

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6873052号
(P6873052)

(45) 発行日 令和3年5月19日 (2021.5.19)

(24) 登録日 令和3年4月22日 (2021.4.22)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)**A 6 1 K 48/00 (2006.01)****A 6 1 P 17/00 (2006.01)****A 6 1 K 31/787 (2006.01)****A 6 1 P 43/00 (2006.01)**

C 1 2 N 15/113 Z N A Z

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 17/00

A 6 1 K 31/787

A 6 1 P 43/00 1 0 5

請求項の数 19 (全 105 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-562026 (P2017-562026)
 (86) (22) 出願日 平成28年6月1日 (2016.6.1)
 (65) 公表番号 特表2018-518167 (P2018-518167A)
 (43) 公表日 平成30年7月12日 (2018.7.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/035326
 (87) 国際公開番号 W02016/196670
 (87) 国際公開日 平成28年12月8日 (2016.12.8)
 審査請求日 令和1年5月29日 (2019.5.29)
 (31) 優先権主張番号 62/169,454
 (32) 優先日 平成27年6月1日 (2015.6.1)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 515192368
 サレプタ セラピューティクス, インコー
 ポレイテッド
 アメリカ合衆国 O 2 1 4 2 マサチュー
 セッツ州, ケンブリッジ, スイート 7
 ファースト ストリート 2 1 5
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

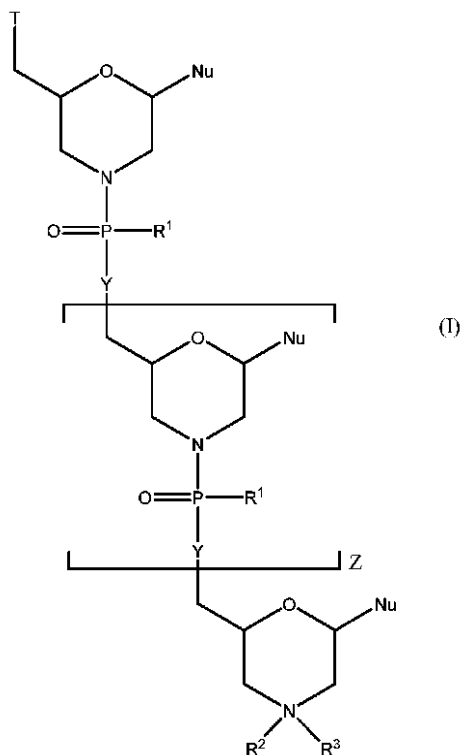
(54) 【発明の名称】 V I I 型コラーゲンにおけるアンチセンス誘導エクソン排除

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) の化合物：

【化 6 1】



10

20

または薬学的に許容されるその塩 [式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり、

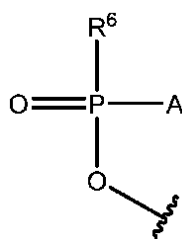
Z は、10 ~ 38 の整数であり、

各 Y は、O および $-NR^4$ から独立に選択され、各 R^4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アラキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ 、および G から独立に選択され、 R^5 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、n は、1 ~ 5 の整数であり、

T は、OH および式：

30

【化 6 2】



の部分から選択され、

式中、

40

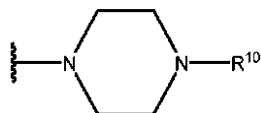
A は、 $-OH$ 、 $-N(R^7)_2R^8$ 、および R^1 から選択され、

各 R^7 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、

R^6 は、OH、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ 、および式：

【化 6 3】



の部分から選択され、

50

式中、

R^9 は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

R^{10} は、G、 $-C(O)-R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、

m は、1～5の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、 y は、3～10の整数であり、

y 個のアルキル基はそれぞれ、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^{12} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

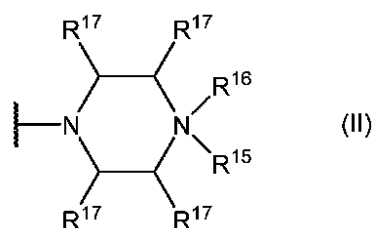
10

R^1 の各例は、

$-N(R^{13})_2R^{14}$ [各 R^{13} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、 R^{14} は、電子対およびHから選択される]、

式(II)：

【化64】



20

の部分

[式中、

R^{15} は、H、G、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_qNR^{18}C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{18}C(=NH)NH_2$ から選択され、

R^{18} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

q は、1～5の整数であり、

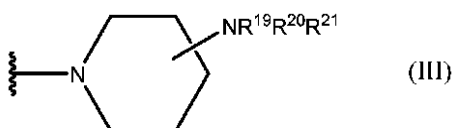
R^{16} は、電子対およびHから選択され、

30

各 R^{17} は、Hおよびメチルから独立に選択される]、および

式(III)：

【化65】



の部分

[式中、

R^{19} は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_rN$
 $R^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)N$
 H_2 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{22}C(=NH)NH_2$ 、
 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_4NH_2$ 、およびGから選択され、

40

R^{22} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

r は、1～5の整数であり、

R^{20} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

R^{21} は、電子対およびHから選択される]

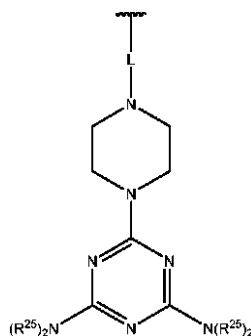
から独立に選択され、

R^{22} は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)-R^{23}$ 、 $-C(O)(CH_2)_sNR^{24}C(=NH)$

50

NH_2 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{NR}^{24}\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、および式：

【化 6 6】



10

の部分から選択され、

式中、

R^{23} は、式 $-(\text{O}-\text{アルキル})_v-\text{OH}$ を有し、 v は、 $3 \sim 10$ の整数であり、 v 個のアルキル基はそれぞれ、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ アルキルから独立に選択され、

R^{24} は、 H および $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルから選択され、

s は、 $1 \sim 5$ の整数であり、

L は、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_6\text{C}(\text{O})-$ および $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{S}_2(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})-$ から選択され、

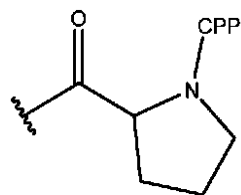
20

各 R^{25} は、式 $-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{26})_2$ を有し、各 R^{26} は、式 $-(\text{CH}_2)_6\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ を有し、

R^3 は、電子対、 H 、および $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルから選択され、

G は、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{NH}-\text{CPP}$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NH}-\text{CPP}$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{NH}-\text{CPP}$ 、および $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{NH}-\text{CPP}$ から選択される細胞透過性ペプチド（「CPP」）およびリンカー部分であるか、または G は、式：

【化 6 7】



30

を有し、式中、該 CPP は、 G の最大で 1 つの例が存在するという条件で、該リンカー部分に、該 CPP のカルボキシ末端において、アミド結合により結合しており、

該ターゲティング配列は、ヒト VII 型コラーゲンプレ mRNA のエクソン / イントロン接合部にわたる標的領域内の、12 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的であり、該連続ヌクレオチドは、該エクソン / イントロン接合部を含み、該エクソン / イントロン接合部は、エクソン 80 / イントロン 80 のスプライス接合部を含み、

40

該ターゲティング配列は、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される配列であり、配列中、 n は、ウラシル（U）、チミン（T）またはイノシンから選択される。

【請求項 2】

Y が、 O であり、 R^2 が、 H または G から選択され、 R^3 が、電子対または H から選択される、請求項 1 に記載の化合物 または薬学的に許容されるその塩。

【請求項 3】

R^2 が、 G であり、前記 CPP が、配列番号 9 ~ 24 から選択される配列を有する、請求項 2 に記載の化合物 または薬学的に許容されるその塩。

【請求項 4】

各 R^1 が、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ である、請求項 1 に記載の化合物 または薬学的に許容され

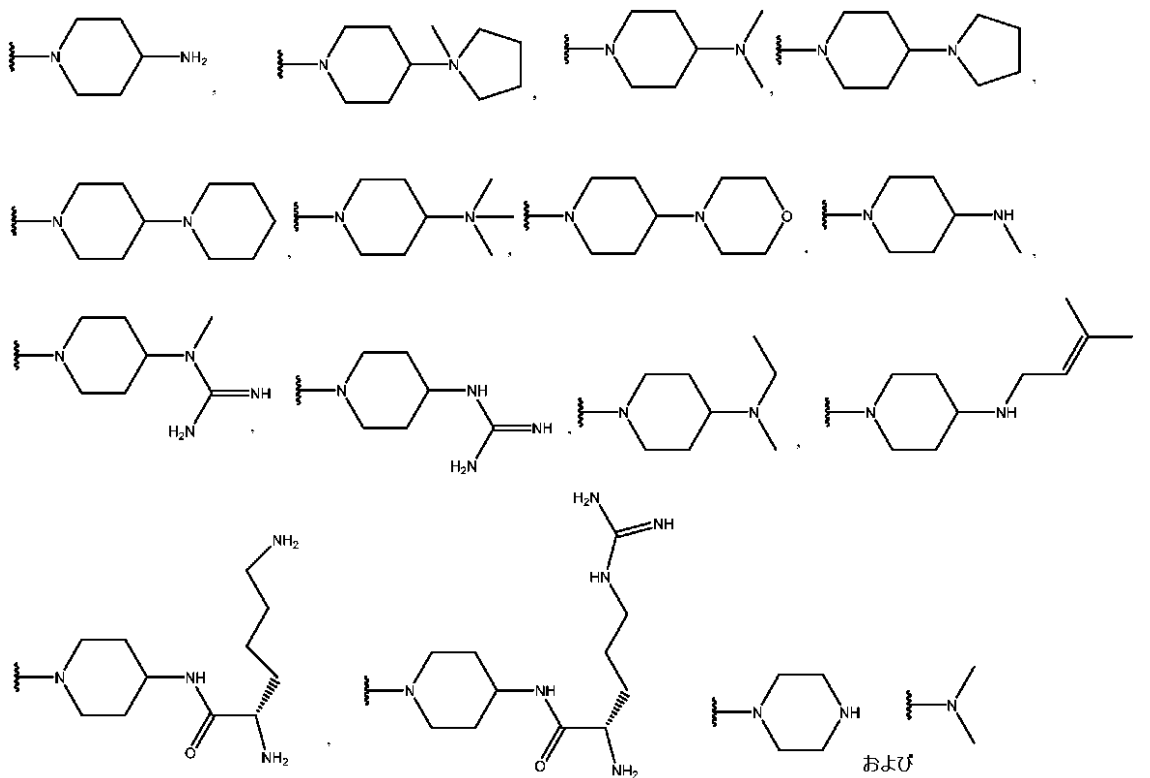
50

るその塩。

【請求項 5】

少なくとも 1 つの R^1 が、

【化 6 8】



10

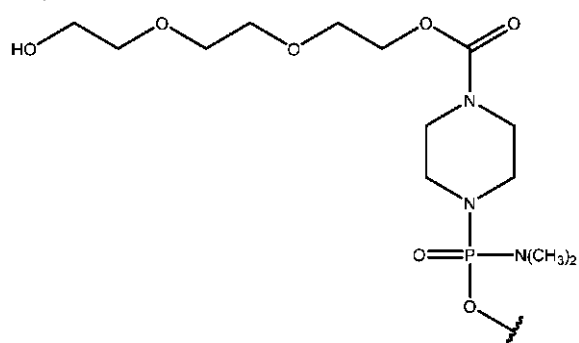
20

から選択される、請求項 1 に記載の化合物または薬学的に許容されるその塩。

【請求項 6】

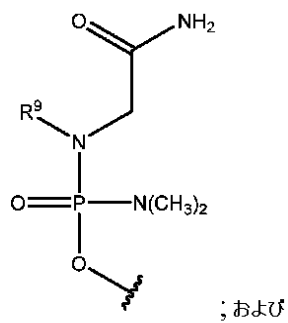
各 Y が、O であり、T が、

【化 6 9】



30

【化 7 0】



10

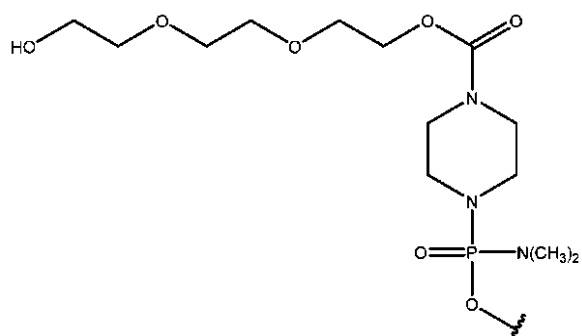


から選択される、請求項 1 に記載の化合物または薬学的に許容されるその塩。

【請求項 7】

T が、式：

【化 7 1】



20

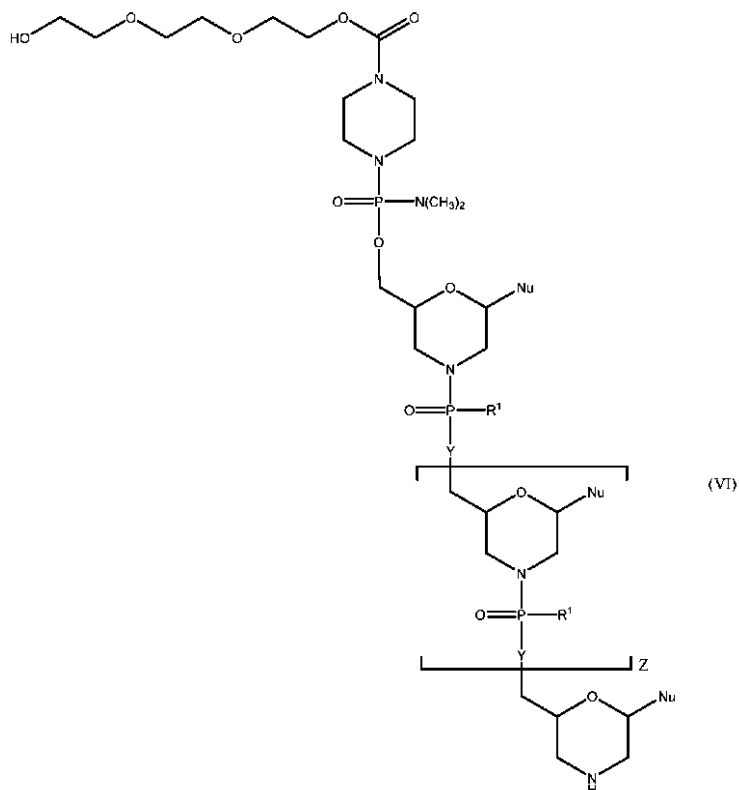
を有する、請求項 1 に記載の化合物または薬学的に許容されるその塩。

【請求項 8】

式 (VI)：

30

【化 7 2】



の化合物または薬学的に許容されるその塩であって、式中、

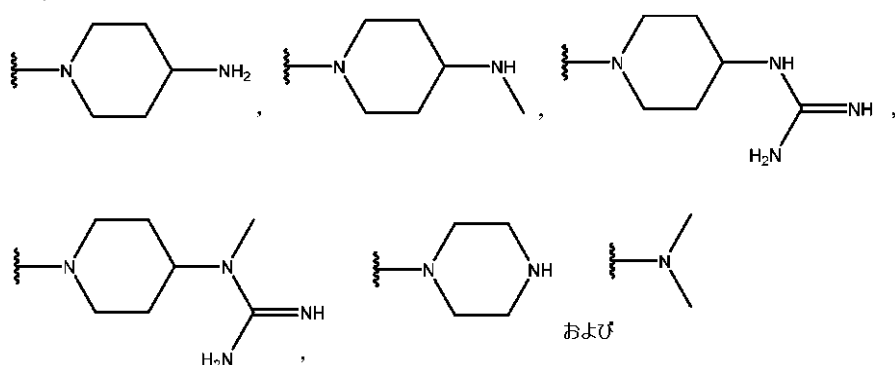
各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

