて、複数の濃度の抗 CD71 mAb - PS ASO 抱合体と比較した。cDNA 合成後に、2 回の PCR 増幅（一次 PCR とネステッド PCR）を実施して、エクソンスキッピングを検出した。PCR 反応を 4 %

50

の T A E アガロースゲル中で分析した(図 11)。図 11 は、PMO、ASO、DAR1 の結合した抗 CD71 mAb - ASO(「ASC - DAR1」)、DAR2 の結合した抗 CD71 mAb - ASO(「ASC - DAR2」)、および、DAR3 の結合した抗 CD71 mAb - ASO(「ASC - DAR3」)のアガロースゲルを示す。「PMO」および「ASO」は、(抗体に結合していない)遊離 PMO および ASO を指す。「veh」はビヒクルのみを指す。試験した濃度は、0.2、1、および 5 マイクロモル(μM)を含んでいた。

【0448】

図 11 を参照すると、抗 CD71 mAb - PS ASO 抱合体は、分化した C2C12 細胞において、「ネイキッド」PS ASO 対照よりも低い濃度の、測定可能なエクソン 23 スキッピングをもたらした。野生型の生成物は、予想されたサイズの 788 の塩基対と、575 の塩基対のスキッピングされた DMD 23 を有していた。

10

【0449】

実施例 6：抗 CD71 mAb - PMO 抱合体のインビボ活性

【0450】

実施例 3 に記載されるように、抗 CD71 mAb - PMO 抱合体を作り、特徴づけた。抱合体抗 CD71 mAb - PMO DAR1、2 および抗 CD71 mAb - PMO DAR > 2 を、実施例 2 に記載される方法と同様の方法を用いて、野生型の CD-1 マウスにおけるインビボのエクソンスキッピングを媒介するその能力について評価した。「DAR」は薬物対抗体比を指す。

20

【0451】

表 12 で提供される投与量で、静脈内(i.v.)注射によって、mAb、ビヒクル対照、およびアンチセンス抱合体(ASC)をマウスに投与した。「DAR」は薬物対抗体比を指す。「ネイキッド」PMO を、表 12 に提供される投与量で、筋肉内注射によって腓腹筋へと投与した。4、7、あるいは 14 日後、心臓および腓腹筋の組織を採取して液体窒素で急速凍結した。RNA を単離し、逆転写し、ネステッド PCR 反応を実施した。PCR 反応を 4% の TAE アガロースゲル中で分析し、デンシトメトリーによって定量化した。

【0452】

【表 12】

30

表 12. インビボの試験デザイン

群	試験物	N	mAb 用量 (mg/kg)	PMO 用量 (mg/kg)	PMO: mAb 比 (mol/mol)	採取時間 (h)
1	抗 CD71 mAb-PMO, DAR1,2	3	50	4.8	1.6	96
2	抗 CD71 mAb-PMO, DAR1,2	3	50	4.8	1.6	168
3	抗 CD71 mAb-PMO, DAR1,2	3	50	4.8	1.6	336
4	抗 CD71 mAb-PMO, DAR>2	3	50	10.5	3.7	96
5	抗 CD71 mAb-PMO, DAR>2	3	50	10.5	3.7	168
6	抗 CD71 mAb-PMO, DAR>2	3	50	10.5	3.7	336
7	抗 CD71 mAb	3	50			96
8	抗 CD71 mAb	3	50			168
9	抗 CD71 mAb	3	50			336
10	PMO	3	40 ug/inj.			96
11	PMO	3	40 ug/inj.			168
12	PMO	3	40 ug/inj.			336
13	ビヒクル	3				96
14	ビヒクル	3				168
15	ビヒクル	3				336

【0453】

50

図12Aは、4、7、あるいは14日間の、抗CD71のmAb - PMO DAR1、2、抗CD71のmAb - PMO DAR>2、抗CD71のmAb、PMO、およびビヒクルを投与されたマウスからの腓腹筋サンプルのゲル電気泳動を示す。野生型の生成物は、予想されたサイズの788の塩基対と、575の塩基対のスキッピングされたDMD 23とを有していた。抗CD71のmAb - PMO DAR1、2、および抗CD71のmAb - PMO DAR>は、腓腹筋において、「ネイキッド」PMO対照よりも低い濃度の、測定可能なエクソン23スキッピングをもたらした。ゲル上のバンドの強度(図12A)は、図12Bで見られるデンシトメトリーによって定量化された。図12Cは、Taqlman qPCRを使用した、野生型のマウス腓腹筋におけるインビボのエクソンスキッピングの定量化を示す。

10

【0454】

図13Aは、4、7、あるいは14日間の、抗CD71のmAb - PMO DAR1、2、抗CD71のmAb - PMO DAR>2、抗CD71のmAb、PMO、およびビヒクルを投与されたマウスから的心臓サンプルのゲル電気泳動を示す。野生型の生成物は、予想されたサイズの788の塩基対と、575の塩基対のスキッピングされたDMD 23とを有していた。ゲル上のバンドの強度(図13A)は、図13Bで見られるデンシトメトリーによって定量化された。腓腹筋サンプルを用いても同様の結果が得られた。抗CD71のmAb - PMO DAR1、2、および抗CD71のmAb - PMO DAR>は、腓腹筋において、「ネイキッド」PMO対照よりも低い濃度の、測定可能なエクソン23スキッピングをもたらした。

20

【0455】

その後、DNAフラグメントを、4%のアガロースゲルから単離して配列決定した。配列決定データは、図14で見られるスキッピングされた野生型の生成物における、適切な配列を確認した。

【0456】

実施例7。配列

【0457】

表13は、本明細書に記載される組成物および方法を使用して、DMD遺伝子の挿入、欠失、複製、あるいは変化を誘発するための、例示的な標的配列を示す。表14は、本明細書に記載される組成物および方法を使用して、DMD遺伝子の挿入、欠失、複製、あるいは変化を誘発するための、例示的なスクレオチド配列を示す。表15および表16は、遺伝子の挿入、欠失、複製、あるいは変化を誘発するための、いくつかの遺伝子における例示的な標的配列を示す。表17は、本明細書に記載される組成物および方法を使用して、遺伝子の挿入、欠失、複製、あるいは変化を誘発するためのDMD遺伝子の配列を含む、例示的な配列を説明する。

30

【0458】

【表13】

表13.

標的エクソン	アンチセンス配列	SEQ ID NO.
19	5' GCCUGAGCUGAUCUGCUGGCAUCUUGCAGUU 3'	45
19又は20	5'GCAGAAUUCGAUCCACCGGCUGUUCAAGCCUGAGC UGAUCUGCUCGCAUCUUGCAGU3'	46
20	5' CAGCAGUAGUUGUCAUCUGCUC 3'	47
21	5' CACAAAGUCUGCAUCCAGGAACAUGGGUC 3'	48
22	5' CUGCAAUUCCCGAGUCUCUGC 3'	49
51	5' CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC 3'	50
52	5' UCCAACUGGGACGCCUCUGUUCCAAUCC 3'	51

40

【0459】

【表14-1】

表14.

遺伝子	標的位置	ヌクレオチド配列(5'-3')	SEQ ID NO.
DMD	H8A(-06+18)	GAUAGGUGGUUAUCAACAAUCUGUAA	52
DMD	H8A(-03+18)	GAUAGGUGGUUAUCAACAAUCUG	53
DMD	H8A(-07+18)	GAUAGGUGGUUAUCAACAAUCUGUAG	54
DMD	H8A(-06+14)	GGUGGUUAUCAACAAUCUGUAA	55
DMD	H8A(-10+10)	GUAUCAACAAUCUGUAGCAC	56
DMD	H7A(+45+67)	UGCAUGUUCCAGUCGUUGUGUGG	57
DMD	H7A(+02+26)	CACUAUUCAGUAAAAGGUCUGG	58
DMD	H7D(+15-10)	AUUUACCAACCUUCAGGAUCGAGUA	59
DMD	H7A(-18+03)	GGCCUAAAACACAUACACAUA	60
DMD	C6A(-10+10)	CAUUUUGACCUACAUUGUGG	61
DMD	C6A(-14+06)	UUUGACCUACAUUGUGGAAAG	62
DMD	C6A(-14+12)	UACAUUUUGACCUACAUUGUGGAAAG	63
DMD	C6A(-13+09)	AUUUUGACCUACAUUGGGAAAG	64
DMD	CH6A(+69+91)	UACGAGUUGAUUGUCGGACCCAG	65
DMD	C6D(+12-13)	GUGGUCUCCUUACCUAUGACUGUGG	66
DMD	C6D(+06-11)	GGUCUCCUUACCUAUGA	67
DMD	H6D(+04-21)	UGUCUCAGUAUCUUCUUACCUAU	68
DMD	H6D(+18-04)	UCUUACCUAUGACUAUGGAUGAGA	69
DMD	H4A(+13+32)	GCAUGAACCUUUGUGGACCU	70
DMD	H4D(+04-16)	CCAGGGUACUACUUACAUUA	71
DMD	H4D(-24-44)	AUCGUGUGUCACAGCAUCCAG	72
DMD	H4A(+11+40)	UGUUCAGGGCAUGAACCUUUGUGGAUCCUU	73
DMD	H3A(+30+60)	UAGGAGGCCCUCCCCAUCCUGUAGGUACUG	74
DMD	H3A(+35+65)	AGGUCUAGGAGGCACCUUACCUUAGGU	75
DMD	H3A(+30+54)	GCGCCUCCCAUCCUGUAGGUACUG	76
DMD	H3D(+46-21)	CUUCGAGGAGGUCUAGGAGGCGCCUC	77
DMD	H3A(+30+50)	CUCCCAUCCUGUAGGUACUG	78
DMD	H3D(+19-03)	UACCAGUUUUGCCUGUCAGG	79
DMD	H3A(-06+20)	UCAAUAUGCUGCUUCCCCAACUGAAA	80
DMD	H3A(+37+61)	CUAGGAGGCACCUUACCUUAGGU	81
DMD	H5A(+20+50)	UU AUGAUUUCCAUCUACGAUGUCAGUACUUC	82
DMD	H5D(+25-05)	CUUACCUGCCAGUGGAGGAUUAUUCAAA	83
DMD	H5D(+10-15)	CAUCAGGAUCUUAACCUUCCAGUGG	84
DMD	H5A(+10+34)	CGAUGUCAGUACUUCCAAUAUUCAC	85
DMD	H5D(-04-21)	ACCAUUAUCAGGAUUCU	86
DMD	H5D(+16-02)	ACCUGCCAGUGGAGGAU	87
DMD	H5A(-07+20)	CCAAUAAUCACUAAAUCACCUUAA	88
DMD	H5D(+18-12)	CAGGAUUGUUACCUGCCAGUGGAGGAUUAU	89
DMD	H5A(+05+35)	ACGAUGUCAGUACUUCCAAUAUUCAC	90
DMD	H5A(+15+45)	AUUUCCAUCUACGAUGUCAGUACUUCCAAUA	91
DMD	H10A(-05+16)	CAGGAGCUUCCAAAUGCUGCA	92

10

20

30

40

【0460】

【表 14 - 2】

DMD	H10A(-05+24)	CUUGUCUUCAGGAGCUUCCAAAUGCUGCA	93
DMD	H10A(+98+119)	UCCUCAGCAGAAAGAAGGCCACG	94
DMD	H10A(+130+149)	UUAGAAAUCUCUCCUUGUGC	95
DMD	H10A(-33-14)	UAAAUUGGGUGUUACACAAU	96
DMD	H11D(+26+49)	CCCUGAGGCAUCCCCAUUUGAAU	97
DMD	H11D(+11-09)	AGGACUUACUUGCUUUGUUU	98
DMD	H11A(+118+140)	CUUGAAUUUAGGAGAUUCAUCUG	99
DMD	H11A(+75+97)	CAUCUUCUGAUAAUUUUCUGUU	100
DMD	H12A(+52+75)	UCUUCUGUUUUGUUAGCCAGUCA	101
DMD	H12A(-10+10)	UCUAUGUAAACUGAAAAUUU	102
DMD	H12A(+11+30)	UUCUGGAGAUCCAUAACAAAC	103
DMD	H13A(+77+100)	CAGCAGUUGCGUGAUCUCCACUAG	104
DMD	H13A(+55+75)	UUCAUCAACUACCACCAU	105
DMD	H13D(+06-19)	CUAAGCAAAUAACUGACCUUAAG	106
DMD	H14A(+37+64)	CUUGUAAAAGAACCCAGCGGUUCUGU	107
DMD	H14A(+14+35)	CAUCUACAGAUGUUUGCCCAUC	108
DMD	H14A(+51+73)	GAAGGAUGUCUUGUAAAAGAAC	109
DMD	H14D(-02+18)	ACCUGUUCUUCAGUAAGACG	110
DMD	H14D(+14-10)	CAUGACACACCUGUUCUUCAGUAA	111
DMD	H14A(+61+80)	CAUUUGAGAAGGAUGUCUUG	112
DMD	H14A(-12+12)	AUCUCCCAAUACCUGGAGAAGAGA	113
DMD	H15A(-12+19)	GCCAUGCACUAAAAGGCACUGCAAGACAUU	114
DMD	H15A(+48+71)	UCUUUAAAGCCAGUUGUGUGAAUC	115
DMD	H15A(+08+28)	UUUCUGAAAGCCAUGCACUAA	116
DMD	H15D(+17-08)	GUACAUACGGCCAGUUUUUGAAGAC	117
DMD	H16A(-12+19)	CUAGAUCCGCUUUAAAACCUGUAAAACAA	118
DMD	H16A(-06+25)	UCUUUUCUAGAUCCGCUUUAAAACCUGUUA	119
DMD	H16A(-06+19)	CUAGAUCCGCUUUAAAACCUGUUA	120
DMD	H16A(+87+109)	CCGUCUUCUGGGUCACUGACUUA	121
DMD	H16A(-07+19)	CUAGAUCCGCUUUAAAACCUGUUA	122
DMD	H16A(-07+13)	CCGCUUUAAAACCUGUUA	123
DMD	H16A(+12+37)	UGGAUUGCUUUUCUUUCUAGAUCC	124
DMD	H16A(+92+116)	CAUGCUUCCGUCUUCUGGGUCACUG	125
DMD	H16A(+45+67)	GAUCUUGUUUGAGUGAAUACAGU	126
DMD	H16A(+105+126)	GUUAUCCAGCCAUGCUUCCGUC	127
DMD	H16D(+05-20)	UGAUAAUUGGUACUACUAACCUGUG	128
DMD	H16D(+12-11)	GUAUCACUAACCUGUGUGCUAC	129
DMD	H19A(+35+53)	CUGCUGGCAUCUUGCAGUU	130
DMD	H19A(+35+65)	GCCUGAGCUGAUCUGCUGGCAUCUUGCAGUU	131
DMD	H20A(+44+71)	CUGGCAGAAUUCGAUCCACCGGCUGUUC	132
DMD	H20A(+147+168)	CAGCAGUAGUUGUCAUCUGCUC	133
DMD	H20A(+185+203)	UGAUGGGGUGGGUGGGUUGG	134
DMD	H20A(-08+17)	AUCUGCAUUAACACCCUCUAGAAAG	135
DMD	H20A(+30+53)	CCGGCUGUUCAGUUGUUCUGAGGC	136
DMD	H20A(-11+17)	AUCUGCAUUAACACCCUCUAGAAAGAAA	137
DMD	H20D(+08-20)	GAAGGAGAAGAGAUUCUACCUUACAAA	138

【0461】

【表 1 4 - 3】

DMD	H20A(+44+63)	AUUCGAUCCACCGGCUGUUC	139
DMD	H20A(+149+168)	CAGCAGUAGUUGUCAUCUGC	140
DMD	H21A(-06+16)	GCCGGUUGACUUCAUCCUGUGC	141
DMD	H21A(+85+106)	CUGCAUCCAGGAACAAUGGGUCC	142
DMD	H21A(+85+108)	GUCUGCAUCCAGGAACAAUGGGUC	143
DMD	H21A(+08+31)	GUUGAAGAACUGAUAGCCGGUUGA	144
DMD	H21D(+18-07)	UACUUACUGUCUGUAGCUCUUUCU	145
DMD	H22A(+22+45)	CACUCAUGGUCUCCUGAUAGCGCA	146
DMD	H22A(+125+106)	CUGCAAUCCCCGAGUCUCUGC	147
DMD	H22A(+47+69)	ACUGCUGGACCCAUGGUCCUGAUG	148
DMD	H22A(+80+101)	CUAAGUUGAGGUUAUGGAGAGU	149
DMD	H22D(+13-11)	UAUUCACAGACCUGCAAUUCCCC	150
DMD	H23A(+34+59)	ACAGUGGUGCUGAGAUAGUAUAGGCC	151
DMD	H23A(+18+39)	UAGGCCACUUUGUUGCUCUUGC	152
DMD	H23A(+72+90)	UUCAGAGGGCGCUUUCUUC	153
DMD	H24A(+48+70)	GGGCAGGCCAUUCCUCCUUCAGA	154
DMD	H24A(-02+22)	UCUUCAGGGUUUGUAUGUGAUUCU	155
DMD	H25A(+9+36)	CUGGGCUGAAUUGUCUGAAUUAUCUG	156
DMD	H25A(+131+156)	CUGUUGGCACAUGUGAUCCCACUGAG	157
DMD	H25D(+16-08)	GUCUAUACCUGUUGGCACAUGUGA	158
DMD	H26A(+132+156)	UGCUUUCUGUAAUUCAUUCUGGAGUU	159
DMD	H26A(-07+19)	CCUCCUUUCUGGCAUAGACCUUCCAC	160
DMD	H26A(+68+92)	UGUGUCAUCCAUUCGGUGCAUCUCUG	161
DMD	H27A(+82+106)	UUAAGGCCUCUUGUGCUACAGGUGG	162
DMD	H27A(-4+19)	GGGGCUCUUCUUUAGCUCUCUGA	163
DMD	H27D(+19-03)	GACUUCAAAGCUUGCAUUUC	164
DMD	H28A(-05+19)	GCCAACAUGCCAAACUCCUAAG	165
DMD	H28A(+99+124)	CAGAGAUUCCUCAGCUCCGCCAGGA	166
DMD	H28D(+16-05)	CUUACAUUAGCACCUUCAGAG	167
DMD	H29A(+57+81)	UCCGCCAUCUGUUAGGGUCUGUGCC	168
DMD	H29A(+18+42)	AUUUGGGUUUAUCCUCUGAAUGUCGC	169
DMD	H29D(+17-05)	CAUACCUCUUCAUGUAGUUC	170
DMD	H30A(+122+147)	CAUUUGAGCUGCGUCCACCUUGUCUG	171
DMD	H30A(+25+50)	UCCUGGGCAGACUGGAUGCUCUGUUC	172
DMD	H30D(+19-04)	UUGCCUGGGCUUCCUGAGGCAUU	173
DMD	H31D(+06-18)	UUCUGAAAACAUUAUACCUGUGC	174
DMD	H31D(+03-22)	UAGUUUCUGAAAACAUUAUACCUG	175
DMD	H31A(+05+25)	GACUUGUCAAAUCAGAUUGGA	176
DMD	H31D(+04-20)	GUUUCUGAAAACAUUAUACCUGU	177
DMD	H32D(+04-16)	CACCAGAAAACAUACCACA	178
DMD	H32A(+151+170)	CAAUGAUUAGCUGUGACUG	179
DMD	H32A(+10+32)	CGAACUUCAUGGAGACAUUUG	180
DMD	H32A(+49+73)	CUUGUAGACGCUGCUAAAUGGC	181
DMD	H33D(+09-11)	CAUGCACACACCUCUUGCUCC	182
DMD	H33A(+53+76)	UCUGUACAAUCUGACGUCCAGUCU	183
DMD	H33A(+30+56)	GCUUUUAUCACCAUUUCCACUUCAGAC	184

【0 4 6 2】

10

20

30

40

【表 14 - 4】

DMD	H33A(+64+88)	CCGUCUGCUUUUCUGUACAAUCUG	185
DMD	H34A(+83+104)	UCCAUAUCUGUAGCUGCCAGCC	186
DMD	H34A(+143+165)	CCAGGCAACUUCAGAAUCCAAAU	187
DMD	H34A(-20+10)	UUUCUGUUACCUGAAAAGAAUUAUAUGAA	188
DMD	H34A(+46+70)	CAUUCAUUCCUUUCGCAUCUUACG	189
DMD	H34A(+95+120)	UGAUCUCUUUGUCAAUUCCAAUAUCUG	190
DMD	H34D(+10-20)	UUCAGUGAUAUAGGUUUACCUUCCCCAG	191
DMD	H34A(+72+96)	CUG UAG CUG CCA GCC AUU CUG UCA AG	192
DMD	H35A(+141+161)	UCU UCU GCU CGG GAG GUG ACA	193
DMD	H35A(+116+135)	CCA GUU ACU AUU CAG AAG AC	194
DMD	H35A(+24+43)	UCU UCA GGU GCA CCU UCU GU	195
DMD	H36A(+26+50)	UGUGAUGUGGUCCACAUUCUGGUCA	196
DMD	H36A(-02+18)	CCAUGUGUUUCUGGUAUUCC	197
DMD	H37A(+26+50)	CGUGUAGAGUCCACCUUUGGGCGUA	198
DMD	H37A(+82+105)	UACUAAUUUCUGCAGUGGUCAACC	199
DMD	H37A(+134+157)	UUCUGUGUGAAAUGGCUGCAAAUC	200
DMD	H38A(-01+19)	CCUUCAAAGGAAUGGGAGGCC	201
DMD	H38A(+59+83)	UGCUGAAUUCAGCCUCCAGUGGUU	202
DMD	H38A(+88+112)	UGAAGUCUUCCUCUUUCAGAUUCAC	203
DMD	H39A(+62+85)	CUGGUUUUCUCUCAUCUGUGAUUC	204
DMD	H39A(+39+58)	GUUGUAAGUUGUCUCCUCUU	205
DMD	H39A(+102+121)	UUGUCUGUAACAGCUGCUGU	206
DMD	H39D(+10-10)	GCUCUAAUACCUUUGAGAGCA	207
DMD	H40A(-05+17)	CUUUGAGACCUAAUCCUGUU	208
DMD	H40A(+129+153)	CUUUAUUUCCUUUCAUCUCUGGGC	209
DMD	H42A(-04+23)	AUCGUUUCUUCACGGACAGUGUGCUGG	210
DMD	H42A(+86+109)	GGGCUUGUGAGACAUGAGUGAUUU	211
DMD	H42D(+19-02)	ACCUUCAGAGGACUCCUCUUGC	212
DMD	H43D(+10-15)	UAUGUGUUACCUACCCUUGUCGGUC	213
DMD	H43A(+101+120)	GGAGAGAGCUUCCUGUAGCU	214
DMD	H43A(+78+100)	UCACCCUUUCCACAGGCGUUGCA	215
DMD	H44A(+85+104)	UUUGUGUCUUCUGAGAAC	216
DMD	H44D(+10-10)	AAAGACUUACCUAAAGAUAC	217
DMD	H44A(-06+14)	AUCUGUAAAUCGCCUGCAG	218
DMD	H46D(+16-04)	UUACCUUGACUUGCUCAAGC	219
DMD	H46A(+90+109)	UCCAGGUUCAAGUGGGAUAC	220
DMD	H47A(+76+100)	GCUCUUCUGGGCUUAUGGGAGCACU	221
DMD	H47D(+25-02)	ACCUUUAUCCACUGGAGAUUUGUCUGC	222
DMD	H47A(-9+12)	UUCCACCAGUAACUGAAACAG	223
DMD	H50A(+02+30)	CCACUCAGAGCUCAGAUCUUCUAACUCC	224
DMD	H50A(+07+33)	CUUCCACUCAGAGCUCAGAUCUUCUAA	225
DMD	H50D(+07-18)	GGGAUCCAGUAUACUUACAGGCUCC	226
DMD	H51A(-01+25)	ACCATGAGAACAGUCUGAGUAGGAGC	227
DMD	H51D(+16-07)	CUCAUACCUCUGCUUGAUGAUC	228
DMD	H51A(+111+134)	UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUC	229
DMD	H51A(+61+90)	ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG	230

【0463】

10

20

30

40

【表 1 4 - 5】

DMD	H51A(+66+90)	ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	231
DMD	H51A(+66+95)	CUCCAACAUCAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	232
DMD	H51D(+08-17)	AUCAUUUUUCUCAUACCUUCUGCU	233
DMD	H51A/D(+08-17)	AUCAUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG	234
DMD	&(-15+)	GAGCUAAA	235
DMD	H51A(+175+195)	CACCCACCAUCACCCUCUGUG	236
DMD	H51A(+199+220)	AUCAUCUGUUGAUUAUCCUCAA	237
DMD	H52A(-07+14)	UCCUGCAUUGUUGCCUGUAAG	238
DMD	H52A(+12+41)	UCCAACUGGGGACGCCUCUGUCCAAUCC	239
DMD	H52A(+17+37)	ACUGGGGACGCCUCUGUCCAA	240
DMD	H52A(+93+112)	CCGUAAUGAUUGUUCUAGCC	241
DMD	H52D(+05-15)	UGUUAAAAAACUUACUUCGA	242
DMD	H53A(+45+69)	CAUCAACUGUUGCCUCCGGUUCUG	243
DMD	H53A(+39+62)	CUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG	244
DMD	H53A(+39+69)	CAUCAACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG	245
DMD	H53D(+14-07)	UACUAACCUUGGUUCUGUGA	246
DMD	H53A(+23+47)	CUGAAGGUGUUCUUGUACUUCAUCC	247
DMD	H53A(+150+176)	UGUAUAGGGACCCUCCUCCAUGACUC	248
DMD	H53D(+20-05)	CUAACCUUGGUUCUGUGAUUUUCU	249
DMD	H53D(+09-18)	GGUAUCUUUGAUACUAACCUUGGUUC	250
DMD	H53A(-12+10)	AUUCUUUCAACUAGAAUAAAAG	251
DMD	H53A(-07+18)	GAUUCUGAAUUCUUCAACUAGAAU	252
DMD	H53A(+07+26)	AUCCCACUGAUUCUGAAUUC	253
DMD	H53A(+124+145)	UUGGCUCUGGCCUGGUCCUAAGA	254
DMD	H46A(+86+115)	CUCUUUCCAGGUUCAAGUGGGAUACUAGC	255
DMD	H46A(+107+137)	CAAGCUUUUCUUUUAGUUGCUGCUCUUUCC	256
DMD	H46A(-10+20)	UAUUCUUUUGUUCUUCUAGCCUGGAGAAAG	257
DMD	H46A(+50+77)	CUGCUUCCUCCAACCAAAAACAAUUC	258
DMD	H45A(-06+20)	CCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCUGUAA	259
DMD	H45A(+91+110)	UCCUGUAGAAUACUGGCAUC	260
DMD	H45A(+125+151)	UGCAGACCUCUCCUGCCACCGCAGAUUCA	261
DMD	H45D(+16-04)	CUACCUCUUUUUCUGUCUG	262
DMD	H45A(+71+90)	UGUUUUUGAGGAUUGCUGAA	263

* 最初の文字は種（例えば、H : ヒト、M : ネズミ、C : イヌ）を示す。「#」は標的DMDエクソン番号を示す。「A／D」は、エクソンの始めと終わりの受容体あるいはドナースプライシング部位をそれぞれ示す。（x y）はアニーリングの座標を表し、「-」あるいは「+」はそれぞれイントロン配列またはエクソン配列を示す。

【0 4 6 4】

10

20

30

【表15】

表15.

遺伝子	ヌクレオチド配列(5' - 3')	SEQ ID NO.
Bcl-x	TGGTTCTTACCCAGCCGCCG	264
β-グロビン 623	GTTATTCTTAGAATGGTGC	265
β-グロビン 654	TGCTATTACCTAACCCAGA	266
c-myc	CTGTGCTTACCGGGTTTCCACCTCCC	267
c-myc	ATCGTCGTGACTGTCTGTTGGAGGG	268
c-myc	GCTCACGTTGAGGGGCATCG	269
c-myc	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	270
c-myc	GGGGCAUCGUCGUGACUGU/CUGUUGGAGGG	271
c-myc	CGUCGUGACUGUCUGUUGGAGG	272
c-myc	CGTCGTGACTGTCTGTTGGAGG	273
c-myc	GGCAUCGUCGCGGGAGGCUGCUGGAGCG	274
c-myc	CCCGCACAUAGGACGGAGAGCAGAGCCC	275
c-myc	ACTGTGAGGGCGATCGCTGC	276
c-myc	ACGATGAGTGGCATAGTCGC	277
c-myc	GGCATCGTCGCGGGAGGCTG	278
c-myc	GGGCATCGTCGCGGGAGGCT	279
c-myc	GGGGCATCGTCGCGGGAGGC	280
c-myc	AGGGGCATCGTCGCGGGAGG	281
c-myc	GAGGGGCATCGTCGCGGGAG	282
c-myc	TGAGGGGCATCGTCGCGGG	283
c-myc	TTGAGGGGCATCGTCGCGGG	284
c-myc	GTTGAGGGGCATCGTCGCG	285
c-myc	CGTTGAGGGGCATCGTCGCG	286
c-myc	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	287
c-myc	AACGTTGAGGGGCATCGTCG	288
c-myc	TAACGTTGAGGGGCATCGTC	289
c-myc	CTAACGTTGAGGGGCATCGT	290
c-myc	GCTAACGTTGAGGGGCATCG	291
c-myc	AGCTAACGTTGAGGGGCATC	292
c-myc	AAGCTAACGTTGAGGGGCAT	293
c-myc	GAAGCTAACGTTGAGGGGC	294
BCL-2 (ラット)	CTCCGCAATGCTGAAAGGTG	295
PCNA-1 (ラット)	GGCGUGCCUAAACAUGGUGGC	296

10

20

30

【0465】

40

【表16-1】

表16.

遺伝子	標的位置	ヌクレオチド配列(5'-3')	SEQ ID NO.
ラット c-myc	2553-79	CTGTGCTTACCGGGTTTCCACCTCCC	297
ラット c-myc	4140-64	ATCGTCGTGACTGTCTGTTGGAGGG	298
ラット c-myc	4161-80	GCTCACGTTGAGGGGCATCG	299
ラット CYP3A2	1155-74	GGTCACTCACCGGTAGAGAA	300
ラット CYP3A2	1526-45	GGGTTCCAAGTCTATAAAGG	301
ヒトアンドロゲン受容体エクソン2	31-44	TGTGTCTTTCCAG	302
ヒトアンドロゲン受容体エクソン2	45-67	TTTGGAGACTGCCAGGGACCATG	303
ヒトアンドロゲン受容体エクソン2	48-67	CATGGTCCCTGGCAGTCTCC	304
ヒトアンドロゲン受容体エクソン2	45-80	TCAATGGGCAAAACATGGTCCCTGGCAGTCTCCAAA	305
ヒトアンドロゲン受容体エクソン3	28-43	TTTGTGTTCTCCCAG	306
ヒトアンドロゲン受容体エクソン3	44-66	GGAAACAGAACAGTACCTGTGCGCC	307
ヒトアンドロゲン受容体エクソン3	49-66	GGCGCACAGGTACTTCTG	308
ヒトアンドロゲン受容体エクソン3	44-79	AATCATTCTGCTGGCGCACAGGTACTTCTGTTCC	309
ヒトHCG-βサブユニット	1321-38	CCCCTGCAGCACGCCGGT	310
ヒトHCG-βサブユニット	1321-57	GAGGCAGGGCCGGCAGGACCCCTGCAGCACGCCGGT	311
ヒトc-myc	4506-25	GGCATCGTCGCGGGAGGCTG	312
ヒトc-myc	4507-26	GGGCATCGTCGCGGGAGGCT	313
ヒトc-myc	4508-27	GGGGCATCGTCGCGGGAGGC	314
ヒトc-myc	4509-28	AGGGGCATCGTCGCGGGAGG	315
ヒトc-myc	4510-29	GAGGGGCATCGTCGCGGGAG	316
ヒトc-myc	4511-30	TGAGGGGCATCGTCGCGGGGA	317
ヒトc-myc	4512-31	TTGAGGGGCATCGTCGCGGG	318
ヒトc-myc	4513-32	GTTGAGGGGCATCGTCGCGG	319
ヒトc-myc	4514-33	CGTTGAGGGGCATCGTCGCG	320
ヒトc-myc	4515-34	ACGTTGAGGGGCATCGTCG	321
ヒトc-myc	4516-35	AACGTTGAGGGGCATCGTCG	322

【0466】

【表 16 - 2】

ヒト c-myc	4517-36	TAACGTTGAGGGGCATCGTC	323
ヒト c-myc	4518-37	CTAACGTTGAGGGGCATCGT	324
ヒト c-myc	4519-38	GCTAACGTTGAGGGGCATCG	325
ヒト c-myc	4520-39	AGCTAACGTTGAGGGGCATC	326
ヒト c-myc	4521-40	AAGCTAACGTTGAGGGGCAT	327
ヒト c-myc	4522-41	GAAGCTAACGTTGAGGGGCA	328
ヒト c-myc	6656-75	TCCTCATCTTCTTGTTCCTC	329
ヒト c-myc	6656-91	AACAAACATCGATTCTCCTCATCTTCTTGTTCCTC	330
ヒト p53	11691-708	CCCGGAAGGCAGTCTGGC	331
ヒト p53	11689-724	TCCTCCATGGCAGTGACCCGGAAGGCAGTCTGGCTG	332
ヒト abl (bcr-abl 融点の ds)	376-94	CTACTGGCCGCTGAAGGGC	333
ヒト abl (bcr-abl 融点の ds)	374-409	GCTCAAAGTCAGATGCTACTGGCCGCTGAAGGGCTT	334
HW-1 rev	5517-43	TCGTCGGTCTCTCCGCTTCTTCTTGCC	335
HW-1 rev	7885-7904	CTCTGGTGGTGGGTAAAGGGT	336
HW-1 rev	7885-7921	CGGGTCTGTCGGGTTCCCTCTGGTGGTGGTAAGGGT	337
ラット c-myc	4140-69	GGGGCAUCGUCGUGACUGUCUGUUGGAGGG	338
ラット c-myc	4141-62	CGUCGUGACUGUCUGUUGGAGG	339
ラット c-myc	4141-62	CGTCGTGACTGTCTGTTGGAGG	340
ヒト c-myc	4498-4505	GGCAUCGUCGCGGGAGGCUG/CUGGAGCG	341
ラット c-myc	4364-91	CCCGCGACAUAGGACGGAGAGCAGAGCCC	342

【0467】

10

20

【表17-1】

表17.

標的	ヌクレオチド配列(5' - 3')	SEQ ID NO.
Hu.DMD.エクソン 44.25.001	CTGCAGGTAAAAGCATATGGATCAA	343
Hu.DMD.エクソン 44.25.002	ATCGCCTGCAGGTAAAAGCATATGG	344
Hu.DMD.エクソン 44.25.003	GTCAAATGCCTGCAGGTAAAAGCA	345
Hu.DMD.エクソン 44.25.004	GATCTGTCAAATGCCTGCAGGTAA	346
Hu.DMD.エクソン 44.25.005	CAACAGATCTGTCAAATGCCTGCA	347
Hu.DMD.エクソン 44.25.006	TTTCTAACAGATCTGTCAAATCGC	348
Hu.DMD.エクソン 44.25.007	CCATTCTCAACAGATCTGTCAAAT	349
Hu.DMD.エクソン 44.25.008	ATAATGAAAACGCCGCCATTCTCA	350
Hu.DMD.エクソン 44.25.009	AAATATCTTATATCATAATGAAAAA	351
Hu.DMD.エクソン 44.25.010	TGTTAGCCACTGATTAAATATCTTT	352
Hu.DMD.エクソン 44.25.011	AAACTGTTCAGCTCTGTTAGCCAC	353
Hu.DMD.エクソン 44.25.012	TTGTGTCTTCTGAGAAACTGTTCA	354
Hu.DMD.エクソン 44.25.013	CCAATTCTCAGGAATTGTGTCTTT	355
Hu.DMD.エクソン 44.25.014	GTATTTAGCATGTTCCCAATTCTCA	356
Hu.DMD.エクソン 44.25.015	CTTAAGATACCATTGTATTAGCA	357
Hu.DMD.エクソン 44.25.016	CTTACCTTAAGATACCATTGTATT	358
Hu.DMD.エクソン 44.25.017	AAAGACTTACCTTAAGATACCATT	359
Hu.DMD.エクソン 44.25.018	AAATCAAAGACTTACCTTAAGATAC	360
Hu.DMD.エクソン 44.25.019	AAAACAAATCAAAGACTTACCTTAA	361
Hu.DMD.エクソン 44.25.020	TCGAAAAAACAAATCAAAGACTTAC	362
Hu.DMD.エクソン 45.25.001	CTGTAAGATACCAAAAAAGGCAAAAC	363
Hu.DMD.エクソン 45.25.002	CCTGTAAGATACCAAAAAAGGCAAAA	364
Hu.DMD.エクソン 45.25.002.2	AGTTCCCTGTAAGATACCAAAAAGGC	365
Hu.DMD.エクソン 45.25.003	GAGTCCTGTAAGATACCAAAAAGG	366

【0468】

10

20

30

40

【表17-2】

Hu.DMD.エクソン 45.25.003.2	CCTGGAGTTCCCTGTAAGATACCAA	367
Hu.DMD.エクソン 45.25.004	TCCTGGAGTTCCCTGTAAGATACCAA	368
Hu.DMD.エクソン 45.25.004.2	GCCATCCTGGAGTTCCCTGTAAGATA	369
Hu.DMD.エクソン 45.25.005	TGCCATCCTGGAGTTCCCTGTAAGAT	370
Hu.DMD.エクソン 45.25.005.2	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCCTGTA	371
Hu.DMD.エクソン 45.25.006	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCCTGT	372
Hu.DMD.エクソン 45.25.006.2	GCTGCCAATGCCATCCTGGAGTTC	373
Hu.DMD.エクソン 45.25.007	CGCTGCCAATGCCATCCTGGAGTT	374
Hu.DMD.エクソン 45.25.008	AACAGTTGCCGCTGCCAATGCCA	375
Hu.DMD.エクソン 45.25.008.2	CTGACAACAGTTGCCGCTGCCAA	376
Hu.DMD.エクソン 45.25.009	GTTGCATTCAATGTTCTGACAACAG	377
Hu.DMD.エクソン 45.25.010	GCTGAATTATTCTCCCCAGTTGC	378
Hu.DMD.エクソン 45.25.010.2	ATTATTCTCCCCAGTTGCATTCA	379
Hu.DMD.エクソン 45.25.011	GGCATCTTTTGAGGATTGCTGA	380
Hu.DMD.エクソン 45.25.011.2	TTTGAGGATTGCTGAATTATTCTT	381
Hu.DMD.エクソン 45.25.012	AATTTTCCTGTAGAATACTGGCAT	382
Hu.DMD.エクソン 45.25.012.2	ATACTGGCATCTTTTGAGGATT	383
Hu.DMD.エクソン 45.25.013	ACCGCAGATTCAAGGCTTCCAATT	384
Hu.DMD.エクソン 45.25.013.2	AATTTTCCTGTAGAATACTGGCAT	385
Hu.DMD.エクソン 45.25.014	CTGTTGCAGACCTCCTGCCACCGC	386
Hu.DMD.エクソン 45.25.014.2	AGATTCAAGGCTTCCAATTTCCT	387
Hu.DMD.エクソン 45.25.015	CTCTTTCTGTCTGACAGCTGTT	388
Hu.DMD.エクソン 45.25.015.2	ACCTCCTGCCACCGCAGATTCAAGG	389
Hu.DMD.エクソン 45.25.016	CCTACCTCTTTCTGTCTGACAG	390
Hu.DMD.エクソン 45.25.016.2	GACAGCTGTTGCAGACCTCCTGCC	391
Hu.DMD.エクソン 45.25.017	GTCGCCCTACCTCTTTCTGTCT	392

10

20

30

40

【0469】

【表17-3】

Hu.DMD.エクソン 45.25.018	GATCTGTCGCCCTACCTCTTTTTC	393
Hu.DMD.エクソン 45.25.019	TATTAGATCTGTCGCCCTACCTCTT	394
Hu.DMD.エクソン 45.25.020	ATTCCATTAGATCTGTCGCCCTAC	395
Hu.DMD.エクソン 45.20.001	AGATACCAAAAAGGCAAAAC	396
Hu.DMD.エクソン 45.20.002	AAGATACCAAAAAGGCAAAA	397
Hu.DMD.エクソン 45.20.003	CCTGTAAGATAACCAAAAGG	398
Hu.DMD.エクソン 45.20.004	GAGTCCTGTAAGATAACCA	399
Hu.DMD.エクソン 45.20.005	TCCTGGAGTTCCCTGTAAGAT	400
Hu.DMD.エクソン 45.20.006	TGCCATCCTGGAGTTCCCTGT	401
Hu.DMD.エクソン 45.20.007	CCCAATGCCATCCTGGAGTT	402
Hu.DMD.エクソン 45.20.008	CGCTGCCAATGCCATCCTG	403
Hu.DMD.エクソン 45.20.009	CTGACAACAGTTGCCGCTG	404
Hu.DMD.エクソン 45.20.010	GTTGCATTCAATGTTCTGAC	405
Hu.DMD.エクソン 45.20.011	ATTATTCCTCCCCAGTTGC	406
Hu.DMD.エクソン 45.20.012	TTTGAGGATTGCTGAATTAT	407
Hu.DMD.エクソン 45.20.013	ATACTGGCATCTGTTTTGA	408
Hu.DMD.エクソン 45.20.014	AATTTTCCTGTAGAATACT	409
Hu.DMD.エクソン 45.20.015	AGATTCAAGGCTTCCAATT	410
Hu.DMD.エクソン 45.20.016	ACCTCCTGCCACCGCAGATT	411
Hu.DMD.エクソン 45.20.017	GACAGCTTTGCAGACCTC	412
Hu.DMD.エクソン 45.20.018	CTCTTTTCTGTCTGACAG	413
Hu.DMD.エクソン 45.20.019	CCTACCTCTTTCTGTCT	414
Hu.DMD.エクソン 45.20.020	GTCGCCCTACCTCTTTTC	415
Hu.DMD.エクソン 45.20.021	GATCTGTCGCCCTACCTCTT	416
Hu.DMD.エクソン 45.20.022	TATTAGATCTGTCGCCCTAC	417
Hu.DMD.エクソン 45.20.023	ATTCCATTAGATCTGTCGC	418

【表17-4】

Hu.DMD.エクソン 46.25.001	GGGGGATTGAGAAAATAAAATTAC	419
Hu.DMD.エクソン 46.25.002	ATTTGAGAAAATAAAATTACCTTGA	420
Hu.DMD.エクソン 46.25.002.2	CTAGCCTGGAGAAAGAAGAATAAAA	421
Hu.DMD.エクソン 46.25.003	AGAAAATAAAATTACCTTGACTTGC	422
Hu.DMD.エクソン 46.25.003.2	TTCTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAA	423
Hu.DMD.エクソン 46.25.004	ATAAAATTACCTTGACTTGCTCAAG	424
Hu.DMD.エクソン 46.25.004.2	TTTTGTTCTTAGCCTGGAGAAAG	425
Hu.DMD.エクソン 46.25.005	ATTACCTTGACTTGCTCAAGCTTT	426
Hu.DMD.エクソン 46.25.005.2	TATTCTTTGTTCTTAGCCTGGA	427
Hu.DMD.エクソン 46.25.006	CTTGACTTGCTCAAGCTTTCTTT	428
Hu.DMD.エクソン 46.25.006.2	CAAGATATTCTTTGTTCTTAGC	429
Hu.DMD.エクソン 46.25.007	CTTTAGTTGCTGCTCTTCCAGG	430
Hu.DMD.エクソン 46.25.008	CCAGGTTCAAGTGGATACTAGCAA	431
Hu.DMD.エクソン 46.25.008.2	ATCTCTTGAAATTCTGACAAGATA	432
Hu.DMD.エクソン 46.25.009	AGCAATGTTATCTGCTTCCTCCAAC	433
Hu.DMD.エクソン 46.25.009.2	AACAAATTCAATTAAATCTCTTTGA	434
Hu.DMD.エクソン 46.25.010	CCAACCATAAAACAAATTCAATTAA	435
Hu.DMD.エクソン 46.25.010.2	TTCCTCCAACCATAAAACAAATTCA	436
Hu.DMD.エクソン 46.25.011	TTTAAATCTCTTGAAATTCTGACA	437
Hu.DMD.エクソン 46.25.012	TGACAAGATATTCTTTGTTCTTCT	438
Hu.DMD.エクソン 46.25.012.2	TTCAAGTGGATACTAGCAATGTTA	439
Hu.DMD.エクソン 46.25.013	AGATATTCTTTGTTCTTAGCCT	440
Hu.DMD.エクソン 46.25.013.2	CTGCTCTTCCAGGTTCAAGTGGG	441
Hu.DMD.エクソン 46.25.014	TTCTTTGTTCTTAGCCTGGAGA	442
Hu.DMD.エクソン 46.25.014.2	CTTTCTTTAGTTGCTGCTCTTT	443
Hu.DMD.エクソン 46.25.015	TTGTTCTCTAGCCTGGAGAAAGAA	444