Z は、15～25の整数であり；

各 Y は、O であり；

各 R¹ は、

【化 7 3】



から独立に選択され、

ここで、該ターゲティング配列は、配列番号 2、3、4 もしくは 6 であり、配列中、n は、ウラシル (U)、チミン (T) または イノシン から選択される、化合物または薬学的に許容されるその塩。

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の化合物または薬学的に許容されるその塩を含む医薬組成物。

【請求項 10】

栄養障害型表皮水疱症および関連障害の処置を必要とする被験体において栄養障害型表皮水疱症および関連障害を処置するための組成物であって、

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の化合物または薬学的に許容されるその塩を含む

10

20

30

40

50

、組成物。

【請求項 1 1】

表皮水疱症および関連障害が、劣性型栄養障害型表皮水疱症、優性型栄養障害型表皮水疱症、Halllopeau-Siemens型栄養障害型表皮水疱症、非重症型の劣性栄養障害型表皮水疱症、反対型の劣性栄養障害型表皮水疱症、求心型の劣性栄養障害型表皮水疱症、非Halllopeau-Siemens型栄養障害型表皮水疱症を含む、請求項 1 0 に記載の組成物。

【請求項 1 2】

機能的なヒトV I I型コラーゲン発現の増加を必要とする被験体において、機能的なヒトV I I型コラーゲン発現を増加させるための組成物であって、

10

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み

、
該組成物が、該被験体に投与され、

該化合物は、該ヒトV I I型コラーゲンプレmRNA転写物中の該標的領域に結合し、
機能的なヒトV I I型コラーゲンの発現が増加することを特徴とする、組成物。

【請求項 1 3】

前記化合物によって、機能的なヒトV I I型コラーゲンの前記発現が約 5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、または 1 0 0 % 増加する、請求項 1 2 に記載の組成物。

20

【請求項 1 4】

機能的なヒトV I I型コラーゲンの発現を増加させるための組成物であって、

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み

、
該組成物が投与され、機能的なヒトV I I型コラーゲンの翻訳が増加することを特徴とする、組成物。

【請求項 1 5】

機能的なヒトV I I型コラーゲン発現が、約 5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、または 1 0 0 % 増加する、請求項 1 4 に記載の組成物。

30

【請求項 1 6】

係留線維における機能的なヒトV I I型コラーゲタンパク質の蓄積を増加させる、係留線維の蓄積を増加させる、または係留線維における機能的なヒトV I I型コラーゲタンパク質の蓄積を増加させ、かつ係留線維の蓄積を増加させるための組成物であって、

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み、
該組成物が投与され、機能的なヒトV I I型コラーゲンの翻訳が増加することを特徴とする、組成物。

40

【請求項 1 7】

栄養障害型表皮水疱症および関連障害を処置するための医薬であって、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の化合物または薬学的に許容されるその塩を含む医薬。

【請求項 1 8】

栄養障害型表皮水疱症および関連障害の進行を阻害するための組成物であって、

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み、
該組成物が投与され、機能的なヒトV I I型コラーゲンの翻訳が増加することを特徴とする、組成物。

【請求項 1 9】

栄養障害型表皮水疱症もしくはその関連障害を有する被験体において、係留線維にお

50

る機能的なヒトⅤⅠⅠ型コラーゲンの蓄積を増加させる、栄養障害型表皮水疱症もしくはその関連障害を有する被験体において係留線維の蓄積を増加させる、または栄養障害型表皮水疱症もしくはその関連障害を有する被験体において、係留線維における機能的なヒトⅤⅠⅠ型コラーゲンの蓄積、および係留線維の蓄積を増加させるための組成物であって、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の化合物または薬学的に許容されるその塩を含み、

該化合物の有効量が投与され、

機能的なヒトⅤⅠⅠ型コラーゲンの翻訳が増加し、

1) 該被験体における、係留線維における機能的なヒトⅤⅠⅠ型コラーゲンタンパク質の蓄積が増加する、2) 該被験体における係留線維の蓄積が増加する、または3) 該被験体における、係留線維における機能的なヒトⅤⅠⅠ型コラーゲンタンパク質および係留線維の蓄積が増加する

10

ことを特徴とする、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表に関する言明

本出願と関連する配列表は、紙のコピーの代わりにテキストフォーマットで提供され、参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含有するテキストファイルの名称は、6746300216__SequenceListing.txtである。テキストファイルは、約10KBであり、2016年6月1日に作成しており、EFS-Webを通して電子的に提出している。

20

【0002】

背景

本開示の分野

機能的なヒトⅤⅠⅠ型コラーゲンの発現レベルを増加させるための方法と、栄養障害型表皮水疱症およびヒトⅤⅠⅠ型コラーゲンの発現と関連する関連障害を処置するための方法と、ヒトⅤⅠⅠ型コラーゲンプレmRNA転写物内のエクソン80の発現レベルを低下させ、これにより、ヒトⅤⅠⅠ型コラーゲン遺伝子(COL7A1)によりコードされる機能的なヒトⅤⅠⅠ型コラーゲンタンパク質のレベルを増加させるための方法とを含む、アンチセンスオリゴマーおよび関連の組成物ならびに方法が開示される。

30

【背景技術】

【0003】

関連技術についての記載

アンチセンス技術は近年、メッセンジャーRNA前駆体(プレmRNA)のスプライシング過程を変更するように適応している。プレmRNAとは、転写として公知の過程を介して、DNA転写物から合成されるメッセンジャーRNAの未成熟一本鎖である。プレmRNA転写物は、2つの異なるセグメント型である、イントロンおよびエクソンを含む。イントロンは、スプライソソーム複合体により一般になされる、スプライシングと呼ばれる過程において除去される。残りのエクソンは、一体に接続され、最終的な成熟mRNA分子の一部となる。

40

【0004】

イントロン/エクソンスプライシングの正確な過程は、イントロン領域内の、多様な構造エレメントを伴う。これらは、イントロンの5'末端に位置するイントロンスプライスドナー部位、イントロンの3'末端近傍に位置する分岐部位、およびイントロンの3'末端に位置するスプライスアクセプター部位を含む。スプライスドナー部位は一般に、エクソン/イントロン接合部の5'末端において、保存的GU配列を含む。スプライスアクセプター部位は一般に、イントロン/エクソン接合部の3'末端において、AG配列を含む。

【0005】

50

スプライシング過程の変異は、mRNA内のエクソン組成を変異させることにより、結果として生じるmRNAの変異を創出する場合があります。選択的スプライシングと称することが多い過程である。選択的スプライシングは、多くの形で生じうる。エクソンは、延長される場合もあり、スキップされる場合もある。イントロンの一部が保持される場合もある。選択的スプライシングは、単一の遺伝子から複数のタンパク質を産生することにより、ヒトゲノムのコード潜在力を増加させる。不適切な選択的スプライシングはまた、ヒト疾患数の増加とも関連する。

【0006】

表皮水疱症（EB）は、皮膚基底膜帯内の皮膚の脆弱性を特徴とし、かなりの臨床的および遺伝的異質性が常染色体優性または常染色体劣性に遺伝する、一群の遺伝性の機械的水疱障害（mechanobullous disorder）である。EBは、診断用の電子顕微鏡検査および/または免疫エピトープマッピング（Fineら、2000年）によって決定される組織分離のレベルに基づき3つのカテゴリーに大別されており、単純型のEB（EBS）は、表皮底層の基底ケラチノサイト内での組織分離を示し、接合部型のEB（JEB）は、真皮表皮基底膜における透明帯内での裂隙を示し、栄養障害型のEB（DEB）は、上部の真皮乳頭層内の基底膜緻密層より下での組織分離を示す（Varkiら、2007年）。

【0007】

DEBは、VII型コラーゲンをコードする、染色体領域3p21上のCOL7A1（Online Mendelian Inheritance in Man（登録商標）（OMIM）*120120）の変異によって引き起こされる。DEBは、優性または劣性に遺伝する。劣性型であるRDEB（OMIM#226600）は、子供および若年成人における最も重症の遺伝性皮膚症の1つである。優性型であるDDEB（OMIM#131750）は、より重症でないのが普通である。DEB患者は、生まれたときから、表皮と真皮の接着が損なわれる結果、軽度の外傷後、皮膚および粘膜に重症の水疱形成を生じる。この疾患は、重症の局所および全身合併症につながり、予後は、侵襲性の皮膚がんのリスクが高まるために、不良である。実際に、罹患個体の50%より多くが、まさに転移性扁平上皮癌のために、40才を迎える前に死亡する（Fineら、2000年）。RDEBには、最も重症である重症汎発型（Hallopeau-Siemens）、汎発性（generalised）非重症（温和）型、反対型（主に湾曲を伴う）、および求心（centripetalis）（局在）型の4つの亜型が存在する。こうした臨床異型は全て、係留線維に構造的欠陥をもたらす、COL7A1の機能喪失型変異によって引き起こされる（Hilalら、1993年；Hovnanianら、1992年）。

【0008】

VII型コラーゲンは、真皮-表皮接着のための重要な付着構造物である係留線維の主成分である。

【0009】

VII型コラーゲンは、290kDaのタンパク質前駆体として合成される。このタンパク質は、ホモ三量体四次構造を有し、3つの同一の1鎖それぞれが、3つの主要なドメイン：アミノ末端にある130kDaの球状の非コラーゲン性ドメイン1（NC1）、140kDaのらせん状のコラーゲン性ドメイン、およびカルボキシ末端にある小さい非コラーゲン性ドメイン2（NC2）からなる。細胞外マトリックスでは、VII型コラーゲンは、さらに逆平行二量体へと集合し、らせん状部分は、アミノ末端球状ドメインを反対側の端に（at opposite ends）配置する、短いカルボキシ末端重複部分においてジスルフィド結合している。NC1球状ドメインは、エクソン2～27によってコードされる。中央のコラーゲン性ドメインは、エクソン28～112によってコードされ、折り畳まれて断続性のコラーゲン三重らせんとなっている。周期的なGly-X-Xコラーゲン性配列におけるより大きな中断は、エクソン71および72によってコードされる、いわゆるヒンジセグメントである。これは、予測されるα-ヘリックス構造と共に、分子に柔軟性を付与すると考えられる。NC2ドメインは、エクソン113～118によってコー

10

20

30

40

50

ドされる。NC2ドメインは、a1鎖の三量体化、およびホモ三量体の逆平行二量体化に必要となる。

【0010】

VII型コラーゲンをコードする遺伝子であるCOL7A1は、118のエクソンにセグメント化され、ヒト染色体3p21上に、32kbにわたって広がっている。最も短いエクソンは、27ヌクレオチド長であり、最も長いものの長さは、201ヌクレオチドである。118のエクソンの中で、エクソン28～112がインフレームであり、こうしたエクソンのいずれかをスキップしながらもmRNAのリーディングフレームを保存することは、理論上実現可能であることが示唆される。

【0011】

したがって、新規のアンチセンスオリゴマーおよび本明細書に記載する通りの機能的なヒトVII型コラーゲタンパク質の発現を増加させる方法は、有利であると考えられる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Varkiら、J. Med. Genet.、2007年、44巻：181～192頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

概要

機能的なヒトVII型コラーゲタンパク質の発現を増加させるための組成物および方法が提供される。多様な実施形態では、エクソン80を含むヒトVII型コラーゲンmRNAの発現レベルを低下させるための、多様に記載されたアンチセンスオリゴマーもさらに提供される。

【0014】

多様な態様は、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である、少なくとも1つのサブユニットと；ヒトVII型コラーゲンmRNAのエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列とを任意選択で含む、12～40サブユニットのアンチセンスオリゴマーを含む。多様な実施形態では、連続ヌクレオチドは、エクソン/イントロンスプライス接合部を含む。さらなる実施形態では、エクソン/イントロンスプライス接合部は、エクソン80/イントロン80（例えば、配列番号1）のスプライス接合部を含む。

【0015】

さらなる態様は、ヒトVII型コラーゲンmRNAのエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる標的領域と特異的にハイブリダイズする、12～40サブユニットのアンチセンスオリゴマーを含む。エクソン/イントロンスプライス接合部は、エクソン80/イントロン80の境目(intersect)にあるスプライス接合部である。複数の実施形態では、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部は、配列番号1内のスプライス接合部を含む。

【0016】

さらなる態様は、修飾糖部分を含む、ヌクレオチド類似体サブユニットを有する、アンチセンスオリゴマーを含む。多様な実施形態では、少なくとも1つの修飾糖部分は、ペプチド核酸(PNA)サブユニット、ロック核酸(LNA)サブユニット、2'-O、4'-C-エチレン架橋核酸(ENA)サブユニット、トリシクロDNA(tc-DNA)サブユニット、2'-O-メチルサブユニット、2'-O-メトキシエチルサブユニット、2'-フルオロサブユニット、2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]サブユニット、およびモルホリノサブユニットを含む。

【0017】

さらなる態様は、修飾ヌクレオシド間連結を含む、ヌクレオチド類似体サブユニットを有する、アンチセンスオリゴマーを含む。多様な実施形態では、修飾ヌクレオシド間連結は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結から選択される。さらなる実施形態では、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結は、(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、置換(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分、または置換4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分に共有結合したリン原子を含む。

【0018】

さらなる態様は、修飾糖部分と修飾ヌクレオシド間連結との少なくとも1つの組合せを含む、ヌクレオチド類似体サブユニットを有する、アンチセンスオリゴマーを含む。多様な実施形態では、1または複数のサブユニットは、

10

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、モルホリノサブユニット、

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、2' O - メチルサブユニット、

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、2' O - メトキシエチルサブユニット、

20

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、2' - フルオロサブユニット、

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、2' O, 4' C - エチレン架橋核酸サブユニット、

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、2' - O - [2 - (N - メチルカルバモイル)エチル]サブユニット、

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、トリシクロDNAサブユニット、

30

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、ロックト核酸サブユニット、

ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結をさらに含み、ホスホロジアミデートのリン原子を、モルホリン環の窒素原子に共有結合させ、かつ、(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、もしくは置換(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分に共有結合させたモルホリノサブユニット、

ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結をさらに含み、ホスホロジアミデートのリン原子を、モルホリン環の窒素原子に共有結合させ、かつ、4 - アミノピペリジン - 1 - イル(4-aminopiperidin-1-yl)部分、もしくは置換4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分に共有結合させたモルホリノサブユニット、

40

ホスホロチオエートヌクレオシド間もしくはホスホルアミデートヌクレオシド間連結で置換された、リボース糖サブユニット、

ホスホロチオエートヌクレオシド間連結もしくはホスホルアミデートヌクレオシド間連結で置換された、デオキシリボース糖サブユニット、

任意選択で置換された、ペプチド核酸サブユニット、または前出の任意の組合せから選択される。

【0019】

50

多様な態様および実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴマーに共有結合したペプチドをさらに含む。多様な実施形態では、アルギニンに富む細胞透過性ペプチドは、アンチセンスオリゴマーの3'末端または5'末端にコンジュゲートしている。

【0020】

多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ヒトVII型コラーゲンプレmRNA標的領域と特異的にハイブリダイズする。標的領域は、表1に明示されたスプライス接合部配列を含みうる。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる標的領域と特異的にハイブリダイズする。

【0021】

多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、表2に明示されたターゲティング配列、表2のターゲティング配列のうちの、少なくとも12連続ヌクレオチドの断片、または表2のターゲティング配列に対する、少なくとも90%の配列同一性を有する改変体のうちのいずれかを含む。さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、表2に明示されたターゲティング配列からなるかまたはこれらから本質的になる。

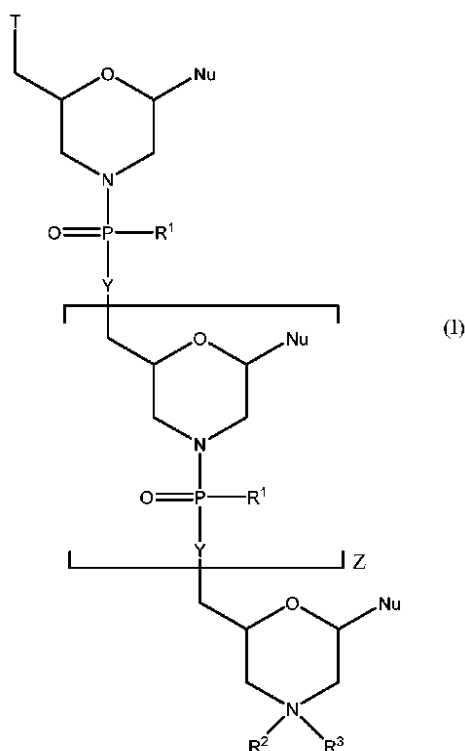
【0022】

多様な態様および実施形態では、ヌクレオチドサブユニットのヌクレオ塩基は、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、シトシン、イノシン、ヒポキサンチン、2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、C5-プロピニル修飾ピリミジン、および10-(9-

【0023】

多様な態様では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式(I)：

【化1】



の化合物または薬学的に許容されるその塩〔式中、

各Nuは、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

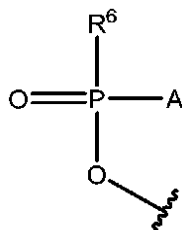
Zは、10～38の整数であり；

各Yは、Oおよび-NR⁴から独立に選択され、式中、各R⁴は、H、C₁～C₆アルキル、アラルキル、-C(=NH)NH₂、-C(O)(CH₂)_nNR⁵C(=NH)NH₂、-C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NR⁵C(=NH)NH₂、

および G から独立に選択され、式中、 R^5 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、 n は、1 ~ 5 の整数であり；

T は、OH および式：

【化 2】



10

の部分から選択され、式中、

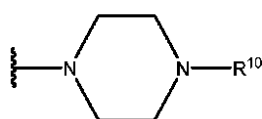
A は、-OH および $-N(R^7)_2R^8$ から選択され、式中、

各 R^7 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、そして

R^6 は、OH、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ 、および式：

【化 3】



20

の部分から選択され、式中、

R^9 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^{10} は、G、 $-C(O)-R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

m は、1 ~ 5 の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、 y は、3 ~ 10 の整数であり、

30

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

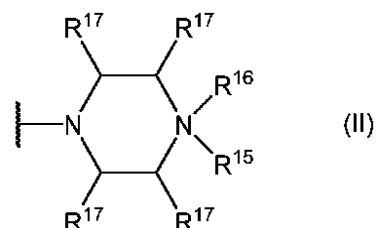
R^{12} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^1 の各例 (instance) は、

$-N(R^{13})_2R^{14}$ [式中、各 R^{13} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、そして R^{14} は電子対および H から選択される] ；

式 (II)：

【化 4】



(II)

40

の部分 [式中、

R^{15} は、H、G、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_qNR^{18}C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{18}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

R^{18} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

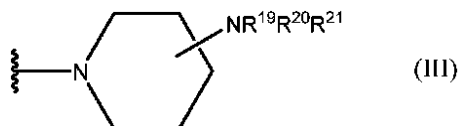
q は、1 ~ 5 の整数であり；

50

R^{16} は、電子対および H から選択され；そして
各 R^{17} は、H およびメチルから独立に選択される；および

式 (III)：

【化 5】



の部分 [式中、

R^{19} は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_r NR^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3 NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2 NHC(O)(CH_2)_5 NR^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_4 NH_2$ 、および G から選択され、式中、
 R^{22} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

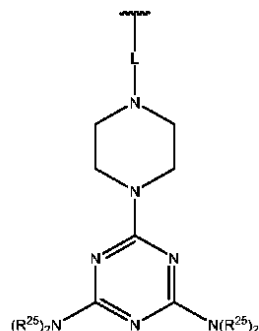
r は、1 ~ 5 の整数であり、

R^{20} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、 R^{21} は、電子対および H から選択される]

から独立に選択され；

R^{23} は、H、G、アシル、トリチル、4 - メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)-R^{24}$ 、 $-C(O)(CH_2)_s NR^{24}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2 NHC(O)(CH_2)_5 NR^{24}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3 NHC(=NH)NH_2$ 、および式：

【化 6】



の部分から選択され、式中、

R^{23} は、式 $-(O-アルキル)_v-OH$ を有し、式中、 v は、3 ~ 10 の整数であり、 v 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{24} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

s は、1 ~ 5 の整数であり；

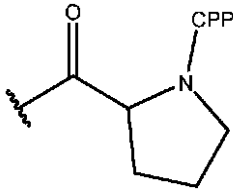
L は、 $-C(O)(CH_2)_6 C(O)-$ および $-C(O)(CH_2)_2 S_2(CH_2)_2 C(O)-$ から選択され；

各 R^{25} は、式 $-(CH_2)_2 OC(O)N(R^{26})_2$ を有し、式中、各 R^{26} は、式 $-(CH_2)_6 NHC(=NH)NH_2$ を有し、

R^{27} は、電子対、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

ここで、G は、 $-C(O)(CH_2)_5 NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2 NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2 NHC(O)(CH_2)_5 NH-CPP$ 、および $-C(O)CH_2 NH-CPP$ から選択される細胞透過性ペプチド (「CPP」) およびリンカー部分であるか、または G は、式：

【化 7】



を有し、式中、CPPは、Gの最大で1つの例が存在するという条件で、CPPのカルボキシ末端において、アミド結合により、リンカー部分に結合しており、

ここで、ターゲティング配列は、ヒトVII型コラーゲンpre-mRNAの、エクソン/イントロン接合部であって、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部を含むエクソン/イントロン接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的である]

10

である。一部の実施形態では、連続ヌクレオチドは、エクソン/イントロンスプライス接合部を含む。

【0024】

多様な実施形態では、エクソン80/イントロン80接合部は、配列番号1を含む。

【0025】

多様な実施形態では、Nuは独立に、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、シトシン、イノシン、ヒポキサンチン、2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、C5-プロピニル修飾ピリミジン、または10-(9-(アミノエトキシ)フェノキサジニル)である。

20

【0026】

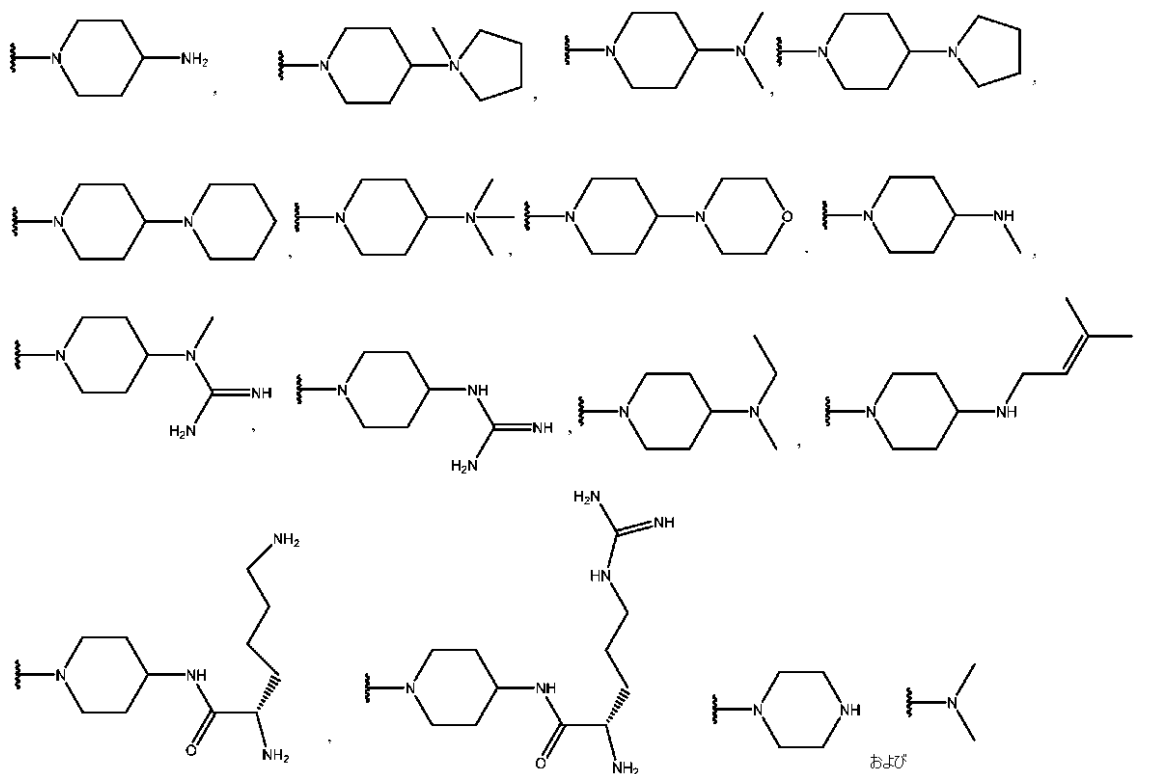
多様な実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号2、3、4もしくは6から選択される配列を含むか、配列番号2、3、4もしくは6から選択されるか、配列番号2、3、4もしくは6から選択されるターゲティング配列のうちの、少なくとも12連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号2、3、4もしくは6から選択されるターゲティング配列に対する、少なくとも90%の配列同一性を有する改変体であり、ここで、Xは、ウラシル(U)またはチミン(T)から選択される。

【0027】

30

多様な実施形態では、式(I)のR¹は、-N(CH₃)₂である。一部の実施形態では、R¹基のうちの50~90%は、-N(CH₃)₂である。一部の実施形態では、少なくとも1つのR¹は、

【化 8】



10

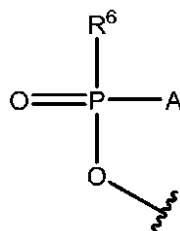
20

から選択される。

【 0 0 2 8 】

多様な実施形態では、Tは、式：

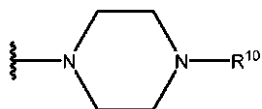
【化 9】



30

[式中、Aは、 $-N(CH_3)_2$ であり、 R^6 は、式：

【化 1 0】

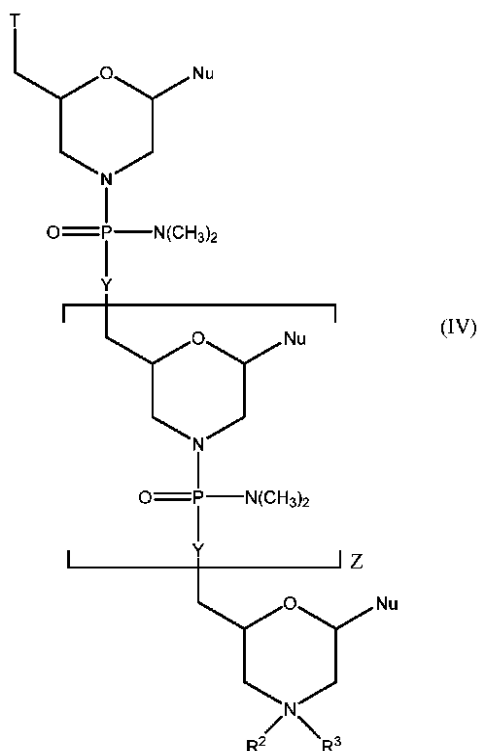
を有し、式中、 R^{10} は、 $-C(O)R^{11}OH$ である。

【 0 0 2 9 】

多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、式 (IV)：

40

【化 1 1】



10

20

の化合物または薬学的に許容されるその塩〔式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

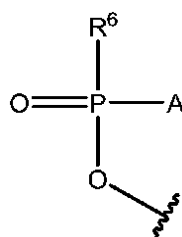
Z は、10～38の整数であり；

各 Y は、O および $-NR^4$ から独立に選択され、式中、各 R^4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アラルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ 、および G から独立に選択され、式中、 R^5 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、n は、1～5の整数であり；