【0471】

【表17-5】

Hu.DMD.エクソン 46.25.016	CTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAATA	445
Hu.DMD.エクソン 46.25.017	AGCCTGGAGAAAGAAGAATAAAATT	446
Hu.DMD.エクソン 46.25.018	CTGGAGAAAGAAGAATAAAATTGTT	447
Hu.DMD.エクソン 46.20.001	GAAAGAAGAATAAAATTGTT	448
Hu.DMD.エクソン 46.20.002	GGAGAAAGAAGAATAAAATT	449
Hu.DMD.エクソン 46.20.003	AGCCTGGAGAAAGAAGAATA	450
Hu.DMD.エクソン 46.20.004	CTTCTAGCCTGGAGAAAGA	451
Hu.DMD.エクソン 46.20.005	TTGTTCTCTAGCCTGGAGA	452
Hu.DMD.エクソン 46.20.006	TTCTTTGTTCTTAGCCT	453
Hu.DMD.エクソン 46.20.007	TGACAAGATATTCTTTGTT	454
Hu.DMD.エクソン 46.20.008	ATCTCTTGAAATTCTGACA	455
Hu.DMD.エクソン 46.20.009	AACAAATTCAATTAAATCTC	456
Hu.DMD.エクソン 46.20.010	TTCCTCCAACCATAAAACAA	457
Hu.DMD.エクソン 46.20.011	AGCAATGTTATCTGCTTCCT	458
Hu.DMD.エクソン 46.20.012	TTCAAGTGGGATACTAGCAA	459
Hu.DMD.エクソン 46.20.013	CTGCTTTTCCAGGTTCAA	460
Hu.DMD.エクソン 46.20.014	CTTTCTTTAGTTGCTGCT	461
Hu.DMD.エクソン 46.20.015	CTTGACTTGCTCAAGCTTT	462
Hu.DMD.エクソン 46.20.016	ATTACCTTGACTTGCTCAAG	463
Hu.DMD.エクソン 46.20.017	ATAAAATTACCTTGACTTGC	464
Hu.DMD.エクソン 46.20.018	AGAAAATAAAATTACCTTGA	465
Hu.DMD.エクソン 46.20.019	ATTTGAGAAAATAAAATTAC	466
Hu.DMD.エクソン 46.20.020	GGGGGATTGAGAAAATAAA	467
Hu.DMD.エクソン 47.25.001	CTGAAACAGACAAATGCAACACGT	468
Hu.DMD.エクソン 47.25.002	AGTAAC TGAAACAGACAAATGCAAC	469
Hu.DMD.エクソン 47.25.003	CCACCAGTA ACTGAAACAGACAAAT	470

【0472】

10

20

30

40

【表17-6】

Hu.DMD.エクソン 47.25.004	CTCTTCCACCACTGAAACTGAAACAGA	471
Hu.DMD.エクソン 47.25.005	GGCAACTCTTCCACCACTGAAACTGAA	472
Hu.DMD.エクソン 47.25.006	GCAGGGGCAACTCTTCCACCACTGAA	473
Hu.DMD.エクソン 47.25.007	CTGGCGCAGGGCAACTCTTCCACC	474
Hu.DMD.エクソン 47.25.008	TTTAATTGTTGAGAATTCCCTGGC	475
Hu.DMD.エクソン 47.25.008.2	TTGTTTGAGAATTCCCTGGCGCAGG	476
Hu.DMD.エクソン 47.25.009	GCACGGGTCTCCAGTTCATTTAA	477
Hu.DMD.エクソン 47.25.009.2	TCCAGTTTCATTTAATTGTTGAGA	478
Hu.DMD.エクソン 47.25.010	GCTTATGGGAGCACTTACAAGCACG	479
Hu.DMD.エクソン 47.25.010.2	TACAAGCACGGGTCTCCAGTTCA	480
Hu.DMD.エクソン 47.25.011	AGTTTATCTTGCTCTCTGGGCTTA	481
Hu.DMD.エクソン 47.25.012	TCTGCTTGAGCTTATTTCAGTTT	482
Hu.DMD.エクソン 47.25.012.2	ATCTTGCTCTCTGGGTTATGGGA	483
Hu.DMD.エクソン 47.25.013	CTTTATCCACTGGAGATTGTCTGC	484
Hu.DMD.エクソン 47.25.013.2	CTTATTTCAGTTATCTTGCTCT	485
Hu.DMD.エクソン 47.25.014	CTAACCTTATCCACTGGAGATTG	486
Hu.DMD.エクソン 47.25.014.2	ATTGTCTGCTTGAGCTTATTTCAG	487
Hu.DMD.エクソン 47.25.015	AATGTCTAACCTTATCCACTGGAG	488
Hu.DMD.エクソン 47.25.016	TGGTTAATGTCTAACCTTATCCAC	489
Hu.DMD.エクソン 47.25.017	AGAGATGGTTAATGTCTAACCTTA	490
Hu.DMD.エクソン 47.25.018	ACGGAAGAGATGGTTAATGTCTAAC	491
Hu.DMD.エクソン 47.20.001	ACAGACAAATGCAACAACGT	492
Hu.DMD.エクソン 47.20.002	CTGAAACAGACAAATGCAAC	493
Hu.DMD.エクソン 47.20.003	AGTAAC TGAAACAGACAAAT	494
Hu.DMD.エクソン 47.20.004	CCACCAGTAAC TGAAACAGA	495
Hu.DMD.エクソン 47.20.005	CTCTTCCACCACTGAAACTGAA	496

【0473】

【表17-7】

Hu.DMD.エクソン 47.20.006	GGCAACTCTTCCACCGAGTA	497
Hu.DMD.エクソン 47.20.007	CTGGCGCAGGGGCACTCTT	498
Hu.DMD.エクソン 47.20.008	TTGTTTGAGAATTCCCTGGC	499
Hu.DMD.エクソン 47.20.009	TCCAGTTCATTTAATTGTT	500
Hu.DMD.エクソン 47.20.010	TACAAGCACGGGCCTCCAG	501
Hu.DMD.エクソン 47.20.011	GCTTATGGGAGCACTTACAA	502
Hu.DMD.エクソン 47.20.012	ATCTTGCTCTCTGGGCTTA	503
Hu.DMD.エクソン 47.20.013	CTTATTTCAGTTTATCTT	504
Hu.DMD.エクソン 47.20.014	ATTGTCTGCTTGAGCTTAT	505
Hu.DMD.エクソン 47.20.015	CTTTATCCACTGGAGATTG	506
Hu.DMD.エクソン 47.20.016	CTAACCTTATCCACTGGAG	507
Hu.DMD.エクソン 47.20.017	AATGTCTAACCTTATCCAC	508
Hu.DMD.エクソン 47.20.018	TGGTTAATGTCTAACCTTA	509
Hu.DMD.エクソン 47.20.019	AGAGATGGTTAATGTCTAAC	510
Hu.DMD.エクソン 47.20.020	ACGGAAGAGATGGTTAATGT	511
Hu.DMD.エクソン 48.25.001	CTGAAAGGAAAATACATTTAAAAA	512
Hu.DMD.エクソン 48.25.002	CCTGAAAGGAAAATACATTTAAAAA	513
Hu.DMD.エクソン 48.25.002.2	GAAACCTGAAAGGAAAATACATT	514
Hu.DMD.エクソン 48.25.003	GGAAACCTGAAAGGAAAATACATT	515
Hu.DMD.エクソン 48.25.003.2	CTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATAC	516
Hu.DMD.エクソン 48.25.004	GCTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATA	517
Hu.DMD.エクソン 48.25.004.2	TAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGAA	518
Hu.DMD.エクソン 48.25.005	GTAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGA	519
Hu.DMD.エクソン 48.25.005.2	TCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGAA	520
Hu.DMD.エクソン 48.25.006	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGA	521
Hu.DMD.エクソン 48.25.006.2	GTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAAC	522

【0474】

10

20

30

40

【表17-8】

Hu.DMD.エクソン 48.25.007	TGTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	523
Hu.DMD.エクソン 48.25.007.2	AATTTCCTCCTGTTCTCAGGTAAA	524
Hu.DMD.エクソン 48.25.008	TTTGAGCTTCAATTCTCCTGTTT	525
Hu.DMD.エクソン 48.25.008	TTTTATTGAGCTTCAATTCTCCT	526
Hu.DMD.エクソン 48.25.009	AAGCTGCCAAGGTCTTTATTGA	527
Hu.DMD.エクソン 48.25.010	AGGTCTTCAAGCTTTCAAGCT	528
Hu.DMD.エクソン 48.25.010.2	TTCAAGCTTTCAAGCTGCCA	529
Hu.DMD.エクソン 48.25.011	GATGATTAACTGCTCTCAAGGTC	530
Hu.DMD.エクソン 48.25.011.2	CTGCTCTTCAAGGTCTTCAAGCTT	531
Hu.DMD.エクソン 48.25.012	AGGAGATAACCACAGCAGCAGATGA	532
Hu.DMD.エクソン 48.25.012.2	CAGCAGATGATTAACTGCTCTCA	533
Hu.DMD.エクソン 48.25.013	ATTCCAAC TGATTCTAACAGGAG	534
Hu.DMD.エクソン 48.25.014	CTTGGTTGGTTGGTTATAAATTTC	535
Hu.DMD.エクソン 48.25.014.2	CAACTGATTCTAACAGGAGATAAC	536
Hu.DMD.エクソン 48.25.015	CTTAACGTCAAATGGCCTTCTTGG	537
Hu.DMD.エクソン 48.25.015.2	TTGGTTATAAATTCCAAC TGATT	538
Hu.DMD.エクソン 48.25.016	CCTACCTAACGTCAAATGGCCTT	539
Hu.DMD.エクソン 48.25.016.2	TCCTTCTTGGTTGGTTGGTTATAA	540
Hu.DMD.エクソン 48.25.017	AGTCCCTACCTAACGTCAAATGG	541
Hu.DMD.エクソン 48.25.018	CAAAAAGTTCCCTACCTAACGTCA	542
Hu.DMD.エクソン 48.25.019	TAAAGCAAAAGTTCCCTACCTTAA	543
Hu.DMD.エクソン 48.25.020	ATATTAAAGCAAAAGTTCCCTAC	544
Hu.DMD.エクソン 48.20.001	AGGAAAATACATTAAAAAA	545
Hu.DMD.エクソン 48.20.002	AAGGAAAATACATTAAAAAA	546
Hu.DMD.エクソン 48.20.003	CCTGAAAGGAAAATACATT	547
Hu.DMD.エクソン 48.20.004	GGAACCTGAAAGGAAAATA	548

【0475】

【表17-9】

Hu.DMD.エクソン 48.20.005	GCTCTGGAAACCTGAAAGGA	549
Hu.DMD.エクソン 48.20.006	GTAAAGCTCTGGAAACCTGA	550
Hu.DMD.エクソン 48.20.007	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	551
Hu.DMD.エクソン 48.20.008	AATTCTCCTTGTTCAG	552
Hu.DMD.エクソン 48.20.009	TTTTATTTGAGCTCAATT	553
Hu.DMD.エクソン 48.20.010	AAGCTGCCAAGGTCTTTA	554
Hu.DMD.エクソン 48.20.011	TTCAAGCTTTTCAAGCT	555
Hu.DMD.エクソン 48.20.012	CTGCTCTCAAGGTCTCAA	556
Hu.DMD.エクソン 48.20.013	CAGCAGATGATTAAGTGCT	557
Hu.DMD.エクソン 48.20.014	AGGAGATAACCACAGCAGCA	558
Hu.DMD.エクソン 48.20.015	CAACTGATTCTAAATAGGAG	559
Hu.DMD.エクソン 48.20.016	TTGGTTATAAATTCCAAT	560
Hu.DMD.エクソン 48.20.017	TCCTTCTGGTTGGTTGGT	561
Hu.DMD.エクソン 48.20.018	CTTAACGTCAAATGGCCTT	562
Hu.DMD.エクソン 48.20.019	CCTACCTAACGTCAAATGG	563
Hu.DMD.エクソン 48.20.020	AGTTCCCTACCTAACGTCA	564
Hu.DMD.エクソン 48.20.021	CAAAAAGTCCCTACCTTAA	565
Hu.DMD.エクソン 48.20.022	TAAAGCAAAAGTCCCTAC	566
Hu.DMD.エクソン 48.20.023	ATATTAAAGCAAAAGTTC	567
Hu.DMD.エクソン 49.25.001	CTGGGGAAAAGAACCCATATAGTGC	568
Hu.DMD.エクソン 49.25.002	TCCTGGGGAAAAGAACCCATATAGT	569
Hu.DMD.エクソン 49.25.002.2	GTTCCTGGGGAAAAGAACCCATAT	570
Hu.DMD.エクソン 49.25.003	CAGTTCCCTGGGGAAAAGAACCCAT	571
Hu.DMD.エクソン 49.25.003.2	TTTCAGTTCCCTGGGGAAAAGAACCC	572
Hu.DMD.エクソン 49.25.004	TATTCAGTTCCCTGGGGAAAAGAA	573
Hu.DMD.エクソン 49.25.004.2	TGCTATTCAGTTCCCTGGGGAAAA	574

【0476】

【表17-10】

Hu.DMD.エクソン 49.25.005	ACTGCTATTCAGTTCTGGGAA	575
Hu.DMD.エクソン 49.25.005.2	TGAAC TGCTATTCAGTTCTGGG	576
Hu.DMD.エクソン 49.25.006	CTTGAAC TGCTATTCAGTTCTG	577
Hu.DMD.エクソン 49.25.006.2	TAGCTTGAACTGCTATTCAGTTTC	578
Hu.DMD.エクソン 49.25.007	TTTAGCTTGAACTGCTATTCAGTT	579
Hu.DMD.エクソン 49.25.008	TTCCACATCCGGTTGTTAGCTTGA	580
Hu.DMD.エクソン 49.25.009	TGCCCTTAGACAAAATCTCTCCA	581
Hu.DMD.エクソン 49.25.009.2	TTTAGACAAAATCTCTCCACATCC	582
Hu.DMD.エクソン 49.25.010	GTTTTCCTTGTACAAATGCTGCC	583
Hu.DMD.エクソン 49.25.010.2	GTACAAATGCTGCCCTTAGACAAA	584
Hu.DMD.エクソン 49.25.011	CTTCACTGGCTGAGTGGCTGGTTT	585
Hu.DMD.エクソン 49.25.011.2	GGCTGGTTTCCTGTACAAATGC	586
Hu.DMD.エクソン 49.25.012	ATTACCTTCACTGGCTGAGTGGCTG	587
Hu.DMD.エクソン 49.25.013	GCTTCATTACCTTCACTGGCTGAGT	588
Hu.DMD.エクソン 49.25.014	AGGTTGCTTCATTACCTTCACTGGC	589
Hu.DMD.エクソン 49.25.015	GCTAGAGGTTGCTTCATTACCTCA	590
Hu.DMD.エクソン 49.25.016	ATATTGCTAGAGGTTGCTTCATTAC	591
Hu.DMD.エクソン 49.20.001	GAAAAGAACCCATATAGTGC	592
Hu.DMD.エクソン 49.20.002	GGGAAAAGAACCCATATAAGT	593
Hu.DMD.エクソン 49.20.003	TCCTGGGAAAAGAACCCAT	594
Hu.DMD.エクソン 49.20.004	CAGTTCCTGGGAAAAGAA	595
Hu.DMD.エクソン 49.20.005	TATTCAGTTCTGGGAA	596
Hu.DMD.エクソン 49.20.006	ACTGCTATTCAGTTCTG	597
Hu.DMD.エクソン 49.20.007	CTTGAAC TGCTATTCAGTT	598
Hu.DMD.エクソン 49.20.008	TTTAGCTTGAACTGCTATT	599
Hu.DMD.エクソン 49.20.009	TTCCACATCCGGTTGTTAG	600

【表17-11】

Hu.DMD.エクソン 49.20.010	TTTAGACAAAATCTCTTCCA	601
Hu.DMD.エクソン 49.20.011	GTACAAATGCTGCCCTTAG	602
Hu.DMD.エクソン 49.20.012	GGCTGGTTTCCTGTACA	603
Hu.DMD.エクソン 49.20.013	CTTCACTGGCTGAGTGGCTG	604
Hu.DMD.エクソン 49.20.014	ATTACCTTCACTGGCTGAGT	605
Hu.DMD.エクソン 49.20.015	GCTTCATTACCTTCACTGGC	606
Hu.DMD.エクソン 49.20.016	AGGTTGCTTCATTACCTTCA	607
Hu.DMD.エクソン 49.20.017	GCTAGAGGTTGCTTCATTAC	608
Hu.DMD.エクソン 49.20.018	ATATTGCTAGAGGTTGCTTC	609
Hu.DMD.エクソン 50.25.001	CTTTAACAGAAAAGCATACACATTA	610
Hu.DMD.エクソン 50.25.002	TCCTCTTTAACAGAAAAGCATACAC	611
Hu.DMD.エクソン 50.25.002.2	TTCCTCTTTAACAGAAAAGCATACA	612
Hu.DMD.エクソン 50.25.003	TAACTTCCCTTTAACAGAAAAGCA	613
Hu.DMD.エクソン 50.25.003.2	CTAACTTCCTCTTTAACAGAAAAGC	614
Hu.DMD.エクソン 50.25.004	TCTTCTAACTTCCTCTTTAACAGAA	615
Hu.DMD.エクソン 50.25.004.2	ATCTTCTAACTTCCTCTTTAACAGA	616
Hu.DMD.エクソン 50.25.005	TCAGATCTTCTAACTTCCTCTTTAA	617
Hu.DMD.エクソン 50.25.005.2	CTCAGATCTTCTAACTTCCTCTTTA	618
Hu.DMD.エクソン 50.25.006	AGAGCTCAGATCTTCTAACTTCCTC	619
Hu.DMD.エクソン 50.25.006.2 NG-08-0731	CAGAGCTCAGATCTTCTAACTTCCT	620
Hu.DMD.エクソン 50.25.007	CACTCAGAGCTCAGATCTTCTACT	621
Hu.DMD.エクソン 50.25.007.2	CCTTCCACTCAGAGCTCAGATCTTC	622
Hu.DMD.エクソン 50.25.008	GTAAACGGTTACCGCCTCCACTC	623
Hu.DMD.エクソン 50.25.009	CTTGCCCTCAGCTCTGAAGTAAA	624
Hu.DMD.エクソン 50.25.009.2	CCCTCAGCTTGAAGTAAACGGTT	625

【0478】

【表17-12】

Hu.DMD.エクソン 50.25.010	CCAGGAGCTAGGTCAAGGCTGCTTG	626
Hu.DMD.エクソン 50.25.010.2	GGTCAGGCTGCTTGCCCTCAGCTC	627
Hu.DMD.エクソン 50.25.011	AGGCTCCAATAGTGGTCAGTCAGG	628
Hu.DMD.エクソン 50.25.011.2	TCAGTCCAGGAGCTAGGTCAAGGCTG	629
Hu.DMD.エクソン 50.25.012 AVI-5038	CTTACAGGCTCCAATAGTGGTCAGT	630
Hu.DMD.エクソン 50.25.013	GTATACTTACAGGCTCCAATAGTGG	631
Hu.DMD.エクソン 50.25.014	ATCCAGTATACTTACAGGCTCCAAT	632
Hu.DMD.エクソン 50.25.015 NG-08-0741	ATGGGATCCAGTATACTTACAGGCT	633
Hu.DMD.エクソン 50.25.016 NG-08-0742	AGAGAATGGGATCCAGTATACTTAC	634
Hu.DMD.エクソン 50.20.001	ACAGAAAAGCATACACATTA	635
Hu.DMD.エクソン 50.20.002	TTAACAGAAAAGCATACAC	636
Hu.DMD.エクソン 50.20.003	TCCTCTTAAACAGAAAAGCA	637
Hu.DMD.エクソン 50.20.004	TAACTTCCTCTTAAACAGAA	638
Hu.DMD.エクソン 50.20.005	TCTTCTAACTTCCTCTTAA	639
Hu.DMD.エクソン 50.20.006	TCAGATCTCTAACTTCCTC	640
Hu.DMD.エクソン 50.20.007	CCTTCCACTCAGAGCTCAGA	641
Hu.DMD.エクソン 50.20.008	GTAAACGGTTACCGCCTTC	642
Hu.DMD.エクソン 50.20.009	CCCTCAGCTCTGAAGTAAA	643
Hu.DMD.エクソン 50.20.010	GGTCAGGCTGCTTGCCCTC	644
Hu.DMD.エクソン 50.20.011	TCAGTCCAGGAGCTAGGTCA	645
Hu.DMD.エクソン 50.20.012	AGGCTCCAATAGTGGTCAGT	646
Hu.DMD.エクソン 50.20.013	CTTACAGGCTCCAATAGTGG	647
Hu.DMD.エクソン 50.20.014	GTATACTTACAGGCTCCAAT	648
Hu.DMD.エクソン 50.20.015	ATCCAGTATACTTACAGGCT	649
Hu.DMD.エクソン 50.20.016	ATGGGATCCAGTATACTTAC	650