T は、OH および式：

30

【化 1 2】



の部分から選択され、式中、

A は、 $-OH$ および $-N(R^7)_2R^8$ から選択され、式中、

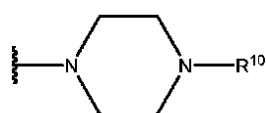
40

各 R^7 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、そして

R^6 は、OH、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ 、および式：

【化 1 3】



の部分から選択され、式中、

R^9 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

50

R^{10} は、G、 $-C(O)-R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

m は、1～5の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、 y は、3～10の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{12} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^2 は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)-R^{23}$ から選択され、 R^3 は、電子対、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される]である。

【0030】

多様な実施形態では、化合物(IV)のターゲティング配列は、配列番号2、3、4もしくは6から選択される配列を含むか、配列番号2、3、4もしくは6から選択されるか、配列番号2、3、4もしくは6から選択される配列のうちの、少なくとも12連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号2、3、4もしくは6から選択される配列に対する、少なくとも90%の配列同一性を有する改変体であり、ここで、Xは、ウラシル(U)またはチミン(T)から選択される。

【0031】

一部の実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号2、3、4もしくは6から選択される。

【0032】

多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、細胞取込みを増強するペプチド部分をさらに含む。

【0033】

多様な態様では、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列を含む、アンチセンスオリゴマーが提供される。一部の実施形態では、連続ヌクレオチドは、エクソン/イントロンスプライス接合部を含む。さらなる態様および実施形態では、スプライス接合部は、エクソン80/イントロン80の間のスプライス接合部を含む。多様な実施形態では、標的領域は、表1に明示された、配列番号1を含む。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号2、3、4もしくは6のうちの1つを含むか、配列番号2、3、4もしくは6から選択されるか、配列番号2、3、4もしくは6から選択される配列のうちの、少なくとも12連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号2、3、4もしくは6から選択される配列に対する、少なくとも90%の配列同一性を有する改変体であり、ここで、Xは、ウラシル(U)またはチミン(T)から選択される。多様な実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号2、3、4もしくは6を含む。

【0034】

また、生理学的に許容される担体と、本明細書で記載されるアンチセンスオリゴマーとを含む医薬組成物も含まれる。

【0035】

多様な態様は、それを必要とする被験体において、栄養障害型表皮水疱症(DEB)および関連障害を処置する方法であって、それを必要とする被験体に、有効量の、本明細書で記載されるアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含む方法に関する。複数の実施形態では、栄養障害型表皮水疱症および関連障害は、劣性型栄養障害型表皮水疱症(RDEB)、優性型栄養障害型表皮水疱症(DDEB)、Halllopeau-Siemens型栄養障害型表皮水疱症(RDEB-HS)、非重症型の劣性栄養障害型表皮水疱症

10

20

30

40

50

、反対 (invesa) 型の劣性栄養障害型表皮水疱症、求心型の劣性栄養障害型表皮水疱症、非 Hall o p e a u - S i e m e n s 型栄養障害型表皮水疱症 (非 H S R D E B) のいずれかを含めた栄養障害型表皮水疱症 (D E B) の少なくとも 1 つを含む。他の実施形態では、単純型表皮水疱症 (E B S) および接合型表皮水疱症 (J E B) を処置する方法を提供する。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、本明細書で記載される通りの修飾アンチセンスオリゴマーを含む。

【 0 0 3 6 】

機能的なヒト V I I 型コラーゲンの発現を増加させるための方法は、それを必要とする被験体にアンチセンスオリゴマーを投与するステップであって、アンチセンスオリゴマーは、ヒト V I I 型コラーゲン プレ m R N A 転写物中の標的領域に結合する、ステップと、アンチセンスオリゴマーを、ヒト V I I 型コラーゲン プレ m R N A 転写物中の標的領域に結合させるステップであって、機能的なヒト V I I 型コラーゲンの発現が増加する、ステップとを含む。エクソン 8 0 を除く プレ m R N A の成熟 m R N A への発現が増加する結果、成熟 m R N A からエクソン 8 0 が排除される。エクソン 8 0 を除くヒト V I I 型コラーゲン m R N A の発現が増加する。理論に束縛されずに述べると、得られる転写物がオープンリーディングフレームを保持する結果、m R N A 転写物が機能的なヒト V I I 型コラーゲンタンパク質へと翻訳されると考えられる。したがって、ゲノムエクソン 8 0 の発現は阻害されるが、機能的なヒト V I I 型コラーゲンの発現は、増加する。多様な実施形態では、標的は、ヒト V I I 型コラーゲン プレ m R N A 転写物のエクソン / イントロンスプライス接合部にわたる領域である。さらなる実施形態では、エクソン / イントロンスプライス接合部は、エクソン 8 0 / イントロン 8 0 のスプライス接合部を含む。さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、本明細書で記載される通りの修飾アンチセンスオリゴマーを含む。

【 0 0 3 7 】

機能的なヒト V I I 型コラーゲンタンパク質の発現を増加させる方法は、ヒト V I I 型コラーゲン プレ m R N A 転写物中の標的領域に結合するアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、機能的なヒト V I I 型コラーゲンの翻訳を増加させるステップとを含む。多様な実施形態では、エクソン 8 0 内に含有される変異によって、例えば、m R N A 転写物の翻訳の未成熟終結をもたらす終止 (停止) コドンがコードされてもよいし、またはエクソン 8 0 における変異によって、非機能的タンパク質をもたらす代替アミノ酸がコードされてもよい。そのような変異 (複数可) を有する プレ m R N A 転写物から翻訳される少なくとも一部のタンパク質は、非機能的である。多様な方法に従い、エクソン 8 0 は、得られる成熟 m R N A 転写物の少なくとも一部から排除される。結果として成熟 m R N A 転写物が翻訳されると、次いで機能的なヒト V I I 型コラーゲンタンパク質の増加をもたらされる。さらなる実施形態では、機能的なヒト V I I 型コラーゲンタンパク質の発現が増加する。一部の実施形態では、標的領域は、スプライス接合部を含む。ある特定の実施形態では、スプライス接合部は、エクソン 8 0 / イントロン 8 0 スプライス接合部を含む。さらなる態様および実施形態では、ヒト V I I 型コラーゲン m R N A の、機能的なヒト V I I 型コラーゲンタンパク質への翻訳が増加する。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、本明細書で記載される通りの修飾アンチセンスオリゴマーを含む。

【 0 0 3 8 】

多様な実施形態では、機能的なヒト V I I 型コラーゲンの発現は、少なくとも約 5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、または 1 0 0 % 増加する。

【 0 0 3 9 】

係留線維における機能的なヒト V I I 型コラーゲンの蓄積を増加させ、かつ / または係留線維の蓄積を増加させるための方法であって、本明細書で記載されるアンチセンスオリゴマーを、それを必要とする被験体に投与するステップであって、アンチセンスオリゴマ

ーは、ヒトV I I型コラーゲンプレm R N A転写物中の標的領域に結合するステップを含む、方法が提供される。複数の実施形態では、機能的なヒトV I I型コラーゲンの翻訳が増加する。さらなる実施形態では、1)被験体の係留線維における機能的なヒトV I I型コラーゲンタンパク質の蓄積が増加する、2)被験体における係留線維の蓄積が増加する、または3)係留線維における機能的なヒトV I I型コラーゲンタンパク質および被験体における係留線維の蓄積が増加する。複数の実施形態では、被験体は、栄養障害型表皮水疱症(D E B)またはその関連障害を有する被験体である。多様な実施形態では、標的領域は、ヒトV I I型コラーゲンプレm R N A転写物のエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる領域であり、さらなる実施形態では、スプライス接合部は、エクソン80/イントロン80スプライス接合部にわたる配列を含む。さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、本明細書で記載される通りの修飾アンチセンスオリゴマーを含む。

10

【0040】

栄養障害型表皮水疱症(D E B)およびその関連障害を処置するための医薬であって、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(i i)修飾糖部分、または(i i i)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である、少なくとも1つのサブユニットと、ヒトV I I型コラーゲンプレm R N A転写物のエクソン/イントロン接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列であって、連続ヌクレオチドが、エクソン/イントロン接合部を含み、前記エクソン/イントロン接合部が、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部を含む、ターゲティング配列とを含む、12~40サブユニットのアンチセンスオリゴマー化合物を含む医薬が提供される。さら

20

【0041】

栄養障害型表皮水疱症(D E B)および関連障害の進行を阻害する方法は、ヒトV I I型コラーゲンプレm R N A転写物中の標的領域に結合するアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、機能的なヒトV I I型コラーゲンの翻訳を増加させるステップとを含む。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、本明細書で記載される通りの修飾アンチセンスオリゴマーを含む。

【0042】

それを必要とする被験体において、栄養障害型表皮水疱症および関連障害を処置する方法は、多様な実施形態において、被験体に、有効量の本開示のアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、アンチセンスオリゴマーは、ヒトV I I型コラーゲンプレm R N A転写物中の標的領域に結合し、標的領域の、機能的なヒトV I I型コラーゲンタンパク質への転写は、増加する。さらなる態様は、栄養障害型表皮水疱症および関連障害を処置するための医薬の調製において使用するためのアンチセンスオリゴマーを含む。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、修飾アンチセンスオリゴマーを含む。

30

【0043】

ある特定の実施形態では、方法は、被験体における機能的なヒトV I I型コラーゲンの発現レベルを、対照に比べて少なくとも約10%増加させるステップを含む。一部の実施形態では、被験体における機能的なヒトV I I型コラーゲンのレベルは、少なくとも約1

40

、2、3、4、5、6、7、8、9、または10%増加する。

【0044】

以下の詳細な記載および添付の図面を参照すれば、本開示のこれらの態様および他の態様が明らかとなるであろう。本明細書で開示される全ての参考文献は、あたかも各々が個別に組み込まれたように、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目1)

12~40サブユニットのアンチセンスオリゴマー化合物であって、

(i)修飾ヌクレオシド間連結、(i i)修飾糖部分、または(i i i)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である、少なくとも1つのサブユニットと；

50

ヒトV I I型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロン接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列であって、該連続ヌクレオチドが、該エクソン/イントロン接合部を含み、該エクソン/イントロン接合部が、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部を含む、ターゲティング配列と

を含む、アンチセンスオリゴマー化合物。

(項目2)

前記修飾ヌクレオシド間連結が、リン原子を、(1,4-ピペラジン)-1-イル部分、置換(1,4-ピペラジン)-1-イル部分、4-アミノピペリジン-1-イル部分、または置換4-アミノピペリジン-1-イル部分に共有結合した、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、またはホスホロジアミデートから選択される、項目1に記載のアンチセンスオリゴマー化合物。

10

(項目3)

前記修飾糖部分が、ペプチド核酸(PNA)サブユニット、ロックト核酸(LNA)サブユニット、2'-O,4'-C-エチレン架橋核酸(ENA)サブユニット、トリシクロDNA(tc-DNA)サブユニット、2'-O-メチルサブユニット、2'-O-メトキシエチルサブユニット、2'-フルオロサブユニット、2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]サブユニット、またはモルホリノサブユニットのうちの少なくとも1つを含む、項目1に記載のアンチセンスオリゴマー化合物。

20

(項目4)

前記アンチセンスオリゴマー化合物の3'末端または5'末端にコンジュゲートしたアルギニンに富む細胞透過性ペプチドをさらに含む、項目1に記載のアンチセンスオリゴマー化合物。

(項目5)

前記標的領域が、配列番号1を含む、項目1に記載のアンチセンスオリゴマー化合物。

(項目6)

前記ターゲティング配列が、配列番号2、3、4もしくは6から選択される、項目1に記載のアンチセンスオリゴマー化合物。

(項目7)

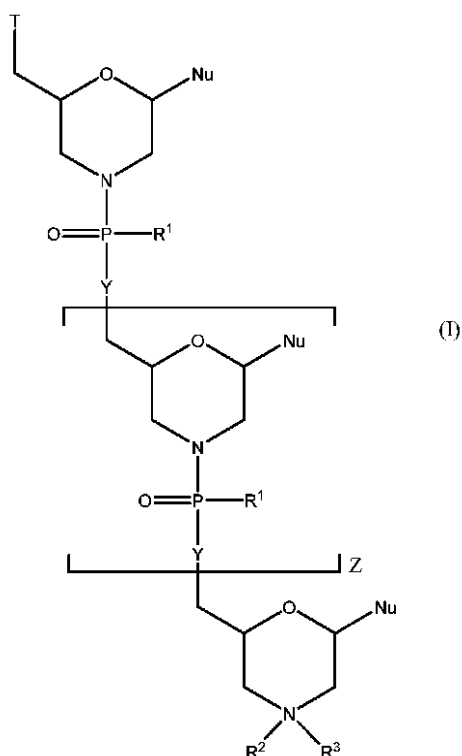
前記サブユニットの各々のヌクレオ塩基が独立に、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、シトシン、イノシン、ヒポキサンチン、2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、C5-プロピニル修飾ピリミジン、または10-(9-(アミノエトキシ)フェノキサジニル)である、項目1から3のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

30

(項目8)

式(I)の化合物：

【化 6 1】



10

20

または薬学的に許容されるその塩〔式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり、

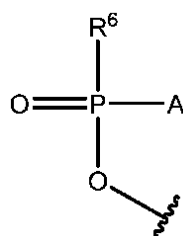
Z は、10～38の整数であり、

各 Y は、O および $-NR^4$ から独立に選択され、各 R^4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アラルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ 、および G から独立に選択され、 R^5 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、n は、1～5の整数であり、

30

T は、OH および式：

【化 6 2】



40

の部分から選択され、

式中、

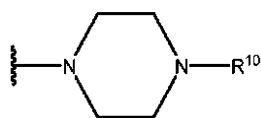
A は、 $-OH$ 、 $-N(R^7)_2R^8$ 、および R^1 から選択され、

各 R^7 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、

R^6 は、OH、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ 、および式：

【化 6 3】



の部分から選択され、

式中、

R^9 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

R^{10} は、G、 $-C(O)-R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、

10

m は、1 ~ 5 の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、 y は、3 ~ 10 の整数であり、

y 個のアルキル基はそれぞれ、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^{12} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

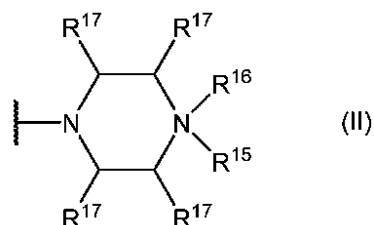
R^1 の各例は、

$-N(R^{13})_2R^{14}$ [各 R^{13} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、 R^{14} は、電子対および H から選択される]、

20

式 (II) :

【化 6 4】



(II)

30

の部分

[式中、

R^{15} は、H、G、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_qNR^{18}C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{18}C(=NH)NH_2$ から選択され、

R^{18} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

q は、1 ~ 5 の整数であり、

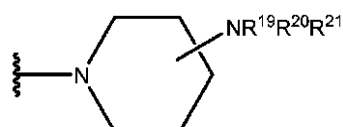
R^{16} は、電子対および H から選択され、

各 R^{17} は、H およびメチルから独立に選択される]、および

式 (III) :

40

【化 6 5】



(III)

の部分

[式中、

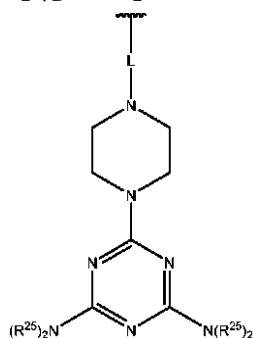
R^{19} は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_rNR^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)N$

50

H_2 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{NR}^{22}\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、
 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 、および G から選択され、
 R^{22} は、H および $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルから選択され、
 r は、1 ~ 5 の整数であり、
 R^{20} は、H および $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルから選択され、
 R^{21} は、電子対および H から選択される]
 から独立に選択され、
 R^2 は、H、G、アシル、トリチル、4 - メトキシトリチル、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル、 $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{23}$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{NR}^{24}\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{NR}^{24}\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、および式：

10

【化 6 6】



20

の部分から選択され、

式中、

R^{23} は、式 $-(\text{O}-\text{アルキル})_v-\text{OH}$ を有し、 v は、3 ~ 10 の整数であり、 v 個のアルキル基はそれぞれ、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_6$ アルキルから独立に選択され、

R^{24} は、H および $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルから選択され、

s は、1 ~ 5 の整数であり、

L は、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_6\text{C}(\text{O})-$ および $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{S}_2(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})-$ から選択され、

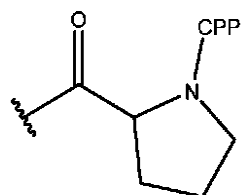
30

各 R^{25} は、式 $-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{26})_2$ を有し、各 R^{26} は、式 $-(\text{CH}_2)_6\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ を有し、

R^3 は、電子対、H、および $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルから選択され、

G は、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{NH}-\text{CPP}$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NH}-\text{CPP}$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_5\text{NH}-\text{CPP}$ 、および $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{NH}-\text{CPP}$ から選択される細胞透過性ペプチド(「CPP」)およびリンカー部分であるか、または G は、式：

【化 6 7】



40

を有し、式中、該 CPP は、G の最大で 1 つの例が存在するという条件で、該リンカー部分に、該 CPP のカルボキシ末端において、アミド結合により結合しており、
 前記ターゲティング配列は、ヒト V E I 型コラーゲンプレ mRNA のエクソン / イントロン接合部にわたる標的領域内の、12 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的であり、該連続ヌクレオチドは、該エクソン / イントロン接合部を含み、該エクソン / イント

50

ロン接合部は、エクソン 80 / イントロン 80 のスプライス接合部を含む]。

(項目 9)

各 Nu が独立に、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、シトシン、イノシン、ヒポキサンチン、2, 6 - ジアミノプリン、5 - メチルシトシン、C5 - プロピニル修飾ピリミジン、または 10 - (9 - (アミノエトキシ)フェノキサジニル)である、項目 8 に記載の化合物。

(項目 10)

前記標的領域が、配列番号 1 を含む、項目 8 に記載の化合物。

(項目 11)

前記ターゲティング配列が、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される配列を含むか、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択されるか、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択されるターゲティング配列のうちの、少なくとも 12 連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択されるターゲティング配列に対する、少なくとも 90 % の配列同一性を有する改変体であり、配列中、X は、ウラシル (U) またはチミン (T) から選択され、I はイノシンである、項目 8 に記載の化合物。

(項目 12)

前記ターゲティング配列が、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される、項目 8 に記載の化合物。

(項目 13)

Y が、O であり、R² が、H または G から選択され、R³ が、電子対または H から選択される、項目 8 に記載の化合物。

(項目 14)

R² が、G であり、前記 CPP が、配列番号 9 ~ 24 から選択される配列を有する、項目 13 に記載の化合物。

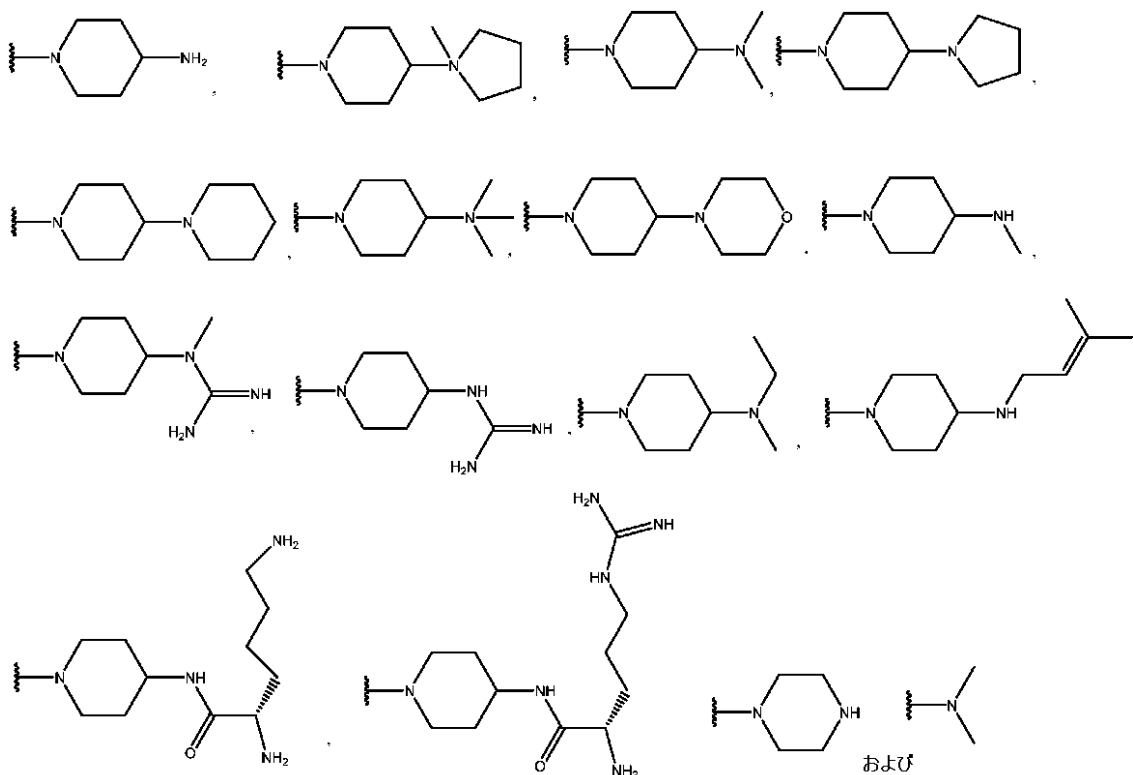
(項目 15)

各 R¹ が、-N(CH₃)₂ である、項目 8 に記載の化合物。

(項目 16)

少なくとも 1 つの R¹ が、

【化 68】



および

10

20

30

40

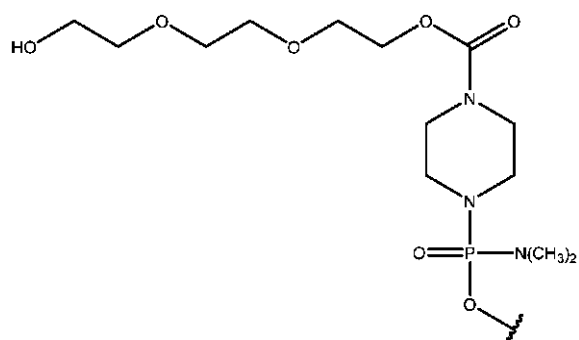
50

から選択される、項目 8 に記載の化合物。

(項目 1 7)

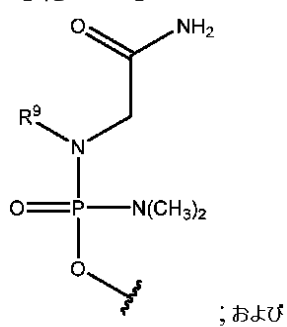
各 Y が、O であり、T が、

【化 6 9】

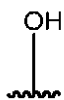


10

【化 7 0】



20

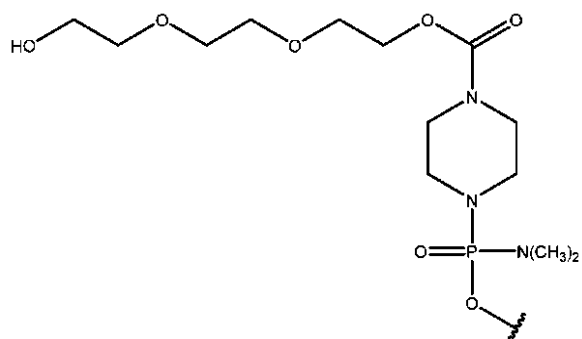


から選択される、項目 8 に記載の化合物。

(項目 1 8)

T が、式：

【化 7 1】



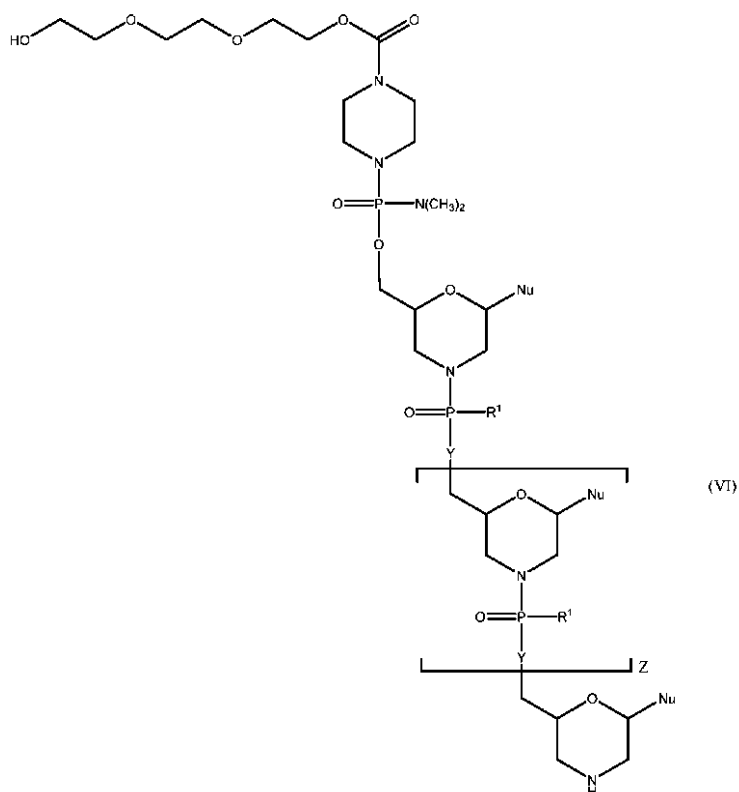
40

を有する、項目 8 に記載の化合物。

(項目 1 9)

式 (V I)：

【化 7 2】



の化合物または薬学的に許容されるその塩であって、式中、

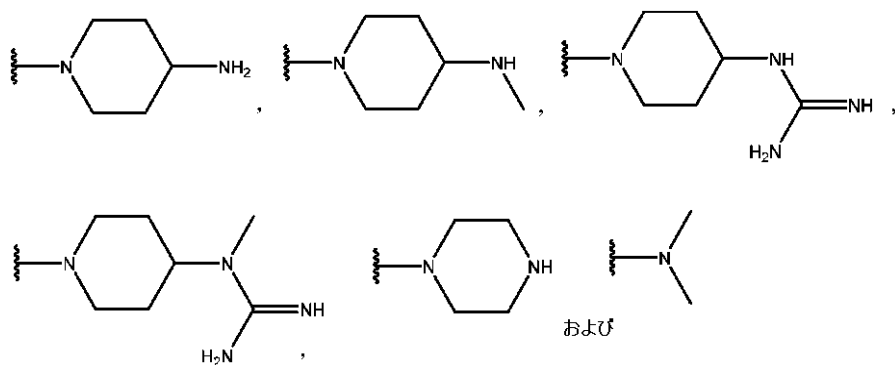
各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

Z は、15 ~ 25 の整数であり；

各 Y は、0 であり；

各 R^1 は、

【化 7 3】



から独立に選択され、

ここで、前記ターゲティング配列は、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される配列を含むか、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択されるか、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される配列のうちの、少なくとも 1 2 連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される配列に対する、少なくとも 90 % の配列同一性を有する改変体であり、配列中、X は、ウラシル (U) またはチミン (T) から選択され、I はイノシンである、

化合物または薬学的に許容されるその塩。

(項目 2 0)

前記ターゲティング配列が、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される、項目 19 に記載の化合物。

(項目 21)

項目 1 から 7 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー化合物または項目 8 から 20 のいずれか一項に記載の化合物を含む医薬組成物。

(項目 22)

栄養障害型表皮水疱症および関連障害の処置を必要とする被験体において栄養障害型表皮水疱症および関連障害を処置する方法であって、

該被験体に、有効量の、項目 1 から 7 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー化合物または項目 8 から 20 のいずれか一項に記載の化合物を投与するステップを含む、方法。

10

(項目 23)

表皮水疱症および関連障害が、劣性型栄養障害型表皮水疱症、優性型栄養障害型表皮水疱症、Halloupeau-Siemens 型栄養障害型表皮水疱症、非重症型の劣性栄養障害型表皮水疱症、反対型の劣性栄養障害型表皮水疱症、求心型の劣性栄養障害型表皮水疱症、非Halloupeau-Siemens 型栄養障害型表皮水疱症を含む、項目 22 に記載の方法。

(項目 24)

ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロン接合部にわたる標的領域と特異的にハイブリダイズする12~40サブユニットの配列を含み、該エクソン/イントロン接合部は、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部を含む、アンチセンスオリゴマー化合物。

20

(項目 25)

前記配列が、前記標的領域内の少なくとも12連続ヌクレオチドに相補的なターゲティング配列を含み、該ターゲティング配列は、配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列を含むか、配列番号2、3、4、もしくは6から選択されるか、配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列のうちの少なくとも12連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列に対する、少なくとも90%の配列同一性を有する改変体であり、配列中、Xが、ウラシル(U)またはチミン(T)から選択される、項目24に記載のアンチセンスオリゴマー化合物。

30

(項目 26)

前記配列が、前記標的領域内の少なくとも12連続ヌクレオチドに相補的なターゲティング配列を含み、該ターゲティング配列は、配列番号2、3、4、または6から選択される、項目24に記載のアンチセンスオリゴマー化合物。