【表17-13】

Hu.DMD.エクソン 50.20.017	AGAGAATGGGATCCAGTATA	651
Hu.DMD.エクソン 51.25.001-44	CTAAAATATTTGGGTTTGCAAAA	652
Hu.DMD.エクソン 51.25.002-45	GCTAAAATATTTGGGTTTGCAAA	653
Hu.DMD.エクソン 51.25.002.2-46	TAGGAGCTAAAATATTTGGGTTTT	654
Hu.DMD.エクソン 51.25.003	AGTAGGAGCTAAAATATTTGGGTT	655
Hu.DMD.エクソン 51.25.003.2	TGAGTAGGAGCTAAAATATTTGGG	656
Hu.DMD.エクソン 51.25.004	CTGAGTAGGAGCTAAAATATTTGGG	657
Hu.DMD.エクソン 51.25.004.2	CAGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATT	658
Hu.DMD.エクソン 51.25.005	ACAGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATT	659
Hu.DMD.エクソン 51.25.005.2	GAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCTAA	660
Hu.DMD.エクソン 51.25.006	CAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCT	661
Hu.DMD.エクソン 51.25.006.2	CACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG	662
Hu.DMD.エクソン 51.25.007	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAG	663
Hu.DMD.エクソン 51.25.007.2	AACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAA	664
Hu.DMD.エクソン 51.25.008	GTTGTGTCACCAGAGTAACAGTCTG	665
Hu.DMD.エクソン 51.25.009	TGGCAGTTCCCTAGTAACCACAGGT	666
Hu.DMD.エクソン 51.25.010	ATTCTAGTTGGAGATGGCAGTTTC	667
Hu.DMD.エクソン 51.25.010.2	GGAAGATGGCATTCTAGTTGGAG	668
Hu.DMD.エクソン 51.25.011	CATCAAGGAAGATGGCATTCTAGTT	669
Hu.DMD.エクソン 51.25.011.2	GAGCAGGTACCTCCAACATCAAGGAA	670
Hu.DMD.エクソン 51.25.012	ATCTGCCAGAGCAGGTACCTCCAAC	671
Hu.DMD.エクソン 51.25.013	AAGTTCTGTCCAAGCCGGTTGAAAT	672
Hu.DMD.エクソン 51.25.013.2	CGGTTGAAATCTGCCAGAGCAGGTAC	673
Hu.DMD.エクソン 51.25.014	GAGAAAGCCAGTCGGTAAGTTCTGTC	674
Hu.DMD.エクソン 51.25.014.2	GTCGGTAAGTTCTGTCCAAGCCGG	675
Hu.DMD.エクソン 51.25.015	ATAACTTGATCAAGCAGAGAAAGCCA	676

【0480】

10

20

30

40

【表17-14】

Hu.DMD.エクソン 51.25.015.2	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGGTAAGT	677
Hu.DMD.エクソン 51.25.016	CACCCTCTGTGATTTATAACTTGAT	678
Hu.DMD.エクソン 51.25.017	CAAGGTACCCACCATCACCTCTGT	679
Hu.DMD.エクソン 51.25.017.2	CATCACCCCTGTGATTTATAACT	680
Hu.DMD.エクソン 51.25.018	CTTCTGCTTGATGATCATCTCGTTGA	681
Hu.DMD.エクソン 51.25.019	CCTTCTGCTTGATGATCATCTCGTTG	682
Hu.DMD.エクソン 51.25.019.2	ATCTCGTTGATATCCTCAAGGTCACC	683
Hu.DMD.エクソン 51.25.020	TCATACCTCTGCTTGATGATCATCT	684
Hu.DMD.エクソン 51.25.020.2	TCATTTCCTCATACCTCTGCTTG	685
Hu.DMD.エクソン 51.25.021	TTTCTCATACCTCTGCTTGATGAT	686
Hu.DMD.エクソン 51.25.022	TTTATCATTTCCTCATACCTCT	687
Hu.DMD.エクソン 51.25.023	CCAACTTTATCATTTCCTCATAC	688
Hu.DMD.エクソン 51.20.001	ATATTGGGTTTGCAAA	689
Hu.DMD.エクソン 51.20.002	AAAATTTGGGTTTTGC	690
Hu.DMD.エクソン 51.20.003	GAGCTAAATATTTGGGTT	691
Hu.DMD.エクソン 51.20.004	AGTAGGAGCTAAATATTT	692
Hu.DMD.エクソン 51.20.005	GTCTGAGTAGGAGCTAAAT	693
Hu.DMD.エクソン 51.20.006	TAACAGTCTGAGTAGGAGCT	694
Hu.DMD.エクソン 51.20.007	CAGAGTAACAGTCTGAGTAG	695
Hu.DMD.エクソン 51.20.008	CACAGTTGTGTACCAAGAG	696
Hu.DMD.エクソン 51.20.009	AGTTCCCTAGTAACCACAG	697
Hu.DMD.エクソン 51.20.010	TAGTTGGAGATGGCAGTTT	698
Hu.DMD.エクソン 51.20.011	GGAAGATGGCATTCTAGTT	699
Hu.DMD.エクソン 51.20.012	TACCTCCAACATCAAGGAAG	700
Hu.DMD.エクソン 51.20.013	ATCTGCCAGAGCAGGTACCT	701
Hu.DMD.エクソン 51.20.014	CCAAGCCGGTTGAAATCTG	702

【表17-15】

Hu.DMD.エクソン 51.20.015	GTCGGTAAGTTCTGTCCAAG	703
Hu.DMD.エクソン 51.20.016	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGG	704
Hu.DMD.エクソン 51.20.017	TTTTATAACTTGATCAAGCA	705
Hu.DMD.エクソン 51.20.018	CATCACCCCTCTGTGATTAA	706
Hu.DMD.エクソン 51.20.019	CTCAAGGTCACCCACCATCA	707
Hu.DMD.エクソン 51.20.020	CATCTCGTTGATATCCTCAA	708
Hu.DMD.エクソン 51.20.021	CTTCTGCTTGATGATCATCT	709
Hu.DMD.エクソン 51.20.022	CATACCTTCTGCTTGATGAT	710
Hu.DMD.エクソン 51.20.023	TTTCTCATACCTTCTGCTTG	711
Hu.DMD.エクソン 51.20.024	CATTTTTCTCATACCTTCT	712
Hu.DMD.エクソン 51.20.025	TTTATCATTTCATCATAAC	713
Hu.DMD.エクソン 51.20.026	CAACTTTATCATTTTTCT	714
Hu.DMD.エクソン 52.25.001	CTGTAAGAACAAATATCCCTTAGTA	715
Hu.DMD.エクソン 52.25.002	TGCCTGTAAGAACAAATATCCCTTA	716
Hu.DMD.エクソン 52.25.002.2	GTTGCCTGTAAGAACAAATATCCCT	717
Hu.DMD.エクソン 52.25.003	ATTGTTGCCTGTAAGAACAAATATC	718
Hu.DMD.エクソン 52.25.003.2	GCATTGTTGCCTGTAAGAACAAATA	719
Hu.DMD.エクソン 52.25.004	CCTGCATTGTTGCCTGTAAGAACAA	720
Hu.DMD.エクソン 52.25.004.2	ATCCTGCATTGTTGCCTGTAAGAAC	721
Hu.DMD.エクソン 52.25.005	CAAATCCTGCATTGTTGCCTGTAAG	722
Hu.DMD.エクソン 52.25.005.2	TCCAAATCCTGCATTGTTGCCTGTA	723
Hu.DMD.エクソン 52.25.006	TGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCCT	724
Hu.DMD.エクソン 52.25.006.2	TCTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGC	725
Hu.DMD.エクソン 52.25.007	AACTGGGGACGCCTCTGTTCAAAT	726
Hu.DMD.エクソン 52.25.007.2	GCCTCTGTTCAAATCCTGCATTGT	727
Hu.DMD.エクソン 52.25.008	CAGCGGTAATGAGTTCTCCAAGT	728

【0482】

10

20

30

40

【表17-16】

Hu.DMD.エクソン 52.25.008.2	CTTCCA ACTGGGGACGCCTCTGTTCTGTC	729
Hu.DMD.エクソン 52.25.009	CTTGTTTTCAAATTTGGGCAGCG	730
Hu.DMD.エクソン 52.25.010	CTAGCCTCTTGATTGCTGGTCTTGT	731
Hu.DMD.エクソン 52.25.010.2	TTTCAAAATTTGGGCAGCGGTAAT	732
Hu.DMD.エクソン 52.25.011	TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGC	733
Hu.DMD.エクソン 52.25.011.2	GATTGCTGGTCTTGTAAAAAATT	734
Hu.DMD.エクソン 52.25.012	CTTACTTCGATCCGTAATGATTGTT	735
Hu.DMD.エクソン 52.25.012.2	TTGTTCTAGCCTCTTGATTGCTGGT	736
Hu.DMD.エクソン 52.25.013	AAAAAACTTACTTCGATCCGTAATGA	737
Hu.DMD.エクソン 52.25.014	TGTTAAAAAAACTTACTTCGATCCGT	738
Hu.DMD.エクソン 52.25.015	ATGCTTGTAAAAAAACTTACTTCGA	739
Hu.DMD.エクソン 52.25.016	GTCCCAGCTTGTAAAAAAACTTAC	740
Hu.DMD.エクソン 52.20.001	AGAACAAATATCCCTTAGTA	741
Hu.DMD.エクソン 52.20.002	GTAAGAACAAATATCCCTTA	742
Hu.DMD.エクソン 52.20.003	TGCCTGTAAGAACAAATATC	743
Hu.DMD.エクソン 52.20.004	ATTGTTGCCTGTAAGAACAA	744
Hu.DMD.エクソン 52.20.005	CCTGCATTGTTGCCTGTAAG	745
Hu.DMD.エクソン 52.20.006	CAAATCCTGCATTGTTGCCT	746
Hu.DMD.エクソン 52.20.007	GCCTCTGTTCAAATCCTGC	747
Hu.DMD.エクソン 52.20.008	CTTCCA ACTGGGGACGCCTC	748
Hu.DMD.エクソン 52.20.009	CAGCGGTAAATGAGTTCTTCC	749
Hu.DMD.エクソン 52.20.010	TTTCAAAATTTGGGCAGCG	750
Hu.DMD.エクソン 52.20.011	GATTGCTGGTCTTGTAAAAA	751
Hu.DMD.エクソン 52.20.012	TTGTTCTAGCCTCTTGATTG	752
Hu.DMD.エクソン 52.20.013	TTCGATCCGTAATGATTGTT	753
Hu.DMD.エクソン 52.20.014	CTTACTTCGATCCGTAATGA	754

【表17-17】

Hu.DMD.エクソン 52.20.015	AAAAAACTTACTTCGATCCGT	755
Hu.DMD.エクソン 52.20.016	TGTTAAAAAACTTACTTCGA	756
Hu.DMD.エクソン 52.20.017	ATGCTTGTTAAAAAACTTAC	757
Hu.DMD.エクソン 52.20.018	GTCCCAGCTGTTAAAAAAA	758
Hu.DMD.エクソン 53.25.001	CTAGAATAAAAGGAAAAATAAAT	759
Hu.DMD.エクソン 53.25.002	AACTAGAATAAAAGGAAAAATAAAT	760
Hu.DMD.エクソン 53.25.002.2	TTCAACTAGAATAAAAGGAAAAATA	761
Hu.DMD.エクソン 53.25.003	CTTTCAACTAGAATAAAAGGAAAAAA	762
Hu.DMD.エクソン 53.25.003.2	ATTCTTCAACTAGAATAAAAGGAA	763
Hu.DMD.エクソン 53.25.004	GAATTCTTCAACTAGAATAAAAGG	764
Hu.DMD.エクソン 53.25.004.2	TCTGAATTCTTCAACTAGAATAAA	765
Hu.DMD.エクソン 53.25.005	ATTCTGAATTCTTCAACTAGAATA	766
Hu.DMD.エクソン 53.25.005.2	CTGATTCTGAATTCTTCAACTAGA	767
Hu.DMD.エクソン 53.25.006	CACTGATTCTGAATTCTTCAACTA	768
Hu.DMD.エクソン 53.25.006.2	TCCCAGTCTGAATTCTTCAA	769
Hu.DMD.エクソン 53.25.007	CATCCCACTGATTCTGAATTCTTC	770
Hu.DMD.エクソン 53.25.008	TACTTCATCCACTGATTCTGAATT	771
Hu.DMD.エクソン 53.25.008.2	CTGAAGGTGTTCTGTACTTCATCC	772
Hu.DMD.エクソン 53.25.009	CGGTTCTGAAGGTGTTCTGTACT	773
Hu.DMD.エクソン 53.25.009.2	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGT	774
Hu.DMD.エクソン 53.25.010	TTTCATTCAACTGTTGCCTCCGGTT	775
Hu.DMD.エクソン 53.25.010.2	TAACATTTCATTCAACTGTTGCCTC	776
Hu.DMD.エクソン 53.25.011	TTGTGTTGAATCCTTAACATTCA	777
Hu.DMD.エクソン 53.25.012	TCTTCCTTAGCTTCCAGCCATTGTG	778
Hu.DMD.エクソン 53.25.012.2	CTTAGCTTCCAGCCATTGTGTTGAA	779
Hu.DMD.エクソン 53.25.013	GTCCTAAGACCTGCTCAGCTTCTTC	780

【0484】

10

20

30

40

【表17-18】

Hu.DMD.エクソン 53.25.013.2	CTGCTCAGCTTCTCCTTAGCTTCC	781
Hu.DMD.エクソン 53.25.014	CTCAAGCTTGGCTCTGGCCTGTCCT	782
Hu.DMD.エクソン 53.25.014.2	GGCCTGTCCTAAGACCTGCTCAGCT	783
Hu.DMD.エクソン 53.25.015	TAGGGACCCTCCTCCATGACTCAA	784
Hu.DMD.エクソン 53.25.016	TTTGGATTGCATCTACTGTATAGGG	785
Hu.DMD.エクソン 53.25.016.2	ACCCTCCTCCATGACTCAAGCTTG	786
Hu.DMD.エクソン 53.25.017	CTTGGTTCTGTGATTTCTTTGG	787
Hu.DMD.エクソン 53.25.017.2	ATCTACTGTATAAGGGACCCTCCTTC	788
Hu.DMD.エクソン 53.25.018	CTAACCTGGTTCTGTGATTTCT	789
Hu.DMD.エクソン 53.25.018.2	TTTCTTTGGATTGCATCTACTGTA	790
Hu.DMD.エクソン 53.25.019	TGATACTAACCTGGTTCTGTGAT	791
Hu.DMD.エクソン 53.25.020	ATCTTGATACTAACCTGGTTCT	792
Hu.DMD.エクソン 53.25.021	AAGGTATCTTGATACTAACCTTGG	793
Hu.DMD.エクソン 53.25.022	TTAAAAAGGTATCTTGATACTAAC	794
Hu.DMD.エクソン 53.20.001	ATAAAAGGAAAAATAAATAT	795
Hu.DMD.エクソン 53.20.002	GAATAAAAGGAAAAATAAAT	796
Hu.DMD.エクソン 53.20.003	AACTAGAATAAAAGGAAAAAA	797
Hu.DMD.エクソン 53.20.004	CTTTCAACTAGAATAAAAGG	798
Hu.DMD.エクソン 53.20.005	GAATTCTTCAACTAGAATA	799
Hu.DMD.エクソン 53.20.006	ATTCTGAATTCTTCAACTA	800
Hu.DMD.エクソン 53.20.007	TACTTCATCCCCTGATTCT	801
Hu.DMD.エクソン 53.20.008	CTGAAGGTGTTCTGTACT	802
Hu.DMD.エクソン 53.20.009	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAA	803
Hu.DMD.エクソン 53.20.010	TAACATTCACTTCAACTGTT	804
Hu.DMD.エクソン 53.20.011	TTGTGTTGAATCCTTAACA	805
Hu.DMD.エクソン 53.20.012	CTTAGCTTCCAGCCATTGTG	806

【表17-19】

Hu.DMD.エクソン 53.20.013	CTGCTCAGCTTCTCCTTAG	807
Hu.DMD.エクソン 53.20.014	GGCCTGTCCTAACGACCTGCT	808
Hu.DMD.エクソン 53.20.015	CTCAAGCTTGGCTCTGGCCT	809
Hu.DMD.エクソン 53.20.016	ACCCCTCTCCATGACTCAA	810
Hu.DMD.エクソン 53.20.017	ATCTACTGTATAAGGGACCCT	811
Hu.DMD.エクソン 53.20.018	TTTCTTTGGATTGCATCTA	812
Hu.DMD.エクソン 53.20.019	CTTGGTTCTGTGATTTCCT	813
Hu.DMD.エクソン 53.20.020	CTAACCTGGTTCTGTGAT	814
Hu.DMD.エクソン 53.20.021	TGATACTAACCTGGTTCT	815
Hu.DMD.エクソン 53.20.022	ATCTTGATACTAACCTTGG	816
Hu.DMD.エクソン 53.20.023	AAGGTATCTTGATACTAAC	817
Hu.DMD.エクソン 53.20.024	TTAAAAAGGTATCTTGATA	818
Hu.DMD.エクソン 54.25.001	CTATAGATTTTATGAGAAAGAGA	819
Hu.DMD.エクソン 54.25.002	AACTGCTATAGATTTTATGAGAAA	820
Hu.DMD.エクソン 54.25.003	TGGCCAAGTGTATAGATTTTATG	821
Hu.DMD.エクソン 54.25.004	GTCTTGCCAACTGCTATAGATT	822
Hu.DMD.エクソン 54.25.005	CGGAGGTCTTGGCCAAGTGTATA	823
Hu.DMD.エクソン 54.25.006	ACTGGCGGAGGTCTTGGCCAAGTG	824
Hu.DMD.エクソン 54.25.007	TTTGTCTGCCACTGGCGGAGGTCTT	825
Hu.DMD.エクソン 54.25.008	AGTCATTGCCACATCTACATTGT	826
Hu.DMD.エクソン 54.25.008.2	TTTGCCACATCTACATTGTCTGCC	827
Hu.DMD.エクソン 54.25.009	CCGGAGAAGTTCAGGGCCAAGTCA	828
Hu.DMD.エクソン 54.25.010	GTATCATCTGCAGAATAATCCCGGA	829
Hu.DMD.エクソン 54.25.010.2	TAATCCCGGAGAAGTTCAGGGCCA	830
Hu.DMD.エクソン 54.25.011	TTATCATGTGGACTTTCTGGTATC	831
Hu.DMD.エクソン 54.25.012	AGAGGCATTGATATTCTCTGTTATC	832

【0486】

10

20

30

40

【表17-20】

Hu.DMD.エクソン 54.25.012.2	ATGTGGACTTTCTGGTATCATCTG	833
Hu.DMD.エクソン 54.25.013	CTTTTATGAATGCTTCTCCAAGAGG	834
Hu.DMD.エクソン 54.25.013.2	ATATTCTCTGTTATCATGTGGACTT	835
Hu.DMD.エクソン 54.25.014	CATACCTTTATGAATGCTTCTCCA	836
Hu.DMD.エクソン 54.25.014.2	CTCCAAGAGGCATTGATATTCTCTG	837
Hu.DMD.エクソン 54.25.015	TAATTACACCTTTATGAATGCTT	838
Hu.DMD.エクソン 54.25.015.2	CTTTTATGAATGCTTCTCCAAGAGG	839
Hu.DMD.エクソン 54.25.016	TAATGTAATTACACCTTTATGAA	840
Hu.DMD.エクソン 54.25.017	AGAAATAATGTAATTACACCTTT	841
Hu.DMD.エクソン 54.25.018	GTTTTAGAAATAATGTAATTACAC	842
Hu.DMD.エクソン 54.20.001	GATTTTATGAGAAAGAGA	843
Hu.DMD.エクソン 54.20.002	CTATAGATTTTATGAGAAA	844
Hu.DMD.エクソン 54.20.003	AACTGCTATAGATTTTATG	845
Hu.DMD.エクソン 54.20.004	TGGCCAAGTGCTATAGATT	846
Hu.DMD.エクソン 54.20.005	GTCTTGGCCAAGTGCTATA	847
Hu.DMD.エクソン 54.20.006	CGGAGGTCTTGGCCAAGTG	848
Hu.DMD.エクソン 54.20.007	TTTGTCTGCCACTGGCGGAG	849
Hu.DMD.エクソン 54.20.008	TTTGCCACATCTACATTG	850
Hu.DMD.エクソン 54.20.009	TTCAGGGCCAAGTCATTGC	851
Hu.DMD.エクソン 54.20.010	TAATCCCGGAGAAGTTCA	852
Hu.DMD.エクソン 54.20.011	GTATCATCTGCAGAATAATC	853
Hu.DMD.エクソン 54.20.012	ATGTGGACTTTCTGGTATC	854
Hu.DMD.エクソン 54.20.013	ATATTCTCTGTTATCATGTG	855
Hu.DMD.エクソン 54.20.014	CTCCAAGAGGCATTGATATT	856
Hu.DMD.エクソン 54.20.015	CTTTTATGAATGCTTCTCCA	857
Hu.DMD.エクソン 54.20.016	CATACCTTTATGAATGCTT	858

【0487】

10

20

30

40

【表17-21】

Hu.DMD.エクソン 54.20.017	TAATTCATACCTTTATGAA	859
Hu.DMD.エクソン 54.20.018	TAATGTAATTCATACCTTT	860
Hu.DMD.エクソン 54.20.019	AGAAATAATGTAATTAC	861
Hu.DMD.エクソン 54.20.020	GTTTAGAAATAATGTAATT	862
Hu.DMD.エクソン 55.25.001	CTGCAAAGGACCAAATGTTCAGATG	863
Hu.DMD.エクソン 55.25.002	TCACCCTGCAAAGGACCAAATGTTC	864
Hu.DMD.エクソン 55.25.003	CTCACTCACCTGCAAAGGACCAA	865
Hu.DMD.エクソン 55.25.004	TCTCGCTCACTCACCCGTCAAAGGA	866
Hu.DMD.エクソン 55.25.005	CAGCCTCTCGCTCACTCACCTGCA	867
Hu.DMD.エクソン 55.25.006	CAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC	868
Hu.DMD.エクソン 55.25.007	TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCAC	869
Hu.DMD.エクソン 55.25.007.2	TCTATGAGTTCTCAAAGCAGCC	870
Hu.DMD.エクソン 55.25.008	GTTGCAGTAATCTATGAGTTCTTC	871
Hu.DMD.エクソン 55.25.008.2	GAACTGTTGCAGTAATCTATGAGTT	872
Hu.DMD.エクソン 55.25.009	TTCCAGGTCCAGGGGAACTGTTGC	873
Hu.DMD.エクソン 55.25.010	GTAAGCCAGGCAAGAACTTTCCA	874
Hu.DMD.エクソン 55.25.010.2	CCAGGCAAGAACTTTCCAGGTCC	875
Hu.DMD.エクソン 55.25.011	TGGCAGTTGTTCAGCTCTGTAAG	876
Hu.DMD.エクソン 55.25.011.2	TTCAGCTCTGTAAGCCAGGCAAGA	877
Hu.DMD.エクソン 55.25.012	GGTAGCATCCTGTAGGACATTGGCA	878
Hu.DMD.エクソン 55.25.012.2	GACATTGGCAGTTGTTCAGCTTCT	879
Hu.DMD.エクソン 55.25.013	TCTAGGAGCCTTCCTTACGGGTAG	880
Hu.DMD.エクソン 55.25.014	CTTTTACTCCCTGGAGTCTCTAG	881
Hu.DMD.エクソン 55.25.014.2	GAGCCTTCCTTACGGGTAGCATCC	882
Hu.DMD.エクソン 55.25.015	TTGCCATTGTTCATCAGCTTTT	883
Hu.DMD.エクソン 55.25.015.2	CTTGGAGTCTTAGGAGCCTTCC	884

【表17-22】

Hu.DMD.エクソン 55.25.016	CTTACTTGCCATTGTTCATCAGCT	885
Hu.DMD.エクソン 55.25.016.2	CAGCTTTTACTCCCTGGAGTCT	886
Hu.DMD.エクソン 55.25.017	CCTGACTTACTGCCATTGTTCAT	887
Hu.DMD.エクソン 55.25.018	AAATGCCTGACTTACTGCCATTGT	888
Hu.DMD.エクソン 55.25.019	AGCGGAAATGCCTGACTTACTGCC	889
Hu.DMD.エクソン 55.25.020	GCTAAAGCGGAAATGCCTGACTTAC	890
Hu.DMD.エクソン 55.20.001	AAGGACCAAATGTTCAGATG	891
Hu.DMD.エクソン 55.20.002	CTGCAAAGGACCAAATGTT	892
Hu.DMD.エクソン 55.20.003	TCACCCTGCAAAGGACCAA	893
Hu.DMD.エクソン 55.20.004	CTCACTCACCCCTGCAAAGGA	894
Hu.DMD.エクソン 55.20.005	TCTCGCTCACTCACCCGTCA	895
Hu.DMD.エクソン 55.20.006	CAGCCTCTGCTCACTCACC	896
Hu.DMD.エクソン 55.20.007	CAAAGCAGCCTCTGCTCAC	897
Hu.DMD.エクソン 55.20.008	TCTATGAGTTCTTCAAAG	898
Hu.DMD.エクソン 55.20.009	GAACTGTTGCAGTAATCTAT	899
Hu.DMD.エクソン 55.20.010	TTCCAGGTCCAGGGGGAACT	900
Hu.DMD.エクソン 55.20.011	CCAGGCAAGAAACTTTCCA	901
Hu.DMD.エクソン 55.20.012	TTCAGCTTCTGTAAGCCAGG	902
Hu.DMD.エクソン 55.20.013	GACATTGGCAGTTGTTTCAG	903
Hu.DMD.エクソン 55.20.014	GGTAGCATCCTGTAGGACAT	904
Hu.DMD.エクソン 55.20.015	GAGCCTTCCTTACGGGTAG	905
Hu.DMD.エクソン 55.20.016	CTTGGAGTCTCTAGGAGCC	906
Hu.DMD.エクソン 55.20.017	CAGCTTTTACTCCCTGG	907
Hu.DMD.エクソン 55.20.018	TTGCCATTGTTCATCAGCT	908
Hu.DMD.エクソン 55.20.019	CTTACTGCCATTGTTCAT	909
Hu.DMD.エクソン 55.20.020	CCTGACTTACTGCCATTGT	910

【表 17 - 23】

Hu.DMD.エクソン 55.20.021	AAATGCCTGACTTACTTGCC	911
Hu.DMD.エクソン 55.20.022	AGCGGAAATGCCTGACTTAC	912
Hu.DMD.エクソン 55.20.023	GCTAAAGCGGAAATGCCTGA	913
H50A(+02+30)-AVI-5656	CCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAACTTCC	914
H50D(+07-18)-AVI-5915	GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	915
H50A(+07+33)	CTTCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAA	916
H51A(+61+90)-AVI-4657	ACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAGTTGG	917
H51A(+66+95)-AVI-4658	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG	918
H51A(+111+134)	TTCTGTCCAAGCCGGTTGAAATC	919
H51A(+175+195)	CACCCACCATTACCCCTCYGTG	920
H51A(+199+220)	ATCATCTCGTTGATATCCTCAA	921
H51A(+66+90)	ACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG	922
H51A(-01+25)	ACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGC	923
h51AON1	TCAAGGAAGATGGCATTTCT	924
h51AON2	CCTCTGTGATTTATAACTTGAT	925
H51D(+08-17)	ATCATTTCCTCATACCTTCTGCT	926
H51D(+16-07)	CTCATACCTTCTGCTTGATGATC	927
hAON#23	TGGCATTCTAGTTGG	928
hAON#24	CCAGAGCAGGTACCTCAACATC	929
H44A(+61+84)	TGTTCAGCTCTGTTAGCCACTGA	930
H44A(+85+104)	TTTGTGTCTTCTGAGAAC	931
h44AON1	CGCCGCCATTCTCAACAG	932
H44A(-06+14)	ATCTGTCAAATCGCCTGCAG	933
H45A(+71+90)	TGTTTTGAGGATTGCTGAA	934
h45AON1	GCTGAATTATTCTTCCCC	935
h45AON5	GCCCAATGCCATCCTGG	936
H45A(-06+20)	CCAATGCCATCCTGGAGTTCTGTAA	937
H53A(+39+69)	CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTG	938
H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTGTACTTCATCC	939
h53AON1	CTGTTGCCTCCGGTTCTG	940
H53A(-12+10)	ATTCTTCAACTAGAATAAAAG	941
huEx45.30.66	GCCATCCTGGAGTTCCCTGTAAGATACCAAA	942
huEx45.30.71	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCCTGTAAGATA	943
huEx45.30.79	GCCGCTGCCAATGCCATCCTGGAGTTCCCT	944
huEx45.30.83	GTTCGCCGCTGCCAATGCCATCCTGGAGT	945
huEx45.30.88	CAACAGTTGCCGCTGCCAATGCCATCCT	946
huEx45.30.92	CTGACAACAGTTGCCGCTGCCAATGCCA	947
huEx45.30.96	TGTTCTGACAACAGTTGCCGCTGCCAAT	948
huEx45.30.99	CAATGTTCTGACAACAGTTGCCGCTGCC	949
huEx45.30.103	CATTCAATGTTCTGACAACAGTTGCCGCT	950
huEx45.30.120	TATTTCTTCCCCAGTTGCATTCAATGTTCT	951
huEx45.30.127	GCTGAATTATTCTTCCCCAGTTGCATTCA	952
huEx45.30.132	GGATTGCTGAATTATTCTTCCCCAGTTGC	953
huEx45.30.137	TTTGAGGATTGCTGAATTATTCTTCCCCA	954

【表 17 - 24】

huEx53.30.84	GTACTTCATCCCACTGATTCTGAATTCTTT	955
huEx53.30.88	TCTTGTACTTCATCCCACTGATTCTGAATT	956
huEx53.30.91	TGTTCTTGTACTTCATCCCACTGATTCTGA	957
huEx53.30.103	CGGTTCTGAAGGTGTTCTGTACTTCATCC	958
huEx53.30.106	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTGTACTTCA	959
huEx53.30.109	TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTGTACT	960
huEx53.30.112	TGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGT	961
huEx53.30.115	AACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCT	962
huEx53.30.118	TTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGT	963

10

【0491】

工程1：マレイミド-P E G - N H S、その後の s i R N A - D M D 抱合体との抗体結合

【0492】

抗ジストロフィン抗体を、1 X リン酸緩衝液(pH 7.4)と交換して、最大で5 m g / m l の濃度にした。この溶液に、2当量のS M C C リンカーあるいはマレイミド-P E G x k D a - N H S (x = 1、5、10、20)を加えて、室温で4時間回転させた。未反応のマレイミド-P E Gを、50 k D a のM W C O のA m i c o n スピンフィルターおよびP B S pH 7.4を使用する回転濾過によって除去した。抗体-P E G M a 1 抱合体を集めて、反応容器に移した。表13-17に示される配列を使用して、様々なs i R N A 抱合体を合成する。s i R N A - D M D 抱合体(2当量)をP B S中の抗体-P E G マレイミドに室温で加え、夜通し回転させた。反応混合物を分析的S A X カラムクロマトグラフィーによって分析すると、未反応の抗体およびs i R N Aと共に抱合体が見られる。

20

【0493】

工程2：精製

【0494】

粗製反応混合物を、陰イオン交換クロマトグラフィーを使用するA K T A e x p l o r e r F P L Cによって精製した。抗体-P E G - D M D 抱合体を含む画分をプールし、濃縮し、P B S (pH 7.4)と緩衝液交換した。S M C C リンカー、P E G 1 k D a 、P E G 5 k D a 、およびP E G 10 k D a を有する抗体s i R N A 抱合体を、s i R N A 負荷に基づいて分離する。

30

【0495】

工程3：精製された抱合体の分析

【0496】

単離した抱合体を、質量スペクトルまたはS D S - P A G E のいずれかによって特徴付けた。抱合体の純度を、陰イオン交換クロマトグラフィーを使用して、分析的H P L Cによって評価した。

40

【0497】

実施例8。追加の配列

表18は、本明細書に記載される追加のポリ核酸分子配列を示す。

【0498】

【表 18 - 1】

エクソ ン	AO 名称 (h,H:ヒト; M: マウス)	受容部位か らの位置	配列	SEQ ID NO:
2	hEx2_Ac12	12	CCA UUU UGU GAA UGU UUU CUU UUG AAC AUC	964
2	hEx2_Ac19	19	CCC AUU UUG UGA AUG UUU UCU UUU	965
2	hEx2_Ac32	32	UUG UGC AUU UAC CCA UUU UGU G	966
2	hEx2_Ac35	35	GAA AAU UGU GCA UUU ACC CAU UUU	967
3	hEx3_Ac20	20	GUA GGU CAC UGA AGA GGU UCU	968
4	hEx4_Ac11	11	UGU UCA GGG CAU GAA CUC UUG UGG AUC CUU	969
5	hEx5_Ac25	25	UCA GUU UAU GAU UUC CAU CUA CGA UGU CAG U	970
6	hEx6_Ac69	69	UAC GAG UUG AUU GUC GGA CCC AG	971
7	hEx_Ac45	45	UGC AUG UUC CAG UCG UUG UGU GG	972
8	hEx8_Ac-6	-6	GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA	973
8	hEx8_Ac26	26	CUU CCU GGA UGG CUU CAA U	974
8	hEx8_Ac84	84	GUA CAU UAA GAU GGA CUU C	975
9	hEx9_Ac-6	-6	CCC UGU GCU AGA CUG ACC GUG AUC UGC AG	976
10	hEx10_Ac-5	-5	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA	977
10	hEx10_Ac98	98	UCC UCA GCA GAA AGA AGC CAC G	978
11	hEx11_Ac75	75	CAU CUU CUG AUA AUU UUC CUG UU	979
12	hEx12_Ac52	52	UCU UCU GUU UUU GUU AGC CAG UCA	980
13	hEx13_Ac77	77	CAG CAG UUG CGU GAU CUC CAC UAG	981
14	hEx14_Ac32	32	GUA AAA GAA CCC AGC GGU CUU CUG UCC AUC	982
15	hEx15_Ac48	48	UCU UUA AAG CCA GUU GUG UGA AUC	983
16	hEx16_Ac12	12	CUA GAU CCG CUU UUA AAA CCU GUU AAA ACA A	984
16	hEx16_Ac11	11	GAU UGC UUU UUC UUU UCU AGA UCC G	985
17	hEx17_Ac-7	-7	UGA CAG CCU GUG AAA UCU GUG AG	986
17	hEx17_Ac36	36	CCA UUA CAG UUG UCU GUG UU	987
17	hEx17_Ac132	132	UAA UCU GCC UCU UCU UUU GG	988
18	hEx18_Ac24	24	CAG CUU CUG AGC GAG UAA UCC AGC UGU GAA	989
19	hEx19_Ac35	35	GCC UGA GCU GAU CUG CUG GCA UCU UGC AGU U	990
19	hEx19_Ac39	39	UCU GCU GGC AUC UUG C	991
20	hEx20_Ac23	23	GUU CAG UUG UUC UGA AGC UUG UCU UUU G	992
20	mEx20_Ac23	23	GUU CAG UUG UUC UGA AGC UUG UCU G	993
20	hEx20_Ac44	44	CUG GCA GAA UUC GAU CCA CCG GCU GUU C	994
20	mEx20_Ac44	44	UUG GCA GAA UUC UGU CCA CCG GCU GUU C	995

10

20

30

40

【0499】

【表 18 - 2】

20	hEx20_Ac140	140	AGU AGU UGU CAU CUG CUC CAA UUG U	996
20	mEx20_Ac140	140	AGU AGU UGU CAU CUG UUC CAA UUG U	997
20	hEx20_Ac147	147	CAG CAG UAG UUG UCA UCU GCU C	998
20	mEx20_Ac147	147	CGG CAG UAG UUG UCA UCU GUU C	999
21	hEx21_Ac85	85	CUG CAU CCA GGA ACA UGG GUC C	1000
21	mEx21_Ac85	85	CUG CAU CCA GAA ACA UUG GCC C	1001
21	hEx21_Ac86	86	GUC UGC AUC CAG GAA CAU GGG UC	1002
22	mEx22_Ac8	8	AUG UCC ACA GAC CUG UAA UU	1003
22	hEx22_Ac8	8	AUA UUC ACA GAC CUG CAA UU	1004
22	hEx22_Ac125	125	CUG CAA UUC CCC GAG UCU CUG C	1005
22	mEx22_Ac125	125	CUG UAA UUU CCC GAG UCU CUC C	1006
23	mEx23_Ac7	7	GGC CAA ACC UCG GCU UAC CUG AAA U	1007
23	hEx23_Ac7	7	AGU AAA AUC UUG AAU UAC CUG AAU U	1008
23	hEx23_Ac69	69	CGG CUA AUU UCA GAG GGC GCU UUC UUC GAC	1009
23	mEx23_Ac69	69	UGG CAU AUU UCU GAA GGU GCU UUC UUG GCC	1010
24	mEx24_Ac16	16	CAA CUU CAG CCA UCC AUU UCU GUA A	1011
24	hEx24_Ac16	16	CAA CUU CAG CCA UCC AUU UCU UCA G	1012
24	hEx24_Ac51	51	CAA GGG CAG GCC AUU CCU CCU UC	1013
24	mEx24_Ac51	51	CCA GGG CAG GCC AUU CCU CUU UC	1014
24	mEx24_Ac78	78	GAG CUG UUU UUU CAG GAU UUC AGC A	1015
24	hEx24_Ac78	78	CAG CUG CUU UUU UAG AAU UUC UGA A	1016
25	hEx25_Ac95	95	UUG AGU UCU GUC UCA AGU CUC GAA G	1017
25	mEx25_Ac95	95	CUA AGU UCU GUC UCC AGU CUG GAU G	1018
26	hEx26_Ac-7	-7	CCU CCU UUC UGG CAU AGA CCU UCC AC	1019
27	hEx27_Ac82	82	UUA AGG CCU CUU GUG CUA CAG GUG G	1020
28	hEx28_Ac99	99	CAG AGA UUU CCU CAG CUC CGC CAG GA	1021
29	hEx29_Ac15	15	UAU CCU CUG AAU GUC GCA UC	1022
29	hEx29_Ac18	18	GGU UAU CCU CUG AAU GUC GC	1023
29	hEx29_Ac45	45	UCU GUG CCA AUA UGC GAA UC	1024
29	hEx29_Ac57	57	UCC GCC AUC UGU UAG GGU CUG UGC C	1025
29	hEx29_Ac59	59	CCA UCU GUU AGG GUC UGU G	1026
29	hEx29_Ac105	105	UUA AAU GUC UCA AGU UCC	1027
29	hEx29_Ac127	127	GUA GUU CCC UCC AAC G	1028
29	hEx29_Ac131	131	CAU GUA GUU CCC UCC	1029
30	hEx30_Ac25	25	UCC UGG GCA GAC UGG AUG CUC UGU UC	1030

【0500】

【表 18 - 3】

31	hEx31_Ac3	3	UAG UUU CUG AAA UAA CAU AUA CCU G	1031
32	hEx32_Ac44	44	CUU GUA GAC GCU GCU CAA AAU UGG CUG GUU	1032
33	hEx33_Ac64	64	CCG UCU GCU UUU UCU GUA CAA UCU G	1033
34	hEx34_Ac46	46	CAU UCA UUU CCU UUC GCA UCU UAC G	1034
34	hEx34_Ac95	95	AUC UCU UUG UCA AUU CCA UAU CUG UA	1035
35	hEx35_Ac24	24	UCU GUG AUA CUC UUC AGG UGC ACC UUC UGU	1036
36	hEx36_Ac22	22	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC AAA AGU	1037
37	hEx37_Ac134	134	UUC UGU GUG AAA UGG CUG CAA AUC	1038
38	hEx38_Ac88	88	UGA AGU CUU CCU CUU UCA GAU UCA C	1039
39	hEx39_Ac62	62	UUU CCU CUC GCU UUC UCU CAU CUG UGA UUC	1040
40	hEx40_Ac-5	-5	CUU UGA GAC CUC AAA UCC UGU U	1041
40	hEx40_Ac13	13	GAG CCU UUU UUC UUC UUU G	1042
40	hEx40_Ac127	127	UCC UUU CAU CUC UGG GCU C	1043
41	hEx41_Ac44	44	CAA GCC CUC AGC UUG CCU ACG CAC UG	1044
41	hEx41_Ac18	18	CUC CUC UUU CUU CUU CUG C	1045
41	hEx41_Ac145	145	CUU CGA AAC UGA GCA AAU UU	1046
42	hEx42_Ac4	4	AUC GUU UCU UCA CGG ACA GUG UGC UGG	1047
42	hEx42_Ac90	90	CUU GUG AGA CAU GAG UG	1048
42	hEx42_Ac175	175	CAG AGA CUC CUC UUG CUU	1049
43	hEx43_Ac52	52	UGC UGC UGU CUU CUU GCU	1050
43	hEx43_Ac90	90	CUG UAG CUU CAC CCU UUC C	1051
43	hEx43_Ac101	101	GGA GAG AGC UUC CUG UAG CU	1052
43	hEx43_Ac132	132	UGU UAA CUU UUU CCC AAU GG	1053
43	hEx43_Ac134	134	UUG UUA ACU UUU UCC AAU	1054
43	hEx43_Ac137	137	CAU UUU GUU AAC UUU UUC CC	1055
44	hEx44_Ac0	0	CGC CAT TTC TCA ACA GAT CTG TCA AAT CGC	1056
44	hEx44_Ac1	1	CCG CCA TTT CTC AAC AGA TCTGTC AAA TCG	1057
44	hEx44_Ac2	2	GCC GCC ATT TCT CAA CAG ATC TGT CAA ATC	1058
44	hEx44_Ac3	3	AGC CGC CAT TTC TCA ACA GAT CTG TCA AAT	1059
44	hEx44_Ac4	4	AAG CCG CCA TTT CTC AAC AGA TCT GTC AAA	1060
44	hEx44_Ac5	5	AAA GCC GCC ATT TCT CAA CAG ATC TGT CAA	1061
44	hEx44_Ac6	6	AAA AGC CGC CAT TTC TCA ACA GAT CTG TCA	1062
44	hEx44_Ac7	7	AAA ACG CCG CCA TTT CTC AAC AGA TCT GTC	1063

【0501】

【表 18 - 4】

44	hEx44_Ac8	8	GAA AAC GCC GCC ATT TCT CAA CAG ATC TGT	1064
44	hEx44_Ac9	9	TGA AAA CGC CGC CAT TTC TCA ACA GAT CTG	1065
44	hEx44_Ac10	10	ATG AAA ACG CCG CCA TTT CTC AAC AGA TCT	1066
44	hEx44_Ac14	14	CAT AAT GAA AAC GCC GCC ATT TCT CAA CAG	1067
44	hEx44_Ac15	15	CGC CGC CAU UUC UCA ACA G	1068
44	hEx44_Ac18	18	ATA TCA TAA TGA AAA CGC CGC CAT TTC TCA	1069
44	hEx44_Ac19	19	TAT ATC ATA ATG AAA ACG CCG CCA TTT CTC	1070
44	hEx44_54	54	TGT TCA GCT TCT GTT AGC CAC TGA TTA AAT	1071
44	hEx44_Ac56	56	ACT GTT CAG CTT CTG TTA GCC ACT GAT TAA	1072
44	hEx44_Ac59	59	GAA ACT GTT CAG CTT CTG TTA GCC ACT GAT	1073
44	hEx44_Ac61	61	UGU UCA GCU UCU GUU AGC CAC UGA	1074
44	hEx44_Ac69	69	GTC TTT CTG AGA AAC TGT TCA GCT TCT GTT	1075
44	hEx44_Ac87	87	UUU GUA UUU AGC AUG UUC CC	1076
45	hEx45_Ac-6	-6	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AA	1077
45	hEx45_Ac0	0	TTG CCG CTG CCC AAT GCC ATC CTG GAG TTC	1078
45	hEx45_Ac1	1	TTT GCC GCT GCC CAA TGC CAT CCT GGA GTT	1079
45	hEx45_Ac2	2	GTT TGC CGC TGC CCA ATG CCA TCC TGG AGT	1080
45	hEx45_Ac3	3	AGT TTG CCG CTG CCC AAT GCC ATC CTG GAG	1081
45	hEx45_Ac4	4	CAG TTT GCC GCT GCC CAA TGC CAT CCT GGA	1082
45	hEx45_Ac6	6	GCC CAA UGC CAU CCU GG	1083
45	hEx45_Ac7	7	CAA CAG TTT GCC GCT GCC CAA TGC CAT CCT	1084
45	hEx45_Ac8	8	ACA ACA GTT TGC CGC TGC CCA ATG CCA TCC	1085
45	hEx45_Ac9	9	GAC AAC AGT TTG CCG CTG CCC AAT GCC ATC	1086
45	hEx45_Ac10	10	TGA CAA CAG TTT GCC GCT GCC CAA TGC CAT	1087
45	hEx45_Ac11	11	CTG ACA ACA GTT TGC CGC TGC CCA ATG CCA	1088
45	hEx45_Ac12	12	TCT GAC AAC AGT TTG CCG CTG CCC AAT GCC	1089
45	hEx45_Ac58	58	GCU GAA UUA UUU CUU CCC C	1090
45	hEx45_Ac75	75	UCU GUU UUU GAG GAU UGC	1091
45	hEx45_Ac122	122	CCA CCG CAG AUU CAG GC	1092
45	hEx45_Ac137	137	UUU GCA GAC CUC CUG CC	1093
45	hEx45_Ac154	154	UUU UUC UGU CUG ACA GCU G	1094
46	hEx46_Ac14	14	CUG ACA AGA UAU UCU U	1095