(項目 27)

前記配列が、前記標的領域に対する、少なくとも90%の配列相補性を含み、前記ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体が、配列番号2、3、4、または6から選択される、項目24に記載のアンチセンスオリゴマー化合物。

(項目 28)

機能的なヒトVII型コラーゲン発現の増加を必要とする被験体において、機能的なヒトVII型コラーゲン発現を増加させるための方法であって、

ヒトVII型コラーゲンプレmRNA転写物中の標的領域に対するアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、

該アンチセンスオリゴマーを、該ヒトVII型コラーゲンプレmRNA転写物中の該標的領域に結合させるステップと、
を含み、機能的なヒトVII型コラーゲンの発現が増加する、方法。

40

(項目 29)

前記ヒトVII型コラーゲンプレmRNA転写物中の前記標的領域が、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロン接合部にわたっており、該接合部は、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部を含む、項目28に記載の方法。

50

(項目 3 0)

前記標的領域が配列番号 1 を含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記アンチセンスオリゴマーが、(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(i i) 修飾糖部分、または(i i i) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である、少なくとも 1 つのサブユニットと、

前記標的領域内の、1 2 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列であって、該連続ヌクレオチドが、前記エクソン/イントロン接合部を含む、ターゲティング配列と

を含む、項目 2 8 に記載の方法。

10

(項目 3 2)

前記修飾ヌクレオシド間連結が、リン原子を、(1 , 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、置換(1 , 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分、または置換 4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分にコンジュゲートさせた、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、またはホスホロジアミデートヌクレオシド間連結から選択される、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記修飾糖部分が、ペプチド核酸(PNA)サブユニット、ロックト核酸(LNA)サブユニット、2' O , 4' C - エチレン架橋核酸(ENA)サブユニット、トリシクロ DNA (tc - DNA)サブユニット、2' O - メチルサブユニット、2' O - メトキシエチルサブユニット、2' - フルオロサブユニット、2' - O - [2 - (N - メチルカルバモイル) エチル] サブユニット、またはモルホリノサブユニットのうちの少なくとも 1 つを含む、項目 3 1 に記載の方法。

20

(項目 3 4)

前記ターゲティング配列が、配列番号 2、3、4、もしくは 6 から選択される配列を含むか、配列番号 2、3、4、もしくは 6 から選択されるか、配列番号 2、3、4、もしくは 6 から選択される配列のうちの少なくとも 1 2 連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号 2、3、4、もしくは 6 から選択される配列に対する、少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する改変体であり、配列中、X が、ウラシル(U)またはチミン(T)から

30

(項目 3 5)

前記ターゲティング配列が、配列番号 2、3、4、または 6 から選択される、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記アンチセンスオリゴマーによって、機能的なヒト V I I 型コラーゲンの前記発現が約 5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、または 1 0 0 % 増加する、項目 2 8 に記載の方法。

40

(項目 3 7)

機能的なヒト V I I 型コラーゲンの発現を増加させるための方法であって、

ヒト V I I 型コラーゲン m R N A 転写物中の標的領域に結合するアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、機能的なヒト V I I 型コラーゲンの翻訳を増加させるステップとを含む方法。

(項目 3 8)

機能的なヒト V I I 型コラーゲン発現が、約 5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、または 1 0 0 % 増加する、項目 3 7 に記載の

50

方法。

(項目 3 9)

前記アンチセンスオリゴマーが、ターゲティング配列を含み、該ターゲティング配列が、配列番号 2、3、4、もしくは 6 から選択される配列を含むか、配列番号 2、3、4、もしくは 6 から選択されるか、配列番号 2、3、4、もしくは 6 から選択される配列のうちの少なくとも 1 2 連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号 2、3、4、もしくは 6 から選択される配列に対する、少なくとも 90 % の配列同一性を有する改変体であり、配列中、X が、ウラシル (U) またはチミン (T) から選択され、I がイノシンである、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記アンチセンスオリゴマーが、配列番号 2、3、4、または 6 から選択されるターゲティング配列を含む、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 1)

係留線維における機能的なヒト V I I 型コラーゲンタンパク質の蓄積を増加させる、係留線維の蓄積を増加させる、または係留線維における機能的なヒト V I I 型コラーゲンタンパク質の蓄積を増加させ、かつ係留線維の蓄積を増加させるための方法であって、

ヒト V I I 型コラーゲンプレ m R N A 転写物中の標的領域に結合するアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、機能的なヒト V I I 型コラーゲンの翻訳を増加させるステップとを含む方法。

(項目 4 2)

栄養障害型表皮水疱症および関連障害を処置するための医薬であって、

(i) 修飾ヌクレオシド間連結、(i i) 修飾糖部分、または (i i i) 前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である、少なくとも 1 つのサブユニットと；

ヒト V I I 型コラーゲンプレ m R N A 転写物のエクソン / イントロン接合部にわたる標的領域内の、1 2 またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列であって、該連続ヌクレオチドが、該エクソン / イントロン接合部を含み、該エクソン / イントロン接合部が、エクソン 8 0 / イントロン 8 0 のスプライス接合部を含むターゲティング配列と

を含む、1 2 ~ 4 0 サブユニットのアンチセンスオリゴマー化合物を含む医薬。

(項目 4 3)

栄養障害型表皮水疱症および関連障害の進行を阻害するための方法であって、

ヒト V I I 型コラーゲンプレ m R N A 転写物中の標的領域に結合するアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、機能的なヒト V I I 型コラーゲンの翻訳を増加させるステップとを含む方法。

(項目 4 4)

栄養障害型表皮水疱症もしくはその関連障害を有する被験体において、係留線維における機能的なヒト V I I 型コラーゲンの蓄積を増加させる、栄養障害型表皮水疱症もしくはその関連障害を有する被験体において係留線維の蓄積を増加させる、または栄養障害型表皮水疱症もしくはその関連障害を有する被験体において、係留線維における機能的なヒト V I I 型コラーゲンの蓄積、および係留線維の蓄積を増加させるための方法であって、

ヒト V I I 型コラーゲンプレ m R N A 転写物中の標的領域に結合する、有効量のアンチセンスオリゴマーを投与するステップと、

機能的なヒト V I I 型コラーゲンの翻訳を増加させるステップと
を含み、1) 該被験体における、係留線維における機能的なヒト V I I 型コラーゲンタンパク質の蓄積が増加する、2) 該被験体における係留線維の蓄積が増加する、または 3) 該被験体における、係留線維における機能的なヒト V I I 型コラーゲンタンパク質および係留線維の蓄積が増加する、方法。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図 1 A】図 1 A は、リンカーを付加する、5' 末端における修飾オリゴマーを例示する

10

20

30

40

50

。

【図 1 B】図 1 B は、細胞透過性ペプチド (C P P) にコンジュゲートしたアンチセンスオリゴマーを例示する。

【図 1 C】図 1 C は、細胞透過性ペプチド (C P P) にコンジュゲートしたアンチセンスオリゴマーを例示する。

【図 1 D - G】図 1 D、1 E、1 F、および 1 G は、D ~ G と称する、例示的なモルホリノオリゴマーの、反復サブユニットセグメントを例示する。

【図 2 A】図 2 A は、トリチルピペラジンフェニルカルバメートの調製を例示する。

【図 2 B】図 2 B は、樹脂 / 試薬混合物の調製を例示する。

【図 3】図 3 は、第 1 シリーズの、ヒト成体皮膚線維芽細胞 (H D F a) の、ヒト V I I 型コラーゲンアンチセンスオリゴマー活性を例示する。

【図 4】図 4 は、第 1 シリーズの、ヒト成体表皮ケラチノサイト (H E K a) の、ヒト V I I 型コラーゲンアンチセンスオリゴマー活性を例示する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 6 】

詳細な説明

I . 定義

そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書で使用される、全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書で記載される方法および材料と同様または同等な、任意の方法および材料を、本開示の主題の実施または試験において使用しうるが、好ましい方法および材料について記載する。本開示の目的で、下記では、以下の用語について規定する。

【 0 0 4 7 】

本明細書では、冠詞の「 1 つの (a) 」および「 1 つの (a n) 」を、冠詞の文法的対象物の 1 つまたは 1 つを超える対象物 (すなわち、少なくとも 1 つの対象物) を指すのに使用する。例を目的として述べると、「ある要素」とは、1 つの要素または 1 つを超える要素を意味する。

【 0 0 4 8 】

用語「約」は、基準の数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量、または長さに対して、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または 1 % ほど変動する、数量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量、または長さを意味する。

【 0 0 4 9 】

用語「配列」および「コード配列」は、遺伝子のポリペプチド産物のコードに寄与する、任意の核酸配列を意味する。これに対して、「非コード配列」という用語は、遺伝子のポリペプチド産物のコードに直接寄与しない、任意の核酸配列を指す。

【 0 0 5 0 】

本開示を通して、文脈によりそうでないことが要請されない限り、「 ~ を含む」、「 ~ を含む」、および「 ~ を含むこと」という語は、言明されるステップもしくはは要素またはステップもしくはは要素の群の包含を含意するが、他の任意のステップもしくはは要素またはステップもしくはは要素の群の除外は含意しないことが理解されるであろう。

【 0 0 5 1 】

用語「 ~ からなること」は、「 ~ からなること」という語句に後続するあらゆる語句を含み、かつ、これに限定されることを意味する。したがって、「 ~ からなること」という語句は、列挙される要素が要請されるかまたは必須であり、他の要素は存在しえないことを指し示す。用語「 ~ から本質的になること」は、この語句の後に列挙される任意の要素を含み、かつ、列挙される要素について、本開示で指定される活性または作用に干渉または寄与しない、他の要素に限定されることを意味する。したがって、「 ~ から本質的になること」という語句は、列挙される要素が要請されるかまたは必須であるが、他の要素は任意選択であり、それらが列挙される要素の活性または作用に、実質的に影響を及ぼすの

10

20

30

40

50

かどうかに応じて、存在してもよく、存在しなくてもよいことを示す。

【0052】

「～を投与すること」または「～を投与する」という用語は、本開示のアンチセンスオリゴマーの、被験体への、局所投与または全身投与による送達を含む。投与は、局所投与（眼投与、ならびに膣送達および直腸送達を含む、粘膜への投与を含む）、例えば、噴霧器による投与を含む、粉末またはエアゾールによる吸入または送気による、肺投与、気管内投与、鼻腔内投与、表皮投与および経皮投与、経口投与、または非経口投与でありうる。非経口投与は、静脈内注射もしくは静脈内注入、動脈内注射もしくは動脈内注入、皮下注射もしくは皮下注入、腹腔内注射もしくは腹腔内注入、または筋内注射もしくは筋内注入；あるいは頭蓋内投与、例えば、髄腔内投与または脳室内投与を含む。

10

【0053】

「細胞を接触させること」、「導入すること」、または「送達すること」という用語は、本開示のオリゴマーの、細胞への、当技術分野で慣例的な方法、例えば、トランスフェクション（例えば、リポソーム、リン酸カルシウム、ポリエチレンジンイミン）、電気穿孔（例えば、ヌクレオフェクション）、マイクロインジェクション）による送達を含む。

【0054】

「アルキル」という用語は、直鎖状（すなわち、非分枝状または非環式）、分枝状、環式、または多環式非芳香族の炭化水素基であって、任意選択で、1または複数の官能基により置換された炭化水素基を指す。そうでないことが指定されない限りにおいて、「アルキル」基は、1～8個の炭素原子を含有し、好ましくは、1～6個の炭素原子を含有する。C₁～C₆アルキルとは、C₁アルキル基、C₂アルキル基、C₃アルキル基、C₄アルキル基、C₅アルキル基、およびC₆アルキル基を含むことを意図する。低級アルキルとは、1～6個の炭素原子を含有するアルキル基を指す。アルキルの例は、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、シクロブチル、ペンチル、イソペンチル、tert-ペンチル、シクロペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、シクロヘキシルなどを含むがこれらに限定されない。アルキルは、置換アルキルの場合もあり、非置換アルキルの場合もある。例示的な置換アルキル基は、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、2-フルオロエチル、3-フルオロプロピル、ヒドロキシメチル、2-ヒドロキシエチル、3-ヒドロキシプロピル、ベンジル、置換ベンジル、フェネチル、置換フェネチルなどを含むがこれらに限定されない。

20

30

【0055】

「アルコキシ」という用語は、アルキルのサブセットであって、上記で規定した、表示の数の炭素を伴うアルキル基が、酸素架橋を介して結合しているサブセットを指す。例えば、「アルコキシ」とは、直鎖状立体配置、分枝状立体配置、環式立体配置である、1～8個の炭素原子を含有する-O-アルキル基を指す。「アルコキシ」の例は、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、i-プロポキシ、t-ブトキシ、n-ブトキシ、s-ペントキシなどを含むがこれらに限定されない。

【0056】

単独で、または「アラルキル」、「アラルコキシ」、または「アリアルオキシアルキル」における通り、より大型の部分の一部として使用される「アリアル」という用語は、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、1-アントラシル、および2-アントラシルなど、6～14個の環原子を有する芳香環基を指す。「アリアル」環は、1または複数の置換基を含有しうる。「アリアル」という用語は、「アリアル環」という用語と互換的に使用することができる。「アリアル」はまた、芳香環を1または複数の環へと縮合させた、縮合多環式芳香環系も含む。有用なアリアル環基の非限定的な例は、フェニル、ヒドロキシフェニル、ハロフェニル、アルコキシフェニル、ジアルコキシフェニル、トリアルコキシフェニル、アルキレンジオキシフェニル、ナフチル、フェナントリル、アントリル、フェナントロなどのほか、1-ナフチル、2-ナフチル、1-アントラシル、および2-アントラシルを含む。本明細書で使用される「アリアル」という用語の範囲内にはまた、芳香

40

50

環を1または複数の非芳香環へと縮合させた基であって、ラジカルまたは結合点が芳香環上にある、インダニル、フェナントリジニル、またはテトラヒドロナフチルなどにおける基も含まれる。

【0057】

「アシル」という用語は、 $C(O)R$ 基（式中、Rは、上記で規定したH、アルキル、またはアリールを意味する）を指す。アシル基の例は、ホルミル、アセチル、ベンゾイル、フェニルアセチル、および類似の基を含む。

【0058】

「同族化合物」という用語は、同じ化学基の逐次的付加により規則的に異なる化合物を指す。例えば、化合物の同族化合物は、1または複数の $-CH_2-$ 基、アミノ酸残基、ヌクレオチド、またはヌクレオチド類似体の付加により異なりうる。