【0502】

【表 18 - 5】

46	hEx46_Ac15	15	GAA AUU CUG ACA AGA UAU UCU	1096
46	hEx46_Ac45	45	CTT CCT CCA ACC ATA AAA CAA ATT CAT TTA	1097
46	hEx46_Ac46	46	GCT TCC TCC AAC CAT AAA ACA AAT TCA TTT	1098
46	hEx46_Ac47	47	TGC TTC CTC CAA CCA TAA AAC AAA TTC ATT	1099
46	hEx46_Ac47	47	UAA AAC AAA UUC AUU	1100
46	hEx46_Ac48	48	CTG CTT CCT CCA ACC ATA AAA CAA ATT CAT	1101
46	hEx46_Ac49	49	TCT GCT TCC TCC AAC CAT AAA ACA AAT TCA	1102
46	hEx46_Ac50	50	ATC TGC TTC CTC CAA CCA TAA AAC AAA TTC	1103
46	hEx46_Ac51	51	TAT CTG CTT CCT CCA ACC ATA AAA CAA ATT	1104
46	hEx46_Ac52	52	TTA TCT GCT TCC TCC AAC CAT AAA ACA AAT	1105
46	hEx46_Ac53	53	GTT ATC TGC TTC CTC CAA CCA TAA AAC AAA	1106
46	hEx46_Ac54	54	TGT TAT CTG CTT CCT CCA ACC ATA AAA CAA	1107
46	hEx46_Ac55	55	ATG TTA TCT GCT TCC TCC AAC CAT AAA ACA	1108
46	hEx46_Ac56	56	AAT GTT ATC TGC TTC CTC CAA CCA TAA AAC	1109
46	hEx46_Ac57	57	CAA TGT TAT CTG CTT CCT CCA ACC ATA AAA	1110
46	hEx46_Ac58	58	GCA ATG TTA TCT GCT TCC TCC AAC CAT AAA	1111
46	hEx46_Ac59	59	AGC AAT GTT ATC TGC TTC CTC CAA CCA TAA	1112
46	hEx46_Ac60	60	TAG CAA TGT TAT CTG CTT CCT CCA ACC ATA	1113
46	hEx46_Ac61	61	CTA GCA ATG TTA TCT GCT TCC TCC AAC CAT	1114
46	hEx46_Ac62	62	ACT AGC AAT GTT ATC TGC TTC CTC CAA CCA	1115
46	hEx46_Ac63	63	GUU AUC UGC UUC CUC CAA CC	1116
46	hEx46_Ac88	88	AGG UUC AAG UGG GAU ACU A	1117
46	hEx46_Ac90	90	UCC AGG UUC AAG UGG GAU AC	1118
46	hEx46_Ac96	96	UUC CAG GUU CAA GUG	1119
46	hEx46_Ac107	107	CAA GCU UUU CUU UUA GUU GCU GCU CUU UUC C	1120
46	hEx46_Ac111	111	UUA GUU GCU GCU CUU	1121
46	hEx46_Ac115	115	GCU UUU CUU UUA GUU GCU GC	1122
46	hEx46_Ac122	122	UCA AGC UUU UCU UUU AG	1123
47	hEx47_Ac-6	-6	CAG GGG CAA CUC UUC CAC CAG UAA CUG AAA	1124
47	hEx47_Ac39	39	UCC AGU UUC AUU UAA UUG UUU G	1125
47	hEx47_Ac63	63	AGC ACU UAC AAG CAC GGG U	1126
47	hEx47_Ac87	87	UCU UGC UCU UCU GGG CUU	1127
47	hEx47_Ac94	94	UUC AAG UUU AUC UUG CUC UUC	1128

【0503】

【表 18 - 6】

47	hEx47_Ac101	101	CUU GAG CUU AUU UUC AAG UUU	1129
47	hEx47_Ac103	103	CUG CUU GAG CUU AUU UUC AAG UU	1130
48	hEx48_Ac-7	-7	UUC UCA GGU AAA GCU CUG GAA ACC UGA AAG	1131
48	hEx48_Ac2	2	CUU CAA GCU UUU UUU CAA GCU	1132
48	hEx48_Ac19	19	UUU CUC CUU GUU UCU C	1133
48	hEx48_Ac23	23	GCU UCA AUU UCU CCU UGU U	1134
48	hEx48_Ac32	32	UUU AUU UGA GCU UCA AUU U	1135
48	hEx48_Ac37	37	GGU CUU UUA UUU GAG CUU C	1136
48	hEx48_Ac48	48	GCU GCC CAA GGU CUU UU	1137
48	hEx48_Ac71	71	CUU CAA GGU CUU CAA GCU UUU	1138
48	hEx48_Ac79	79	UAA CUG CUC UUC AAG GUC UUC	1139
48	hEx48_Ac133	133	UUA UAA AUU UCC AAC UGA UUC	1140
49	hEx49_Ac-11	-11	CUG CUA UUU CAG UUU CCU GGG GAA AAG	1141
49	hEx49_Ac25	25	CUU CCA CAU CCG GUU GUU U	1142
49	hEx49_Ac60	60	GUG GCU GGU UUU UCC UUG U	1143
50	hEx50_Ac2	2	CCA CUC AGA GCU CAG AUC UUC UAA CUU CC	1144
50	hEx50_Ac11	11	CUC AGA GCU CAG AUC UU	1145
50	hEx50_Ac36	36	GGC UGC UUU GCC CUC	1146
51	hEx51_Ac0	0	GTG TCA CCA GAG TAA CAG TCT GAG TAG GAG	1147
51	hEx51_Ac5	5	AGG TTG TGT CAC CAG AGT AAC AGT CTG AGT	1148
51	hEx51_Ac9	9	CCA CAG GTT GTG TCA CCA GAG TAA CAG TCT	1149
51	hEx51_Ac26	26	GGC AGT TTC CTT AGT AAC CAC AGG TTG TGT	1150
51	hEx51_Ac30	30	AGA TGG CAG TTT CCT TAG TAA CCA CAG GTT	1151
51	hEx51_Ac48	48	ATG GCA TTT CTA GTT TGG AGA TGG CAG TTT	1152
51	hEx51_Ac65	65	CTC CAA CAT CAA GGA AGA TGG CAT TTC TAG	1153
51	hEx51_Ac66	66	ACA UCA AGG AAG AUG GCA UUU CUA G	1154
51	hEx51_Ac67	67	TCA AGG AAG ATG GCA TTT CT	1155
51	hEx51_Ac68	68	UCA AGG AAG AUG GCA UUU CU	1156
51	hEx51_Ac132	132	GAA AGC CAG UCG GUA AGU UC	1157
51	hEx51_Ac141	141	TTA TAA CTT GAT CAA GCA GAG AAA GCC AGT	1158
51	hEx51_Ac160	160	CCU CUG UGA UUU UAU AAC UUG AU	1159
51	hEx51_Ac181	181	CAC CCA CCA UCA CCC	1160
51	hEx51_Ac191	191	UGA UAU CCU CAA GGU CAC CC	1161
51	hEx51_Ac207	207	ATA CCT TCT GCT TGA TGA TCA TCT CGT TGA	1162
52	hEx52_Ac12	12	UCC AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA UCC	1163
52	mEx52_Ac12	12	UCC AAU UGG GGG CGU CUC UGU UCC AAA UCU	1164

10

20

30

40

【0504】

【表 18 - 7】

52	mEx52_Ac17	17	UCC AAU UGG GGG CGU CUC UGU UCC A	1165	
52	hEx52_Ac17	17	UCC AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC A	1166	
52	hEx52_Ac18	18	UUC CAA CUG GGG ACG CCU CUG UUC C	1167	
52	hEx52_Ac24	24	GGT AAT GAG TTC TTC CAA CTG GGG ACG CCT	1168	
52	mEx52_Ac42	42	UUC AAA UUC UGG GCA GCA GUA AUG AGU UCU	1169	
52	hEx52_Ac42	42	UUC AAA UUU UGG GCA GCG GUA AUG AGU UCU	1170	10
52	hEx52_Ac69	69	UUG CUG GUC UUG UUU UUC	1171	
52	hEx52_Ac97	97	CCG UAA UGA UUG UUC U	1172	
53	hEx53_Ac1	1	ACT TCA TCC CAC TGA TTC TGA ATT CTT TCA	1173	
53	hEx53_Ac2	2	TAC TTC ATC CCA CTG ATT CTG AAT TCT TTC	1174	
53	hEx53_Ac3	3	GTA CTT CAT CCC ACT GAT TCT GAA TTC TTT	1175	
53	hEx53_Ac4	4	TGT ACT TCA TCC CAC TGA TTC TGA ATT CTT	1176	
53	mEx53_Ac5	5	UUU UAA AGA UAU GCU UGA CAC UAA CCU UGG	1177	
53	hEx53_Ac5	5	UUA AAA AGG UAU CUU UGA UAC UAA CCU UGG	1178	20
53	hEx53_Ac5	5	TTG TAC TTC ATC CCA CTG ATT CTG AAT TCT	1179	
53	hEx53_Ac6	6	CTT GTA CTT CAT CCC ACT GAT TCT GAA TTC	1180	
53	hEx53_Ac7	7	TCT TGT ACT TCA TCC CAC TGA TTC TGA ATT	1181	
53	hEx53_Ac8	8	TTC TTG TAC TTC ATC CCA CTG ATT CTG AAT	1182	
53	hEx53_Ac9	9	GTT CTT GTA CTT CAT CCC ACT GAT TCT GAA	1183	
53	hEx53_Ac10	10	TGT TCT TGT ACT TCA TCC CAC TGA TTC TGA	1184	
53	hEx53_Ac11	11	GTG TTC TTG TAC TTC ATC CCA CTG ATT CTG	1185	30
53	hEx53_Ac12	12	GGT GTT CTT GTA CTT CAT CCC ACT GAT TCT	1186	
53	hEx53_Ac13	13	AGG TGT TCT TGT ACT TCA TCC CAC TGA TTC	1187	
53	hEx53_Ac14	14	AAG GTG TTC TTG TAC TTC ATC CCA CTG ATT	1188	
53	hEx53_Ac15	15	GAA GGT GTT CTT GTA CTT CAT CCC ACT GAT	1189	
53	hEx53_Ac16	16	TGA AGG TGT TCT TGT ACT TCA TCC CAC TGA	1190	
53	hEx53_Ac17	17	CTG AAG GTG TTC TTG TAC TTC ATC CCA CTG	1191	
53	hEx53_Ac18	18	TCT GAA GGT GTT CTT GTA CTT CAT CCC ACT	1192	40

【0505】

【表 18 - 8】

53	hEx53_Ac19	19	TTC TGA AGG TGT TCT TGT ACT TCA TCC CAC	1193
53	hEx53_Ac20	20	GTT CTG AAG GTG TTC TTG TAC TTC ATC CCA	1194
53	hEx53_Ac21	21	GGT TCT GAA GGT GTT CTT GTA CTT CAT CCC	1195
53	hEx53_Ac22	22	CGG TTC TGA AGG TGT TCT TGT ACT TCA TCC	1196
53	hEx53_Ac23	23	CCG GTT CTG AAG GTG TTC TTG TAC TTC ATC	1197
53	hEx53_Ac24	24	TCC GGT TCT GAA GGT GTT CTT GTA CTT CAT	1198
53	hEx53_Ac25	25	CTC CGG TTC TGA AGG TGT TCT TGT ACT TCA	1199
53	hEx53_Ac26	26	CCT CCG GTT CTG AAG GTG TTC TTG TAC TTC	1200
53	hEx53_Ac27	27	GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT CTT GTA CTT	1201
53	hEx53_Ac28	28	TGC CTC CGG TTC TGA AGG TGT TCT TGT ACT	1202
53	hEx53_Ac20	29	TTG CCT CCG GTT CTG AAG GTG TTC TTG TAC	1203
53	hEx53_Ac30	30	GTT GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT CTT GTA	1204
53	hEx53_Ac39	39	CAU UCA ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA GGU G	1205
53	mEx53_Ac39	39	CAU UCA ACU GUU GUC UCC UGU UCU GCA GCU G	1206
53	hEx53_Ac45	45	CUG UUG CCU CCG GUU CUG	1207
53	hEx53_Ac69	69	CAG CCA UUG UGU UGA AUC CUU UAA CAU UUC	1208
53	hEx53_Ac128	128	UUG GCU CUG GCC UGU CCU	1209
53	mEx53_Ac151	151	CUA CUG UGU GAG GAC CUU CUU UCC AUG AGU	1210
53	mEx53_Ac176	176	UCU GUG AUC UUC UUU UGG AUU GCA UCU ACU	1211
54	hEx54_Ac21	21	UAC AUU UGU CUG CCA CUG G	1212
54	hEx54_Ac42	42	GAG AAG TTT CAG GGC CAA GTC ATT TGC CAC	1213
54	hEx54_Ac58	58	CCC GGA GAA GUU UCA GGG	1214
54	hEx54_Ac67	67	UCU GCA GAA UAA UCC CGG AGA AG	1215
55	hEx55_Ac0	0	TCT TCC AAA GCA GCC TCT CGC TCA CTC ACC	1216
55	hEx55_Ac29	29	UGC AGU AAU CUA UGA GUU UC	1217
55	hEx55_Ac33	33	CUG UUG CAG UAA UCU AUG AG	1218
55	hEx55_Ac104	104	UCC UGU AGG ACA UUG GCA GU	1219
55	hEx55_Ac139	139	GAG UCU UCU AGG AGC CUU	1220
55	hEx55_Ac141	141	CUU GGA GUC UUC UAG GAG CC	1221
55	hEx55_Ac167	167	UGC CAU UGU UUC AUC AGC UCU UU	1222
56	hEx56_Ac48	48	UUU UUU GGC UGU UUU CAU CC	1223
56	hEx56_Ac69	69	CCU UCC AGG GAU CUC AGG	1224
56	hEx56_Ac102	102	GUU AUC CAA ACG UCU UUG UAA CAG G	1225

【0506】

【表 18 - 9】

56	hEx56_Ac129	129	GUU CAC UCC ACU UGA AGU UC	1226
57	hEx57_Ac-12	-12	CUG GCU UCC AAA UGG GAC CUG AAA AAG AAC	1227
57	hEx57_Ac64	64	UUC AGC UGU AGC CAC ACC	1228
57	hEx57_Ac97	97	UAG GUG CCU GCC GGC UU	1229
57	hEx57_Ac118	118	CUG AAC UGC UGG AAA GUC GCC	1230
58	hEx58_Ac9	9	UUC UUU AGU UUU CAA UUC CCU C	1231
58	hEx58_Ac21	21	ACU CAU GAU UAC ACG UUC UUU AGU U	1232
58	hEx58_Ac86	86	GAG UUU CUC UAG UCC UUC C	1233
59	hEx59_Ac6	6	UCC UCA GGA GGC AGC UCU AAA U	1234
59	hEx59_Ac66	66	GAG UUU CUC UAG UCC UUC C	1235
59	hEx59_Ac134	134	UUG AAG UUC CUG GAG UCU U	1236
60	hEx60_Ac19	19	GUU CUC UUU CAG AGG CGC	1237
60	hEx60_Ac37	37	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC	1238
60	hEx60_Ac92	92	GUG CUG AGG UUA UAC GGU G	1239
61	hEx61_Ac10	10	GGG CUU CAU GCA GCU GCC UGA CUC GGU CCU C	1240
61	hEx61_Ac31	31	GUC CCU GUG GGC UUC AUG	1241
61	hEx61_Ac51	51	GUG CUG AGA UGC UGG ACC	1242
62	hEx62_Ac8	8	GAG AUG GCU CUC UCC CAG GGA CCC UGG	1243
62	hEx62_Ac15	15	UGG CUC UCU CCC AGG G	1244
62	hEx62_Ac37	37	GGG CAC UUU GUU UGG CG	1245
63	hEx63_Ac11	11	UGG GAU GGU CCC AGC AAG UUG UUU G	1246
63	hEx63_Ac11	11	GGU CCC AGC AAG UUG UUU G	1247
63	hEx63_Ac33	33	GUA GAG CUC UGU CAU UUU GGG	1248
64	hEx64_Ac47	47	GCA AAG GGC CUU CUG CAG UCU UCG GAG	1249
65	hEx65_Ac-11	-11	GCU CAA GAG AUC CAC UGC AAA AAA C	1250
65	mEx65_Ac-11	-11	GCU CAA GAG AUC CAC UGC AAA AAA G	1251
65	hEx65_Ac15	15	GCC AUA CGU ACG UAU CAU AAA CAU UC	1252
65	hEx65_Ac26	26	GUU GUG CUG GUC CAA GGC AUC ACA U	1253
65	mEx65_Ac26	26	GUU GUG CUG GUC CAG GGC AUC ACA U	1254
65	hEx65_Ac63	63	UCU GCA GGA UAU CCA UGG GCU GGU C	1255
65	hEx65_Ac63	63	UCU GCA GGA UAU CCA UGG GCU GGU C	1256
66	hEx66_Ac-8	-8	GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU AUU AUG	1257
67	hEx67_Ac22	22	GCG CUG GUC ACA AAA UCC UGU UGA AC	1258
68	hEx68_Ac22	22	CAU CCA GUC UAG GAA GAG GGC CGC UUC	1259
69	hEx69_Ac-6	-6	UGC UUU AGA CUC CUG UAC CUG AUA	1260

10

20

30

40

【0507】

【表18-10】

70	hEx70_Ac98	98	CCU CUA AGA CAG UCU GCA CUG GCA	1261
71	hEx71_Ac-3	-3	AAG UUG AUC AGA GUA ACG GGA CUG	1262
71	hEx71_Ac8	8	GCC AGA AGU UGA UCA GAG U	1263
71	hEx71_Ac16	16	UCU ACU GGC CAG AAG UUG	1264
72	hEx72_Ac2	2	GUG UGA AAG CUG AGG GGA CGA GGC AGG	1265
72	hEx72_Ac20	20	UGA GUA UCA UCG UGU GAA AG	1266
72	hEx72_Ac42	42	GCA UAA UGU UCA AUG CGU G	1267
73	hEx73_Ac6	6	GAU CCA UUG CUG UUU UCC AUU UCU G	1268
73	hEx73_Ac13	13	GAU CCA UUG CUG UUU UCC	1269
73	hEx73_Ac31	31	GAG AUG CUA UCA UUU AGA UAA	1270
74	hEx74_Ac48	48	CGA GGC UGG CUC AGG GGG GAG UCC U	1271
74	hEx74_Ac51	51	CUG GCU CAG GGG GGA GU	1272
74	hEx74_Ac72	72	UCC CCU CUU UCC UCA CUC U	1273
75	hEx75_Ac34	34	GGA CAG GCC UUU AUG UUC GUG CUG C	1274
75	hEx75_Ac33	33	CCU UUA UGU UCG UGC UGC U	1275
75	hEx75_Ac144	144	GGC GGC CUU UGU GUU GAC	1276
76	hEx76_Ac53	53	GCU GAC UGC UGU CGG ACC UCU GUA GAG	1277
76	hEx76_Ac37	37	GAG AGG UAG AAG GAG AGG A	1278
76	hEx76_Ac65	65	AUA GGC UGA CUG CUG UCG G	1279
77	hEx77_Ac16	16	CUG UGC UUG UGU CCU GGG GAG GAC UGA	1280
77	hEx77_Ac20	20	UUG UGU CCU GGG GAG GA	1281
77	hEx77_Ac47	47	UGC UCC AUC ACC UCC UCU	1282
78	hEx78_Ac4	4	UCU CAU UGG CUU UCC AGG GGU AUU UC	1283
78	hEx78_Ac4	4	GCU UUC CAG GGG UAU UUC	1284
78	hEx78_Ac10	10	CAU UGG CUU UCC AGG GG	1285

【0508】

実施例9：トランسفェクトされた初代ヒト骨格筋細胞におけるDMDエクソン44および45のスキッピングPMO

【0509】

初代のあらかじめ分化したヒト骨格筋細胞（Gibco、#A11440）を、メーカーの説明書に従って、2%のウマ血清および1×ITS（Gibco、#1933286）で補充されたDMEM中の、1型コラーゲンでコーティングされた24ウェルプレート（Gibco、#1970788）に蒔いた。細胞を37°C+5%のCO₂で2日間成長させて、筋管を確立した。その後、これらの細胞を、水中の定義された濃度のPMOおよび2uMのEndoポーター（Gene Tools、#EP6P1-1）で処置し、細胞へのPMO取り込みを促進した。培地を吸引し、その後、ウェル当たり300uLのTRIZOLを加えることによって、処置から48時間後に細胞を収集した。Direct-zol（商標）-96 RNAキット（Zymo Research、#R2056）を使用してRNAを調製する前に、細胞を-80°Cで冷凍した。全RNA濃度を分光学的で定量化した。100-200ngの全RNAを、高容量cDNA逆転写キット（Applied Biosystems、#4368813）を使用して逆転写した。RT PCR反応を、25°Cで10分間、37°Cで120分間、85°Cで5分間インキュベートし、その後、4°Cで保持した。反応物を水で1:1に希釈した。ゲル電気泳動

10

20

30

40

50

をエクソンスキッピングの定量化については、全mRNA（スキッピングされた+スキッピングされていない）およびスキッピングされたmRNAを表すDNA断片を、Taq man Fast Advanced Master mix (Applied Biosystems、#4444558) および特定のプライマー対（表19を参照）を使用して、qPCRによって増幅した。qPCR反応物を、Quant Studio 7 Flex (Applied Biosystems) を使用して、95°Cで20秒間インキュベートし、その後、95°Cで1秒間および60°Cで20秒間の32サイクルでインキュベートした。PCR産物をTAEローディングバッファーで4:1に希釈し、Gel Greenを含有している24ウェルの4%TAEゲル（Embi Tec, #GG3807）に載せた。PCR産物を電気泳動（2時間50V）によって分離した。全DMDおよびスキッピングされたDMD産物に対応するバンドの強度を、Chemiluminescence（商標）XRS+（Bio-Rad）を使用したデンシトメトリーによって定量化した。
10

【0510】

Taqman qPCR プライマーおよびプローブが表19に示される。

【0511】

【表19】

スキッピングされた hDMD Ex44	フォワード:	5'-CTGTGGAAAGGGTGAAAGCTA-3'
	リバース:	5'-GACAAGGGAACCTCCAGGATG-3'
	プローブ:	5'-AGCTCTCTCCCAGCTTGATTCCA-3'
スキッピングされた hDMD Ex45	フォワード:	5'-CAGTGGCTAACAGAACGCTGA-3'
	リバース:	5'-CAAATGGTATCTTAAGGCTAGAAC-3'
	プローブ:	5'-ACACAAATTCTGAGAATTGGAACATGC-3'