10

【0059】

「細胞透過性ペプチド」(CPP)または「細胞取込みを増強するペプチド部分」という用語は、互換的に使用され、「輸送ペプチド」、「担体ペプチド」、または「ペプチド導入ドメイン」ともまた呼ばれる、カチオン性細胞透過性ペプチドを指す。例えば、ペプチドコンジュゲートホスホルアミデートまたはホスホロジアミデートモルホリノ(PPMO)は、本明細書で記載される、細胞取込みを増強する細胞透過性ペプチドまたは細胞透過性ペプチド部分を含みうる。多様な実施形態では、ペプチドは、アンチセンスオリゴマーに共有結合させることができる。さらなる実施形態では、ペプチドは、アンチセンスオリゴマーの3'末端または5'末端にコンジュゲートさせることができる。さらなる実施形態では、ペプチドは、3'末端のモルホリン環のピペラジニル部分または窒素原子へと連結することができる。一部の実施形態では、細胞取込みを増強する、細胞透過性ペプチドまたは細胞透過性ペプチド部分は、本明細書で記載される、アルギニンに富むペプチドを含みうる。

20

【0060】

本明細書で示されるペプチドは、全身投与されると、所与の細胞培養物集団の細胞のうちの約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%、または少なくともほぼこれらの比率の細胞内の細胞透過を誘導し、*in vivo*において、複数の組織内の高分子のトランスロケーションを可能とする能力を有する。一部の実施形態では、CPPは、式 $-(C(O)CH(R')NH)_m-$ [式中、R'は、天然に存在するアミノ酸、またはその1炭素同族化合物もしくは2炭素同族化合物の側鎖であり、R'は、水素またはアシルから選択され、mは、最大で50の整数である]を有する。当技術分野では、さらなるCPPも周知であり、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国出願公開第20100016215号において開示されている。他の実施形態では、mは、1~50から選択される整数であり、ここで、mが1である場合、部分は、単一のアミノ酸またはその誘導体である。

30

【0061】

「アミノ酸」という用語は、一級アミノ基、カルボン酸基、側鎖、および水素原子が結合している炭素原子を含む化合物を指す。例えば、「アミノ酸」という用語は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン、グルタミン、リシン、アスパラギン酸、ヒスチジン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、システイン、グルタミン酸、セリン、チロシン、ピロリシン、セレノシステイン、およびアルギニンを含むがこれらに限定されない。加えて、本明細書で使用される「アミノ酸」はまた、エステル、およびアミド、および塩など、アミノ酸の誘導体のほか、活性形態へと代謝されると薬理学的特性を有する誘導体を含む、他の誘導体も含む。したがって、「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸を含むことが理解される。

40

【0062】

「電子対」という用語は、他の原子と結合しないかまたは共有されていない、電子の原子価対を指す。

50

【 0 0 6 3 】

「相同性」という用語は、同一なアミノ酸、または保存的置換を構成するアミノ酸の百分率数を指す。相同性は、GAPなどの配列比較プログラムを使用して決定することができる（Deverauxら、1984年、Nucleic Acids Research、12巻、387～395頁）。このようにして、本明細書で引例される配列と、類似の長さまたは実質的に異なる長さの配列を、アラインメントへのギャップの挿入により比較することができ、このようなギャップを、例えば、GAPにより使用される比較アルゴリズムにより決定する。

【 0 0 6 4 】

「単離された」という用語は、その生来の状態では通常それに随伴する成分を、実質的または本質的に含まない材料を指す。例えば、本明細書で使用される「単離オリゴヌクレオチド」または「単離オリゴマー」とは、天然に存在する状態ではそれを挟む配列から精製されるかまたは取り出されたオリゴマー、例えば、ゲノム内の断片に隣接する配列から取り出されたDNA断片を指す場合がある。細胞に関する場合の、「～を単離すること」という用語は、細胞（例えば、線維芽細胞、リンパ芽球）の、供給源となる被験体（例えば、オリゴヌクレオチドリピート病を伴う被験体）からの精製を指す。mRNAまたはタンパク質の文脈では、「～を単離すること」とは、mRNAまたはタンパク質の、供給源、例えば、細胞からの回収を指す。

【 0 0 6 5 】

「～をモジュレートする」という用語は、1または複数の定量化可能なパラメータを、任意選択で、規定された量および/または統計学的に有意な量で「増加」または「減少」させることを含む。「～を増加させる」もしくは「～を増加させること」、「～を増強する」もしくは「～を増強すること」、または「～を刺激する」もしくは「～を刺激すること」とは一般に、1または複数のアンチセンスオリゴマー化合物または組成物が、細胞または被験体において、アンチセンスオリゴマー化合物を伴わずに引き起こされる応答、または対照化合物により引き起こされる応答と比べて、より大きな生理学的応答（すなわち、下流における効果）をもたらすかまたは引き起こす能力を指す。関係のある生理学的応答または細胞応答（in vivoまたはin vitro）は、当業者には明らかであり、COL7A1ヒトVII型コラーゲンコードmRNAにおけるエクソン80の包含の減少、またはヒトVII型コラーゲンmRNA転写物におけるエクソン80の排除、および/または皮膚細胞、もしくは例えばそれを必要とする被験体の組織における機能的なヒトVII型コラーゲタンパク質の発現の増加を含みうる。「減少された」または「低減された」量とは、典型的には、「統計学的に有意な」量であり、アンチセンスオリゴマー化合物の投与の非存在下で、それを必要とする被験体によりもたらされる量（例えば、特定の被験体またはコホートの、「生来」または「天然」の発現率）、または対照化合物によりもたらされる量の、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50分の1またはこれ未満（例えば、100、500、1000分の1）であって、全ての整数およびそれらの間にあり1より大きい小数（decimal point）（例えば、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9）を含む分数の減少を含みうる。「～を低減する」または「～を阻害する」という用語は一般に、1または複数のアンチセンスオリゴマー化合物または組成物が、本明細書で記載される疾患または状態の症状など、関与性の生理学的応答または細胞応答であって、診断技術分野で慣例的な技法に従い、測定される応答「を減少させる」能力に関する場合がある。「増加した」または「増強された」量とは通常、「統計学的に有意な」量であり、アンチセンスオリゴマー化合物の投与の非存在下で、それを必要とする被験体によりもたらされる量（例えば、特定の被験体またはコホートの「生来の」または「天然の」発現率）または対照化合物によりもたらされる量に対して、全ての整数およびその間にあって1より大きい小数（例えば、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9）を含めて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50倍またはそれを超える（例えば、100、500、1000倍）増加を含

10

20

30

40

50

みうる。「～を増強する」という用語は一般に、1または複数のアンチセンスオリゴマー化合物または組成物が、本明細書で記載される疾患または状態の症状などの関係のある生理学的応答または細胞応答を、診断技術分野における慣例的な技法に従って測定したとき「増加させる」能力に関しうる。

【0066】

関係のある生理学的応答または細胞応答 (*in vivo* または *in vitro*) は、当業者には明らかであり、劣性型栄養障害型表皮水疱症 (RDEB)、優性型栄養障害型表皮水疱症 (DDEB)、Halllopeau-Siemens 型栄養障害型表皮水疱症 (RDEB-HS)、非重症型の劣性栄養障害型表皮水疱症、反対型の劣性栄養障害型表皮水疱症、求心型の劣性栄養障害型表皮水疱症、非Halllopeau-Siemens 型栄養障害型表皮水疱症 (非HS RDEB) のいずれかを含めた栄養障害型表皮水疱症 (DEB) など、表皮水疱症および関連障害の症状または病変の軽減を含みうる。他の実施形態では、例えば、症状または病変の軽減が、係留線維における機能的なヒトVII型コラーゲンの蓄積を増加させ、かつ/または1つもしくは複数の組織における係留線維の蓄積を増加させる、機能的なヒトVII型コラーゲンタンパク質の発現の増加に伴伴するか、またはこれに関連しうる、単純型表皮水疱症 (EBS) および接合型表皮水疱症 (JB) を処置する方法が提供される。応答の「増加」は、アンチセンスオリゴマー化合物の投与の非存在下で、それを必要とする被験体によりもたらされる応答 (例えば、特定の被験体またはコホートの「生来の」または「天然の」発現率) または対照化合物によりもたらされる応答に比べて「統計学的に有意」であり得、間にある全ての整数を含めて、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の増加を含みうる。

【0067】

ヒトVII型コラーゲンタンパク質に関しての「機能的」という用語は、例えば、野生型VII型コラーゲンタンパク質の機能性、野生型または正常VII型コラーゲンタンパク質のほぼ完全または完全な機能性の、一部または実質的部分を有するVII型コラーゲンタンパク質を包含する。機能的なタンパク質は、得られるmRNA転写物がオープンリーディングフレームを保持するように1つまたは複数のエクソンが除去または切除されているmRNA転写物に由来しうる。機能的なタンパク質は、例えば、エクソン80が排除されているRNA転写物に由来しうる。野生型mRNAより少ないエクソンを有するmRNA転写物から翻訳されたタンパク質は、野生型mRNA転写物から転写されたタンパク質より少ないアミノ酸残基を含む転写タンパク質をもたらしうる。野生型タンパク質より少ないアミノ酸残基で構成された機能的なタンパク質は、野生型タンパク質と同じまたは同様の活性/機能性を有しうる。例えば、機能的なVII型コラーゲンタンパク質は、野生型または正常VII型コラーゲンタンパク質の機能性の約5%～約100%、約5%～約90%、約5%～約80%、約5%～約70%、約5%～約60%、約5%～約50%、約5%～約30%、約5%～約20%、約5%～約10%、約10%～約100%、約10%～約90%、約10%～約80%、約10%～約70%、約10%～約60%、約10%～約50%、約10%～約40%、約10%～約30%、約10%～約20%、約30%～約100%、約30%～約90%、約30%～約80%、約30%～約70%、約30%～約60%、約30%～約50%、約40%～約100%、約40%～約90%、約40%～約80%、約40%～約70%、約40%～約60%、約40%～約50%、約50%～約100%、約50%～約90%、約50%～約80%、約50%～約70%、約50%～約60%、約60%～約100%、約60%～約90%、約60%～約80%、約60%～約70%、約70%～約100%、約70%～約90%、約70%～約80%、約80%～約100%、約80%～約90%または約90%～約100%を有しうるかまたは保有しうる。

【0068】

非機能的、機能不全、または不活性タンパク質は、エクソン 80 変異を含み、かつ/または野生型 V I I 型コラーゲンタンパク質の機能性をほとんど乃至全く有していない m R N A 転写物に由来するタンパク質を包含する。例えば、機能的な V I I 型コラーゲンタンパク質は、野生型または正常 V I I 型コラーゲンタンパク質の機能性の約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、または 100 % を有し得る。非機能的、機能不全、または不活性タンパク質は、ヒト V I I 型コラーゲン C O L 7 A 1 遺伝子のエクソン 80 に 1 つまたは複数の変異を含有する m R N A 転写物に由来するタンパク質を包含する。エクソン 80 の変異は、例えば、未成熟停止コドンが組み込まれる結果、得られる m R N A 転写物の翻訳が早まって終結するものでもよいし、または結果として非機能的なタンパク質を生じる代替アミノ酸をコードするものでもよい。結果として得られるヒト V I I 型コラーゲンタンパク質は、非機能的、機能不全、または不活性タンパク質であり、分解される。C O L 7 A 1 遺伝子変異は、その内容が参照により本明細書に組み込まれる、国際出願公開第 W O 2 0 1 3 / 0 5 3 8 1 9 号、および Varki ら、J. M ed. Genet.、2007 年、44 巻：181～192 頁において開示されている。

10

【0069】

したがって、本開示は、V I I 型コラーゲン、例えば、不安定、欠陥、機能不全、十分に機能的でない、もしくは非機能的な V I I 型コラーゲンの機能性を回復し、かつ/または機能的なヒト V I I 型コラーゲンの発現を増加させる方法を提供する。タンパク質の機能性のレベルを決定もしくは測定し、機能性の増減のレベルを決定する、または例えば処置プロトコルに応じて機能的なタンパク質が産生されるかどうか、および/もしくは機能的なタンパク質の発現が増加するかどうかを決定する手段が数多く存在することは、当業者の認めるところである。そのような方法には、タンパク質の活性/機能性を測定または検出することなどが含まれるがこれだけに限らない。このような測定は、一般に、標準または対照または「正常」試料と比較して行われる。加えて、タンパク質の機能性の欠如が疾患過程に関係しているとき、疾患症状をモニターおよび/または測定して、正しく機能するタンパク質の有無を間接的に検出する、またはタンパク質の機能の欠如を改善することを目的とした処置プロトコルの成功を評価することもできる。

20

【0070】

特に、V I I 型コラーゲンの機能性、および/または V I I 型コラーゲンタンパク質が機能的であるかどうかは、当技術分野で認められている以下のいくつかの方法によって、*in vitro* および/または *in vivo* で測定および/または決定することができる。

30

- エクソン 80 スキッピングに続く V I I 型コラーゲンの合成は、ウエスタンブロット法によって評価することができる (Titeux ら、2010 年)。しかし、その開示の全体が参照により組み込まれる W O 2 0 1 3 / 0 5 3 8 1 9 (図 1 A) に記載されている通り、スキップされた r n R N A は、標的としたエクソン 80 のサイズが小さいために、見かけの分子量が野生型タンパク質と同様であるタンパク質を合成する。

- I コラーゲン鎖のホモ三量体への正確な組み立ては、非還元条件下でのウエスタンブロット法によって証明することができる。V I I 型コラーゲンホモ三量体の正確なタンパク質分解パターンは、ペプシンおよびコラゲナーゼ消化に続いてのウエスタンブロット法によって評価することができる (Titeux ら、2010 年)。

40

- コロイド金移動アッセイ。R D E B 細胞は、正常ケラチノサイトおよび線維芽細胞に比べて増強された運動性を示すので、コラーゲンマトリックス上で、処置された細胞の細胞能動性をアッセイすることができる (Chen ら、2002 年)。

- *in vitro* 接着アッセイ。R D E B 細胞は、I 型コラーゲン、I V 型コラーゲン、フィブロネクチンのような細胞外マトリックス成分への接着の欠陥を示すが、ラミニン I にはそうでない (Chen ら、2002 年)。

- 処置された R D E B 皮膚同等物をヌードマウスに移植した異種移植片を使用する、間接的な免疫組織化学検査による、真皮表皮接合部での V I I 型コラーゲンの検出 (Titeux

50

ら、2010年)。

- 処置されたRDEB皮膚同等物をヌードマウスに移植した異種移植片を使用する、透過型電子顕微鏡観察(TEM)による、係留線維生成の*in vivo*評価(Titeuxら、2010年)。