【0512】

全hDMDHs01049401_m1、ヒト DMD VIC-MGB, 360 rxns (Thermo Fisher Scientific)
20

【0513】

表20Aは、トランスフェクトされた初代ヒト骨格筋細胞におけるDMDエクソン45を標的とするPMO(30mer)のエクソンスキッピング活性を示す。

【0514】

【表 20 A】

	PMO conc	%スキッピング(スキッピングされた/全て)		
		uM	AVG	STDEV
hEx45_Ac1	10.0	43.5	6.4	10
	3.0	38.5	9.2	
	1.0	29.5	3.5	
hEx45_Ac2	10.0	67.0	14.1	
	3.0	71.5	14.8	
	1.0	38.0	7.8	
	0.1	10.0		
hEx45_Ac3	10.0	69.5	2.1	20
	3.0	56.5	10.6	
	1.0	34.0	8.5	
hEx45_Ac4	10.0	51.7	10.4	
	3.0	49.0	1.4	
	1.0	34.0	5.3	
	0.1	18.0		
hEx45_Ac7	10.0	72.0	11.4	
	3.0	62.5	2.1	
	1.0	43.3	4.9	
	0.1	18.0		
hEx45_Ac8	10.0	76.0	8.5	
	3.0	69.5	12.0	
	1.0	43.5	19.1	
hEx45_Ac9	10.0	73.7	6.0	30
	3.0	62.5	9.2	
	1.0	47.3	8.3	
	0.1	20.0		
hEx45_Ac10	10.0	53.0	0.0	
	3.0	56.5	10.6	
	1.0	35.5	0.7	
hEx45_Ac11	10.0	54.5	2.1	
	3.0	53.0	1.4	
	1.0	34.0	4.2	
hEx45_Ac12	10.0	52.0	21.2	40
	3.0	40.0	14.1	
	1.0	26.5	10.6	
PMO なし	0	10.5	6.4	

【0515】

表 20 B は、トランスフェクトされた初代ヒト骨格筋細胞における DMD エクソン 44 を標的とする PMO (30mer) のエクソンスキッピング活性を示す。

【0516】

【表 20B-1】

	PMO conc	%スキッピング(スキッピングされた/全て)		
		uM	AVG	STDEV
hEx44_Ac0	10	83.8	11.3	10
	3	79.7	3.5	
	1	67.5	7.8	
	0.1	31.5	0.7	
hEx44_Ac1	10	77.7	8.3	20
	3	79.5	0.7	
	1	68.3	8.5	
	0.1	32.0		
hEx44_Ac2	10	88.7	4.5	30
	3	96.0	7.1	
	1	70.0	13.2	
	0.1	31.0		
hEx44_Ac3	10	75.0	14.1	40
	3	89.0		
	1	62.0	8.5	
	0.1	26.0		
hEx44_Ac4	10	84.0	17.0	
	3	88.0		
	1	67.0	15.6	
	0.1	23.0		
hEx44_Ac5	10	63.0	0.0	
	3	68.0		
	1	54.0	8.5	
	0.1	18.0		
hEx44_Ac6	10	74.0	12.7	
	3	81.0		
	1	58.5	17.7	
	0.1	20.0		
hEx44_Ac7	10	84.3	19.5	
	3	85.0	4.2	
	1	59.3	13.0	
	0.1	23.0		
hEx44_Ac8	10	76.0	0.0	
	3	70.0		
	1	53.5	2.1	
	0.1	27.0		
hEx44_Ac9	10	76.5	2.1	
	3	73.0		
	1	59.0	15.6	
	0.1	32.0		
hEx44_Ac10	10	85.0	18.4	
	3	79.0		
	1	45.5	6.4	
	0.1	23.0		
hEx44_Ac14	10	86.5	19.1	

【0517】

【表 2 0 B - 2】

	3	80.0	11.8
	1	62.0	9.0
	0.1	31.5	0.7
PMOなし		8.3	3.8

【0 5 1 8】

図15は、トランスフェクトされた初代ヒト骨格筋細胞におけるh E × 4 5 _ A c 9 PMOの様々な長さのエクソンスキッピング活性を示す。

10

【0 5 1 9】

実施例10：ヒトT f R 1 PMO抱合体の合成および精製

抗ヒトトランスフェリン受容体抗体を產生した。PMO(28-mer)をGeneToolsによって合成した。水中に4当量のトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)を加えて、37°Cで4時間インキュベートすることによって、ホウ酸塩緩衝液(25mMの四ホウ酸ナトリウム、25mMのNaCl、1mMのジエチレントリアミンペニタ酢酸、pH8.0)中のCD71抗体(10mg/mL)を還元した。DMSO中の10当量のSMCC(10mg/mL)を用いてDMSO中のPMO(50mg/mL)を1時間インキュベートすることにより、4(N-マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SMCC)を、PMOの3'末端で一级アミンに結合させた。3kDaのMWCOを有するAmicon Ultra-15遠心濾過機ユニットを使用した限外濾過により、非結合SMCCを除去した。PMO-SMCCを、緩衝酢酸溶液(10mMの酢酸ナトリウム、pH6.0)で3回洗浄して、すぐに使用した。還元された抗体を、2.25当量のPMO-SMCCと混合し、4°Cで夜通しインキュベートした。その後、反応混合物のpHを7.5まで減らし、8当量のN-エチルマレイミドを室温で30分間にわたって混合物に加えて、未反応のシスティンをクエンチした。疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)方法2による反応混合物の分析は、未反応の抗体およびPMOと共に、抗体-PMO抱合体を示した。

20

【0 5 2 0】

HIC方法1を使用して、反応混合物をAKTA Explorer FPLCで精製した。抱合体に基づいて、1(DAR1)、2(DAR2)、および3(DAR3)の薬物対抗体比を有する抱合体のいずれかを含有する画分、あるいは3+(DAR3+)または4+(DAR4+)の薬物対抗体比を有する抱合体を含有する画分を組み合わせて、50kDaのMWCOを有するアミコンウルトラ15遠心式フィルターユニットで濃縮した。濃縮抱合体を、分析のために、Amicon Ultra15遠心濾過機ユニットを使用して、PBS(pH7.4)と緩衝液交換した。

30

【0 5 2 1】

疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)方法-1

1. カラム：GE、HiScreen Butyl HP、4.7ml

2. 溶媒A：50mMのリン酸塩緩衝液、0.7Mの硫酸アンモニウム、pH7.0；溶媒B：80%の50mMのリン酸塩緩衝液、20%のIPA、pH7.0；流速：1.0mL/分

40

3. 勾配：

a . % A	% B	カラム体積
b . 1 0 0	0	1
c . 7 0	3 0	2 5
d . 0	1 0 0	1
e . 0	1 0 0	2

【0 5 2 2】

ヒトトランスフェリン受容体へのh T f R 1 . mAb - PMO抱合体の結合

50

【0523】

抗体抱合体（AOC）結合をELISAによって測定した。組換えヒトトランスフェリン受容体（Sino Biological 11020-H07H）を、高結合プレート（Costar 3690）上に、PBS中の1ng/uLで夜通しコーティングした。プレートを洗浄し、AOCまたはmAbのサンプルを最大10nMの濃度で加えた。着色剤は、HRP結合二次抗体（Jackson Immunoresearch 109-035-006）および2N硫酸で止められたTMB基質（Thermo Fisher 34028）によって開発された。GraphPad Prismを使用してKdを決定した。

【0524】

図16は、ヒトトランスフェリン受容体へのhTfR1.mAb-PMO抱合体のインピトロでの結合を例証する。

【0525】

初代ヒト骨格筋細胞におけるTfR1.mAb-PMO抱合体の活性

【0526】

初代のあらかじめ分化したヒト骨格筋細胞（Gibco、#A11440）を、メーカーの説明書に従って、2%のウマ血清および1×ITS（Gibco、#1933286）で補充されたDMEMに、1型コラーゲンでコーティングされた24ウェルプレート（Gibco、#1970788）に蒔いた。細胞を37°C+5%のCO₂で2日間成長させ、筋管を確立した。健康なドナー（Myology Institute Paris）の不死化ヒト骨格筋細胞を、5%のFBSで補充された骨格筋細胞増殖培地（Skeletal Muscle Cell Growth medium）（Promocell、C-23160）中の1型コラーゲンでコーティングされた24ウェルプレート（Gibco、#1970788）上で蒔いた。筋芽細胞が培養密度に達した後、ゲンタマイシン（50ug/ml）（Invitrogen、15750-045）およびインスリン（10ug/ml）（Sigma、91077）で補充されたDMEMを含有する分化培地において筋管形成を誘発した。その後、それぞれの培地中の定義された濃度のAOCで筋管を処置した。培地を吸引し、その後、ウェル当たり300uLのTRIZOLを加えることによって、処置から72時間後に細胞を収集した。例9に記載されるように、DMEMエクソソスキッピングのRNA単離および定量化を実施した。

【0527】

図17は、初代ヒト骨格筋細胞におけるhTfR1.mAb-PMO（28-mer）抱合体のエクソソスキッピング活性を示す。

【0528】

図18は、初代の不死化ヒト骨格筋細胞の筋管におけるhTfR1.mAb-PMO抱合体のエクソソスキッピング活性を示す。

【0529】

本開示の好ましい実施形態が本明細書中で示され、記載されてきたが、このような実施形態はほんの一例として提供されているに過ぎないということは、当業者に明らかであろう。多くの変形、変更、および置き換えは、本開示から逸脱することなく、当業者によって想到されるものである。本明細書に記載される開示の実施形態の様々な代案が、本開示の実施において利用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲は本開示の範囲を定義するものであり、ならびに、この特許請求の範囲およびその同等物の範囲内の方法および構造はそれによって包含されることが、意図されている。

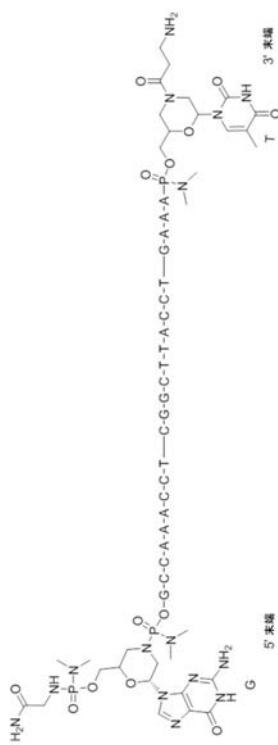
10

20

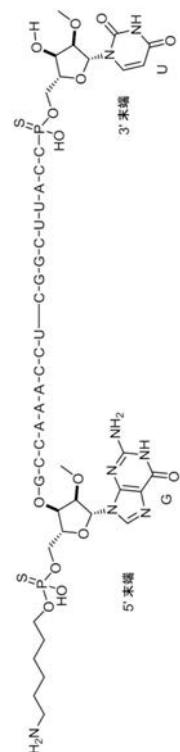
30

40

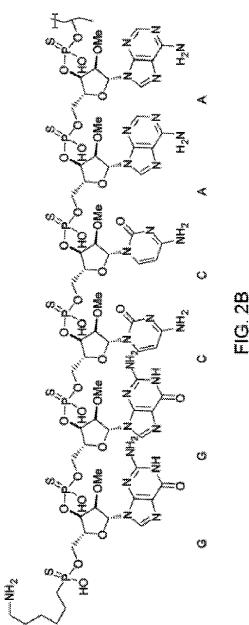
【 図 1 】



【 図 2 A 】



【図2B-1】



【 図 2 B - 2 】

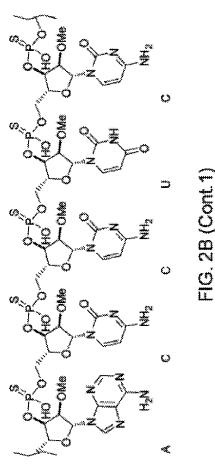


FIG. 2B (Cont. 1)

【図 2B - 3】

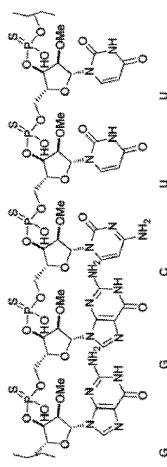


FIG. 2B (Cont.2)

【図 2B - 4】

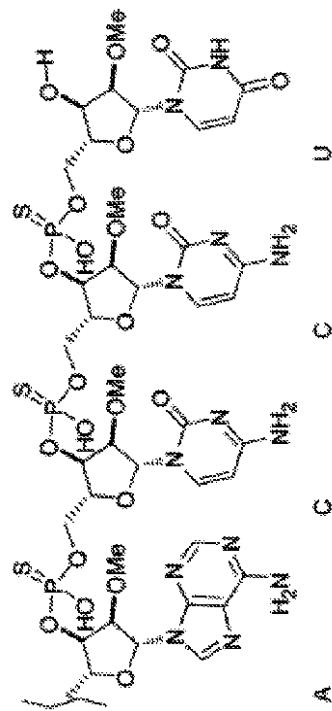
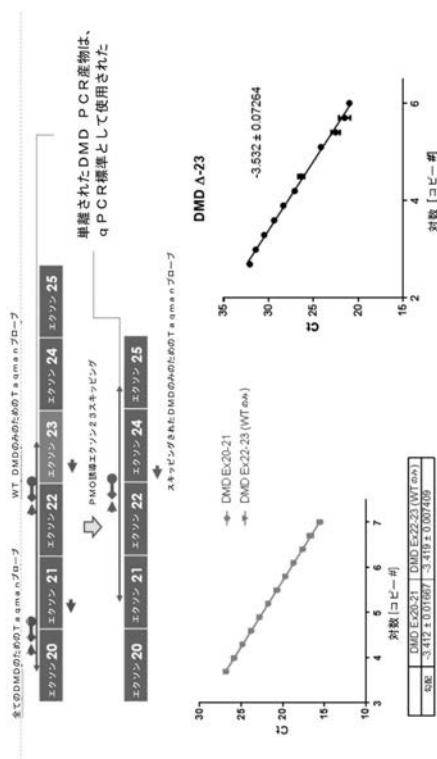


FIG. 2B (Cont.3)

【図 3】



【図 4】

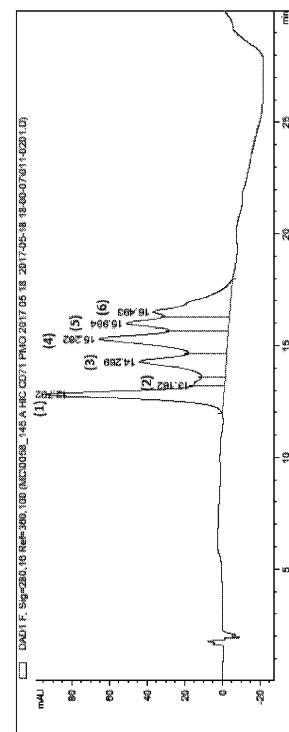
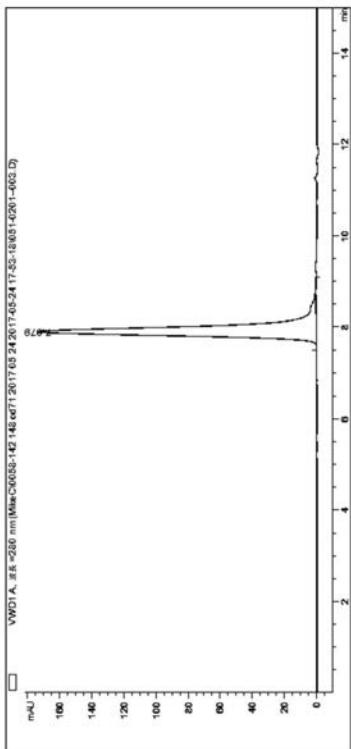
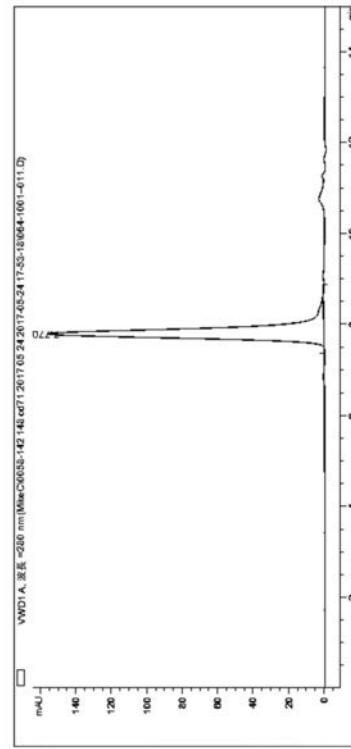


FIG. 4

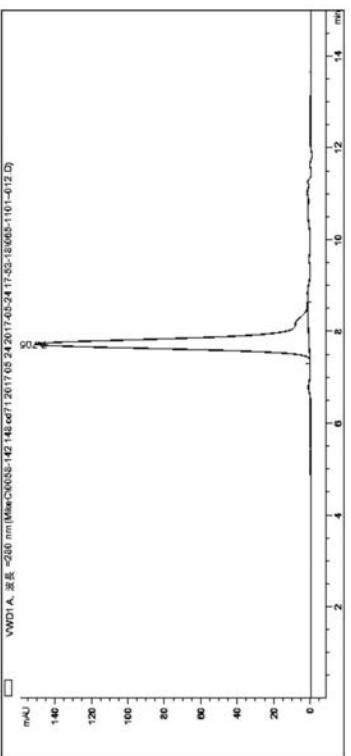
【図 5 A】



【図 5 B】



【図 5 C】



【図 6 A】

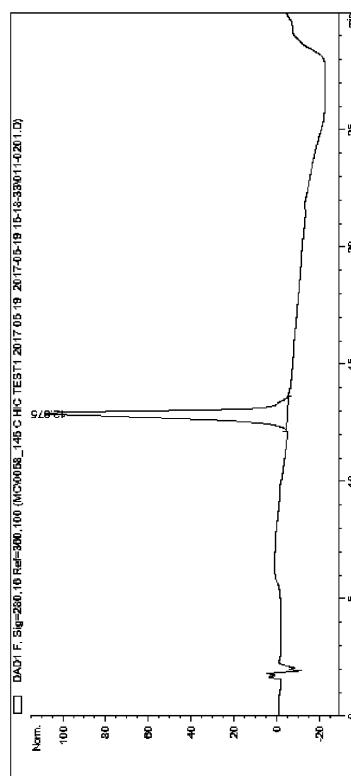


FIG. 6A

【 図 6 B 】

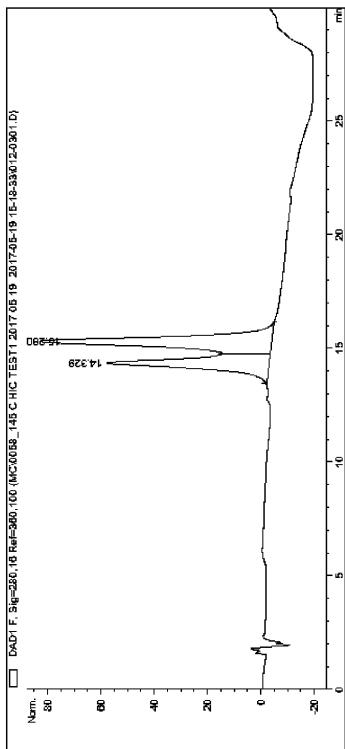


FIG. 6B

【 図 6 C 】

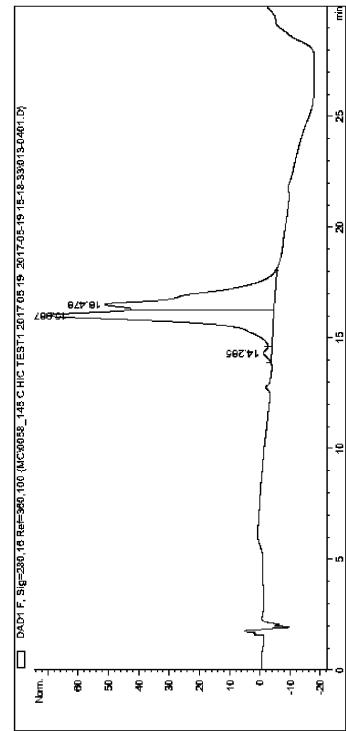


FIG. 6C

【図7A】

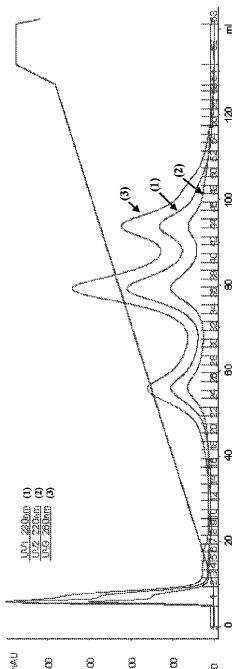


FIG. 7A

【 図 7 B 】

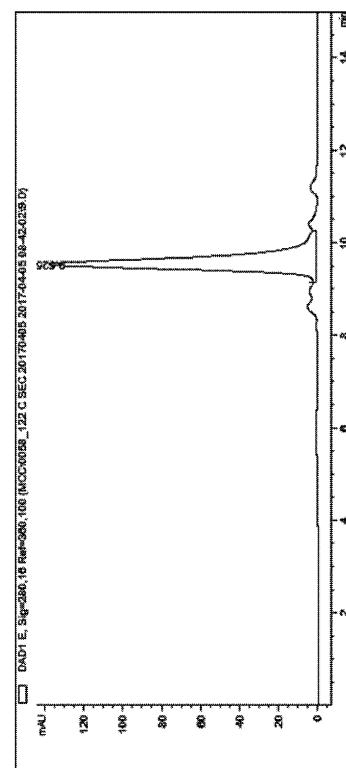


FIG 7B

【図 7 C】

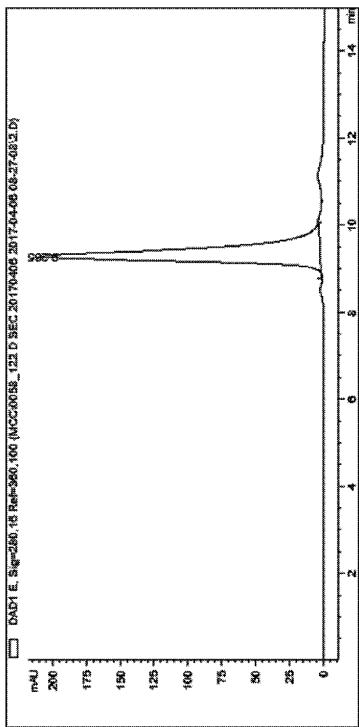


FIG. 7C

【図 7 D】

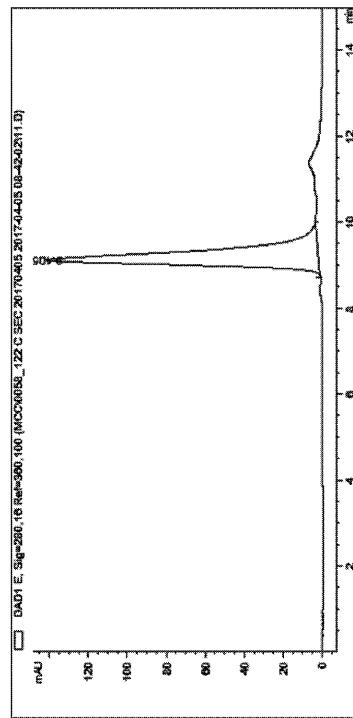


FIG. 7D

【図 7 E】

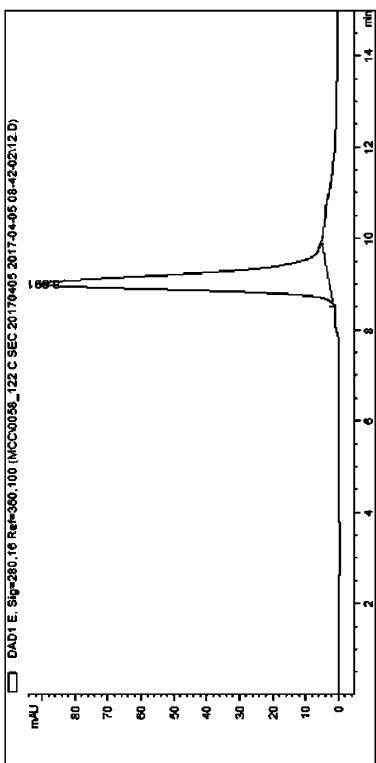


FIG. 7E

【図 7 F】

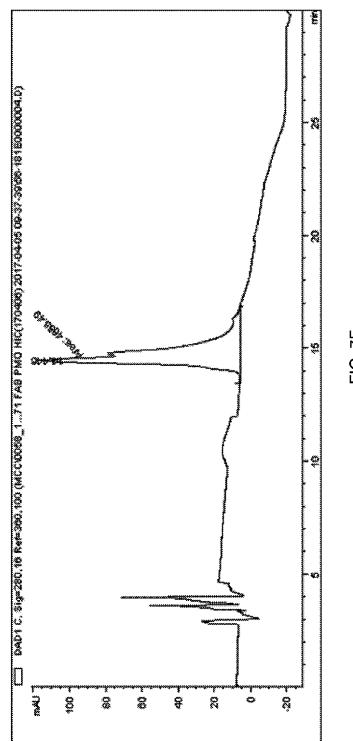


FIG. 7F

【図 7 G】

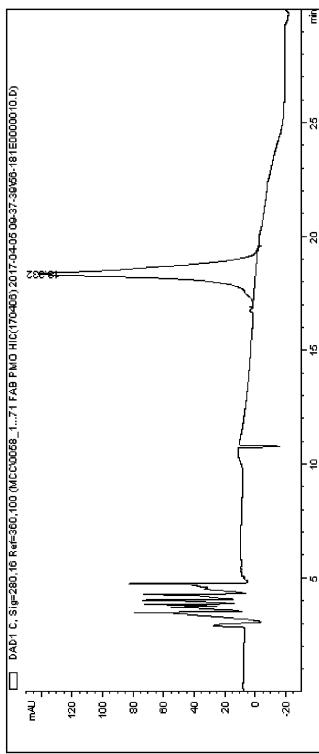


FIG. 7G

【図 7 H】

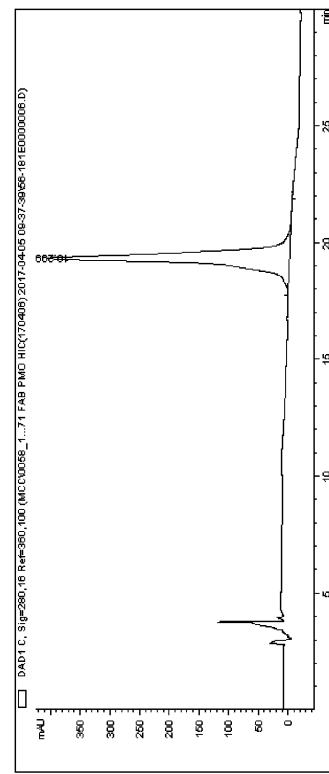


FIG. 7H

【図 7 I】

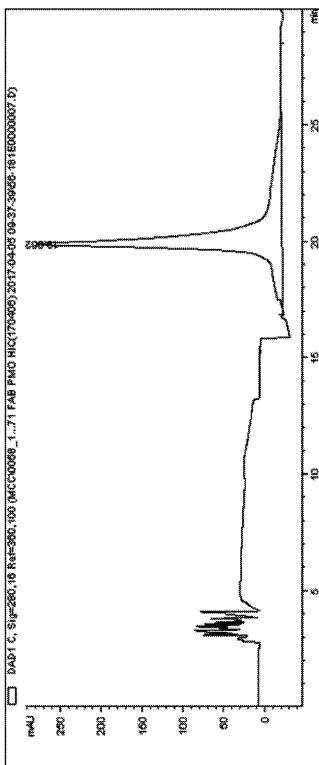


FIG. 7I

【図 8 A】

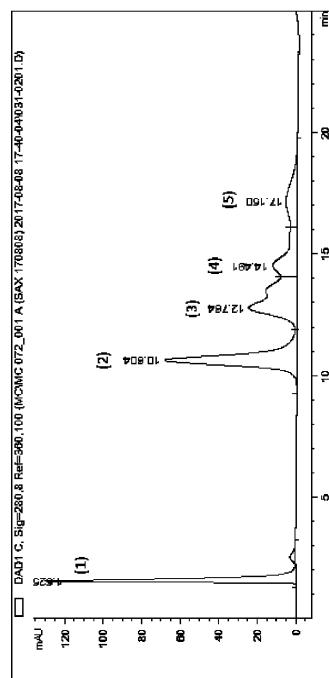


FIG. 8A

【図 8 B】

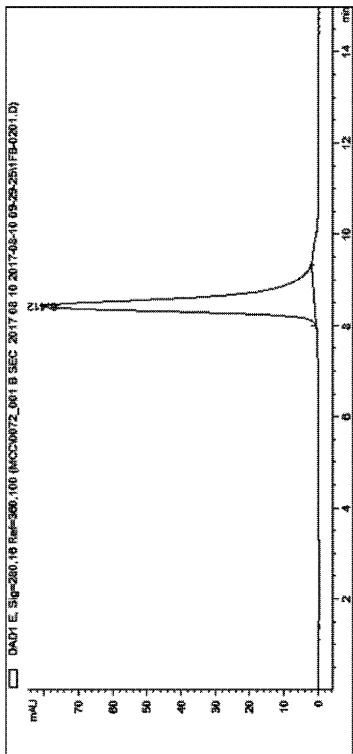


FIG. 8B

【図 8 C】

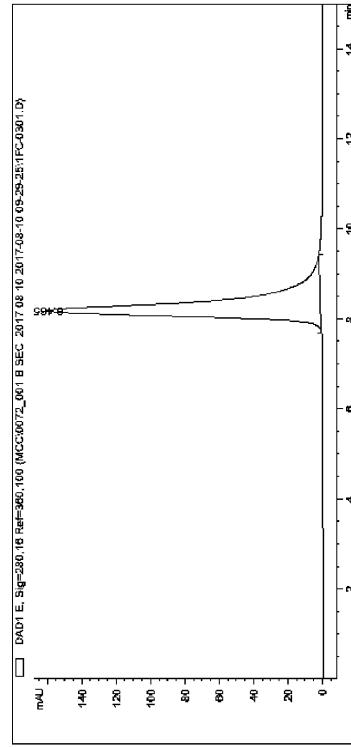


FIG. 8C

【図 8 D】

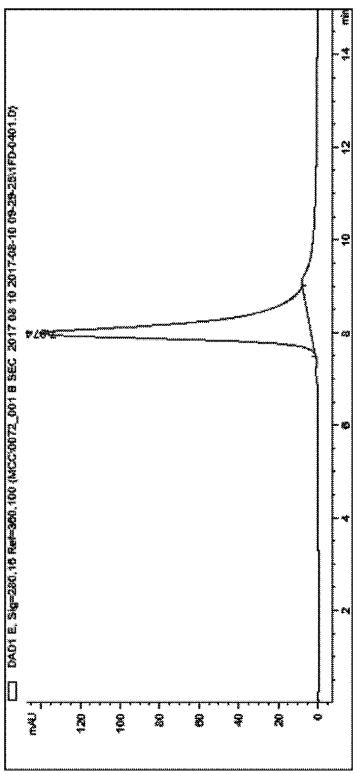


FIG. 8D

【図 8 E】

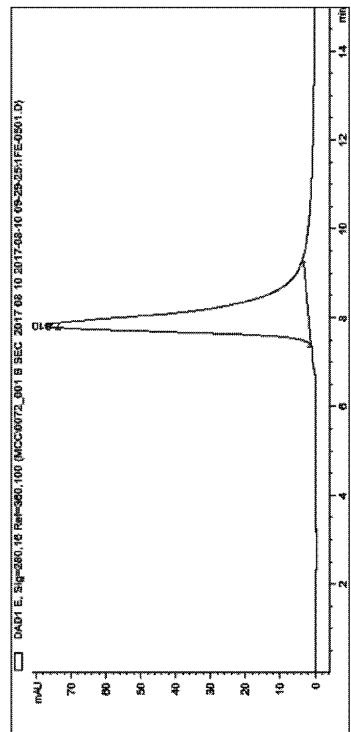


FIG. 8E

【図 8 F】

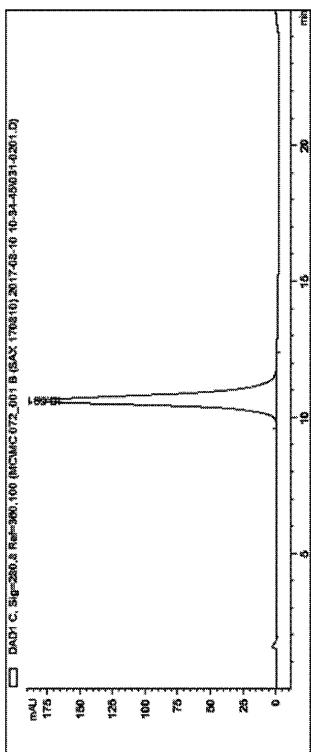


FIG. 8F

【図 8 G】

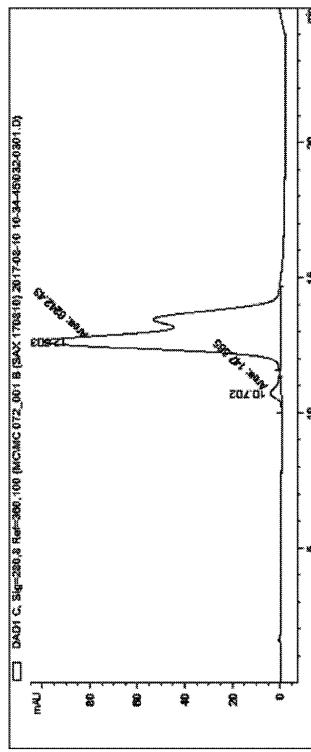


FIG. 8G

【図 8 H】

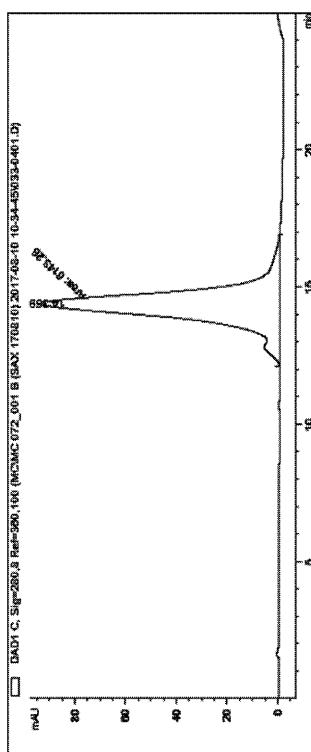


FIG. 8H

【図 9】

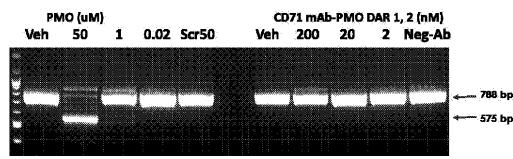


FIG. 9

【図 10】

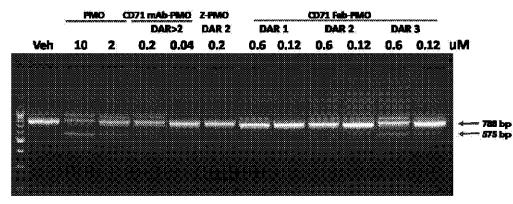


FIG. 10

【図 11】

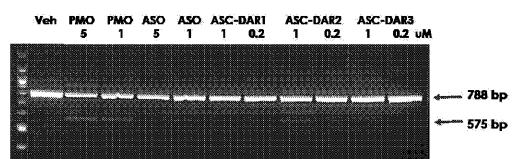
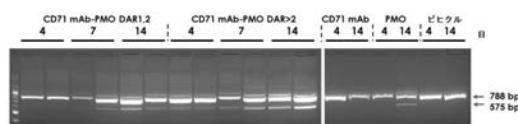
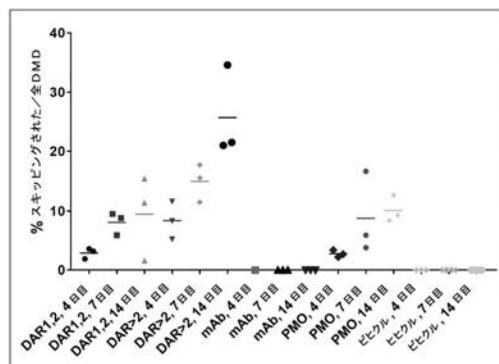


FIG. 11

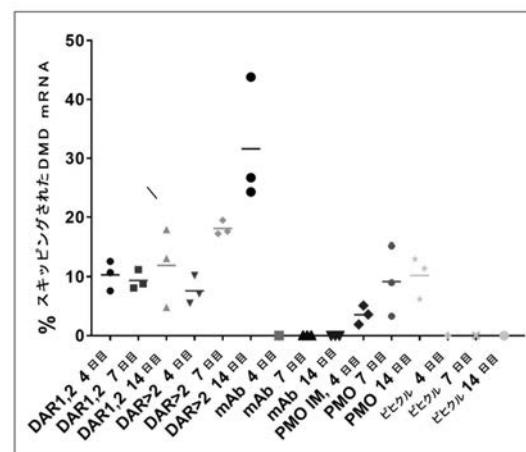
【図 1 2 A】



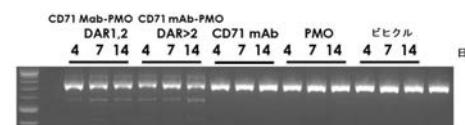
【図 1 2 B】



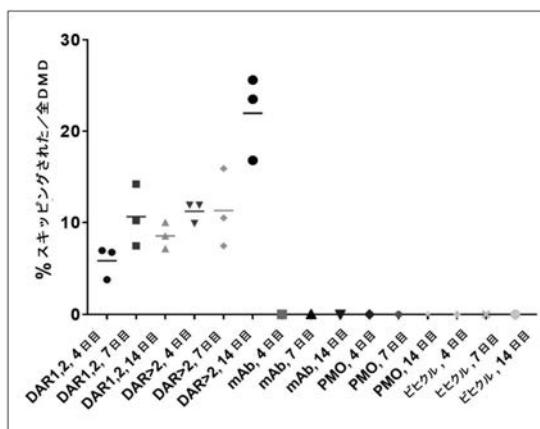
【図 1 2 C】



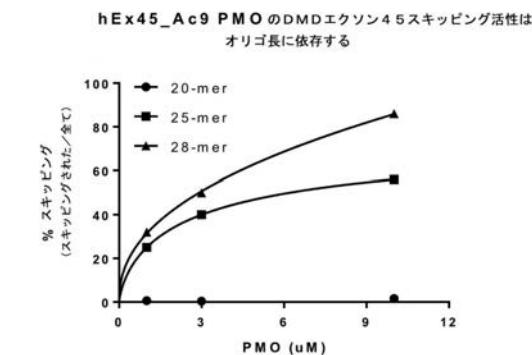
【図 1 3 A】



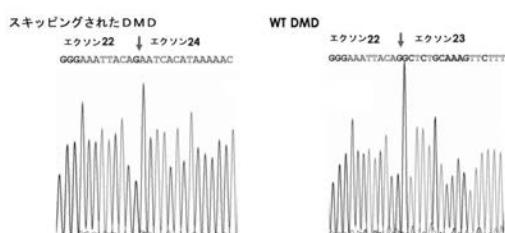
【図 1 3 B】



【図 1 5】

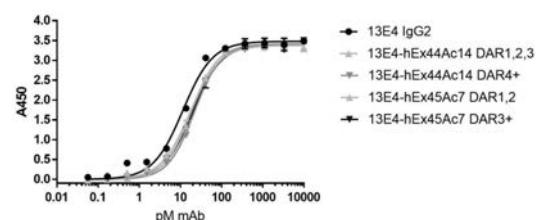


【図 1 4】



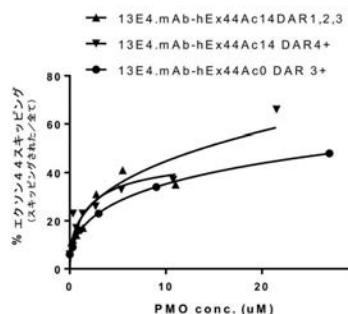
【図 1 6】

**hTfR1.mAb および hTfR1.mAb-PMO 抱合体は
同様の親和性を有する hTfR1を結合する**



【図 17】

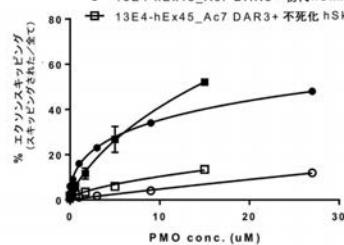
hTfR1.mAb-PMO 抱合体は、初代ヒト骨格筋細胞における DMD エクソン 4.4 スキッピングを媒介する



【図 18】

hTfR1.mAb-PMO 抱合体は、初代の不死化ヒト骨格筋細胞の筋管において同様の DMD エクソンスキッピング活性を示す

◆ 13E4-hEx44_Ac0 DAR3+ 初代 hSkMC 筋管
■ 13E4-hEx44_Ac0 DAR3+ 不死化 hSkMC 筋管
○ 13E4-hEx45_Ac7 DAR3+ 初代 hSkMC 筋管
□ 13E4-hEx45_Ac7 DAR3+ 不死化 hSkMC 筋管



【配列表】

2020537497000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2018/052289
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/7088; A61K 47/50; A61K 48/00; C12N 15/11; C12N 15/113 (2018.01) CPC - A61K 48/00; C12N 15/113; C12N 2310/11; C12N 2310/3513; C12N 2320/33 (2018.08)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/375; 435/91.1; 514/44A; 514/44R; 536/23.1 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/0053262 A1 (PROSENA TECHNOLOGIES B.V. et al) 25 February 2016 (25.02.2016) entire document	1, 2
Y		3-10, 49, 50, 60, 61
X	US 2017/0204410 A1 (NIPPON SHINYAKU CO., LTD. et al) 20 July 2017 (20.07.2017) entire document	62, 63
X	US 2011/0294753 A1 (DE KIMPE et al) 01 December 2011 (01.12.2011) entire document	64
Y	DE ANGELIS et al. "Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Δ48-50 DMD cells." Proc Natl Acad Sci USA, 20 June 2002 (20.06.2002), Vol. 99, Pgs. 9456-9461. entire document	3-10
Y	US 2016/0002637 A1 (SAREPTA THERAPEUTICS, INC.) 07 January 2016 (07.01.2016) entire document	49, 50
Y	US 2016/0367687 A1 (TEKMIRA PHARMACEUTICALS CORPORATION) 22 December 2016 (22.12.2016) entire document	60, 61
A	US 2016/0304864 A1 (BIOMARIN TECHNOLOGIES B.V. et al) 20 October 2016 (20.10.2016) entire document	1-10, 49, 50, 60-64
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 December 2018	Date of mailing of the international search report 11 JAN 2019	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2018/052289
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13<i>ter</i>.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input checked="" type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13<i>ter</i>.1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13<i>ter</i>.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments: SEQ ID NOs:1056-1058 and 1087-1089 were searched.</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/052289

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 11-48, 51-59, 65-75 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 21/04	(2006.01)	A 6 1 P 21/04
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 47/68	(2017.01)	A 6 1 K 47/68
A 6 1 K 47/62	(2017.01)	A 6 1 K 47/62
A 6 1 K 47/60	(2017.01)	A 6 1 K 47/60
A 6 1 K 31/7125	(2006.01)	A 6 1 K 31/7125
A 6 1 K 31/713	(2006.01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 K 31/712	(2006.01)	A 6 1 K 31/712

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(特許序注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72)発明者 ジアル , アンドリュー ジョン

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トリー・パインズ・コード 1 0 9 7 5 スイート 1 5 0

(72)発明者 コクラン ,マイケル カラミアン

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トリー・パインズ・コード 1 0 9 7 5 スイート 1 5 0

(72)発明者 ホウアン , ハンホア

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トリー・パインズ・コード 1 0 9 7 5 スイート 1 5 0

(72)発明者 ドッパラブディ , ベンカタ ラマナ

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トリー・パインズ・コード 1 0 9 7 5 スイート 1 5 0

(72)発明者 バーク , ロブ

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トリー・パインズ・コード 1 0 9 7 5 スイート 1 5 0

(72)発明者 ダリモント , ベアトリス ダイアナ

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トリー・パインズ・コード 1 0 9 7 5 スイート 1 5 0

(72)発明者 シ , ユンユ

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トリー・パインズ・コード 1 0 9 7 5 スイート 1 5 0

(72)発明者 ジョンズ , レイチェル

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トリー・パインズ・コード 1 0 9 7 5 スイート 1 5 0

4C084 AA13 MA55 NA13 NA14 ZA011 ZA361 ZA941 ZB211 ZB261
4C086 AA01 AA02 AA03 MA01 MA04 MA55 NA13 NA14 ZA01 ZA36
ZA94 ZB21 ZB26