- 処置されたRDEB皮膚同等物をヌードマウスに移植した異種移植片を使用する、*in vivo*での真皮-表皮接着の回復の証明(Titeuxら、2010年)。

【0071】

上記参考文献の内容全体を、参照により本明細書に組み込む。

【0072】

したがって、多様な実施形態において、機能的なVII型コラーゲンの存在、発現、または発現の増加は、例えば、例えば本開示のアンチセンスオリゴマーで処理したRDEB細胞のウェスタンブロット分析によって、VII型コラーゲンの単量体およびホモ三量体両方の存在の評価を行うことにより決定することができる(例えば、WO2013/053819、実施例1および3ならびに図1Aおよび4を参照されたい。この内容全体を参照により本明細書に組み込む)。多様な実施形態では、RDEB細胞またはDEBの処置を必要とする被験体を本開示のアンチセンスオリゴマーで処置すると、VII型コラーゲンタンパク質が、例えば、正常細胞または正常被験体における正常なVII型コラーゲン発現量の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは100%、または上で開示した百分位数範囲のいずれかである量での発現をもたらす。

【0073】

本開示の多様な態様では、RDEB細胞またはDEBの処置を必要とする被験体によって発現されるVII型コラーゲンの機能性は、例えば、RDEB皮膚同等物の、真皮-表皮接合部に沿った正常なVII型コラーゲン沈着、係留線維生成および/または蓄積、ならびに真皮-表皮接着の存在についての、未処理のRDEB皮膚同等物と比較する、免疫組織化学分析および透過型電子顕微鏡観察によって決定することができる(例えば、WO2013/053819、実施例1および図1Bを参照されたい。この内容全体を参照により本明細書に組み込む)。

【0074】

この場合では、アンチセンスオリゴマーを使用してエクソン80スキッピングを引き起こした結果として、非処置に比べて約30%~約100%の範囲または機能性に関して上で開示した百分率で、栄養障害型表皮水疱症症状が改善される(すなわち、タンパク質の機能性または安定性が回復する)。そのような症状は、ミクロレベルで観察することができる(すなわち、例えば、免疫組織化学検査、免疫蛍光、ウェスタンブロット分析によって評価がなされる、タンパク質発現および/または局在化の回復;組織学的検査による皮膚障害の改善;外側の上皮と下にある間質の間における係留線維の生成能によって評価がなされる、タンパク質機能性の回復/改善)。

【0075】

「ヌクレオチド」という用語は、ヌクレオ塩基と、糖と、少なくとも1つのリン酸基(例えば、ホスホジエステル連結基)とを含む、天然に存在するヌクレオチドを指す。

【0076】

「ヌクレオチド類似体」という用語は、天然に存在するヌクレオチドの誘導体、または天然に存在するヌクレオチドに対する修飾、例えば、少なくとも1つの修飾を含むヌクレオチドを指す。このような修飾は、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せのうちの少なくとも1つを含みうる。当業者は、修飾を、ヌクレオチドサブユニットのうちの任意の1つの構成要素(例えば、修飾糖)に関して指定する場合、ヌクレオチドサブユニットのうちの、指定されていない部分は、依然として非修飾(例えば、非修飾ヌクレオシド間連結、非修飾ヌクレオ塩基)でありうることを察知すると予想される。

【 0 0 7 7 】

「オリゴヌクレオチド」、「オリゴマー」、「オリゴ」、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」、「アンチセンスオリゴマー」および「アンチセンスオリゴ」という用語、ならびにこれらの他の適切な組合せおよび派生語は、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の直鎖状配列であって、1または複数のヌクレオ塩基が、ワトソン-クリック塩基対合により、標的配列と称される、オリゴマーが指向される標的RNAの部分とハイブリダイズして、標的配列内で、オリゴマー：RNAヘテロ二重鎖を形成しうる直鎖状配列を指す。具体的に、「アンチセンス」、「オリゴヌクレオチド」、「オリゴマー」、「オリゴ」、および「化合物」という用語は、このようなオリゴマーを指すように、多様な組合せで、かつ、互換的に使用することができる。ヌクレオチドの部分を含む環式サブユニットは、

10

リボースまたは別の五炭糖、糖類似体に基づく場合もあり、ある特定の実施形態では、修飾糖、例えば、モルホリノ基である場合もある（下記のモルホリノベースのオリゴマーについての記載を参照されたい）。

【 0 0 7 8 】

オリゴマーに言及する場合の、「修飾された」、「天然に存在しない」、または「類似体」という用語、ならびにこれらの他の適切な組合せおよび派生形は、(i) 修飾ヌクレオシド間連結、例えば、天然に存在するオリゴヌクレオチド内に見出される、標準的なホスホジエステル連結以外のヌクレオシド間連結、(ii) 修飾糖部分、例えば、天然に存在するオリゴヌクレオチド内に見出される、リボース部分もしくはデオキシリボース部分以外の部分、または(iii) 前出の組合せから選択される、少なくとも1つの修飾を有する、1または複数のヌクレオチドサブユニットを有するオリゴマーを指す。多様な実施形態では、修飾ヌクレオシド間連結は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結から選択される。さらなる実施形態では、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結は、(1, 4-ピペラジン)-1-イル部分、置換(1, 4-ピペラジン)-1-イル部分、4-アミノピペリジン-1-イル部分、または置換4-アミノピペリジン-1-イル部分に共有結合したリン原子を含む。多様な実施形態では、修飾糖部分は、ペプチド核酸(PNA)サブユニット、ロケット核酸(LNA)サブユニット、2'-O, 4'-C-エチレン架橋核酸(ENA)サブユニット、トリシクロDNA(tc-DNA)サブユニット、2'-O-メチルサブユニット、2'-O-メトキシエチルサブユニット、2'-フルオロサブユニット、

20

30

2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]サブユニット、およびモルホリノサブユニットから選択される。

【 0 0 7 9 】

ヌクレオシド間連結への修飾は、オリゴマーの、少なくとも2つの糖部分および/または修飾糖部分の間の修飾でありうる。ヌクレオチド類似体は、ワトソン-クリック塩基対合により、天然に存在するオリゴヌクレオチド塩基への水素結合が可能な塩基を担い、ここで、類似体は、オリゴマー類似体分子と、天然に存在するオリゴヌクレオチド（例えば、一本鎖RNAまたは一本鎖DNA）内の塩基との間で、配列特異的に、このような水素結合を可能とするように、塩基を提示する。例示的な類似体は、実質的に非荷電の、リンを含有するヌクレオシド間連結を有する類似体である。

40

【 0 0 8 0 】

「ヌクレアーゼ耐性」オリゴマーとは、そのヌクレオシド間連結が、非ハイブリダイズ形態でも、ハイブリダイズ形態でも、ヌクレアーゼによる切断であって、体内の、一般的な、細胞外ヌクレアーゼおよび細胞内ヌクレアーゼによる（例えば、3'-エクソヌクレアーゼなどのエクソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、RNAアーゼHによる）切断に対して実質的に耐性であるオリゴマーを指す；すなわち、オリゴマーは、オリゴマーが曝露される、体内の正常なヌクレアーゼ条件下で、ヌクレアーゼによる切断を、ほとんどまたは全く示さない。「ヌクレアーゼ耐性ヘテロ二重鎖」とは、ヘテロ二重鎖が、細胞内ヌクレアーゼおよび細胞外ヌクレアーゼによる、in vivoにおける分解であって、二本鎖RNA/RNA複合体または二本鎖RNA/DNA複合体を切断することが可能な分解

50

に対して、実質的に耐性となるように、アンチセンスオリゴマーの、その相補的な標的への結合により形成されるヘテロ二重鎖を指す。「ヘテロ二重鎖」とは、アンチセンスオリゴマーと、標的RNAの相補的部分との二重鎖を指す。例えば、ヌクレアーゼ耐性オリゴマーは、本明細書で記載されるアンチセンスオリゴマーでありうる。

【0081】

「ヌクレオ塩基」(Nu)、「塩基対合部分」、または「塩基」という用語は、自然発生または「生来」のDNAまたはRNA(例えば、ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、およびグアニン)のほか、天然に存在するプリンおよびピリミジンの類似体であって、結合アフィニティーなど、改善された特性を、オリゴマーへと付与する類似体において見出される、プリン塩基またはピリミジン塩基を指すように、互換的に使用される。例示的な類似体は、ヒポキサンチン(ヌクレオシドであるイノシンの塩基成分); 2, 6 - ジアミノプリン; 5 - メチルシトシン; C5 - プロピニル修飾ピリミジン; 10 - (9 - (アミノエトキシ)フェノキサジニル(Gクランプ)などを含む。

10

【0082】

塩基対合部分のさらなる例は、それらのそれぞれのアミノ基を、アシル保護基で保護した、ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、グアニン、およびヒポキサンチン(イノシン)、2 - フルオロウラシル、2 - フルオロシトシン、5 - ブロモウラシル、5 - ヨードウラシル、2, 6 - ジアミノプリン、アザシトシン、シュードイソシトシンおよびシュードウラシルなどのピリミジン類似体、ならびに8 - 置換プリン、8 - 置換キサンチン、または8 - 置換ヒポキサンチン(後者の2つは、天然の分解産物である)など、他の修飾ヌクレオ塩基を含むがこれらに限定されない。それらの内容が参照により本明細書に組み込まれる、ChiuおよびRana、RNA、2003年、9巻、1034~1048頁、Limbachら、Nucleic Acids Research、1994年、22巻、2183~2196頁;ならびにRevankarおよびRao、Comprehensive Natural Products Chemistry、7巻、313頁において開示されている修飾ヌクレオ塩基もまた想定される。

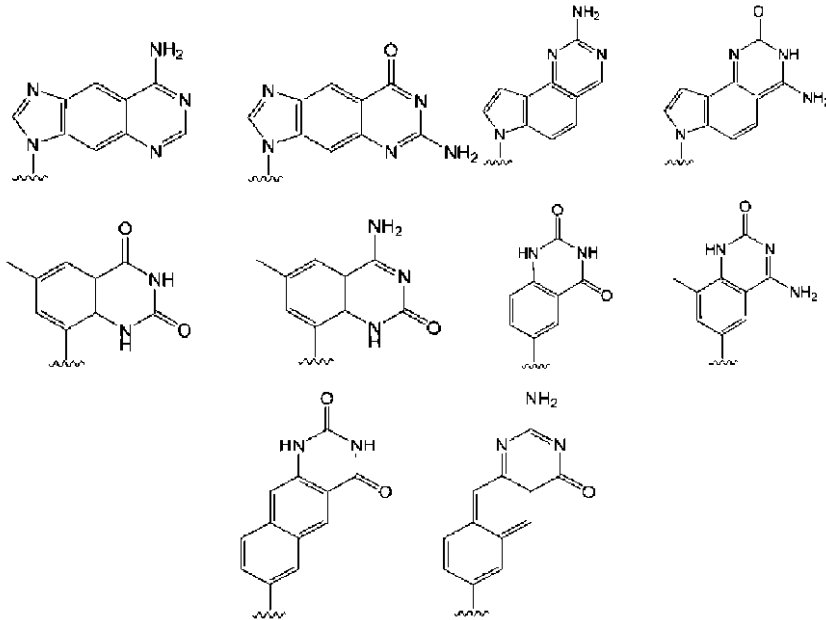
20

【0083】

塩基対合部分のさらなる例は、1または複数のベンゼン環を付加したサイズ拡大型ヌクレオ塩基を含むがこれらに限定されない。Glen Researchのカatalog(www.glenresearch.com); Krueger ATら、Acc. Chem. Res.、2007年、40巻、141~150頁; Kool, ET、Acc. Chem. Res.、2002年、35巻、936~943頁; Benner S. A.ら、Nat. Rev. Genet.、2005年、6巻、553~543頁; Romesberg, F.E.ら、Curr. Opin. Chem. Biol.、2003年、7巻、723~733頁; Hirao, I.、Curr. Opin. Chem. Biol.、2006年、10巻、622~627頁(これらの内容は、本明細書において参考として援用される)において記載されている核塩基置換(nucleic base replacement)も、本明細書で記載されるオリゴマーの合成に有用であると想定される。サイズ拡大型ヌクレオ塩基の例を、下記:

30

【化 1 4】



10

に示す。

【0084】

20

リボース、糖類似体、修飾糖、またはモルホリノに共有結合的に連結されたヌクレオ塩基は、ヌクレオシドを含む。「ヌクレオチド」は、少なくとも1つの連結リン酸基と併せたヌクレオシドを含む。リン酸基は、オリゴマーを形成するように、隣接するヌクレオチドへの共有結合的連結を含む。こうして、ヌクレオチドのリン酸基は一般に、「ヌクレオシド間連結」を形成すると称する。したがって、ヌクレオチドは、本明細書でさらに記載されるヌクレオシドと、ヌクレオシド間連結とを含む。一部の実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、サブユニットを含み、ここで、「サブユニット」は、天然に存在するヌクレオチド、本明細書で記載されるヌクレオチド類似体、およびこれらの組合せを含む。ある特定の実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、サブユニットを含み、ここで、少なくとも1つのサブユニットは、ヌクレオチド類似体である。

30

【0085】

「配列同一性」および「配列相同性」という用語（例えば、「～と50%同一な配列」）は、配列が、ヌクレオチド対ヌクレオチドベースで、比較ウィンドウ（window of comparison）にわたり同一である程度を指す。「同一性百分率」は、2つの最適にアラインメントされた配列を、比較ウィンドウにわたり比較し、両方の配列内で、同一な核酸塩基（例えば、A、T、C、G、I）が生じる位置の数を決定して、マッチさせた位置の数をもたらし、マッチさせた位置の数を、比較ウィンドウ内の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で除し、結果に100を乗じて、配列同一性の百分率をもたらすことにより計算することができる。比較ウィンドウをアラインメントするための、配列の最適のアラインメントは、コンピュータへのアルゴリズム（Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0、Genetics Computer Group、575 Science Drive Madison、Wis.、USAにおける、GAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）の実行により行うこともでき、精査と、選択される多様な方法のうちのいずれかにより生成される、最良のアラインメント（すなわち、比較ウィンドウにわたり最高の相同性百分率をもたらすアラインメント）とにより行うこともできる。また、例えば、Altschulら、Nucleic Acids Res.、25巻：3389頁、1997年により開示されている通り、BLASTファミリーのプログラムも参照することができる。多様な実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、表2におけるターゲティング配列（配列番号2、3、4、および6）に対して、少なくとも70%、

40

50

75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の配列同一性を有しうる。

【0086】

本明細書で使用される通り、融点 (T_m) が、40、45、50 を実質的に超え、多様な実施形態では、60 ~ 80 またはこれを超える生理学的条件下で、オリゴマーが、標的とハイブリダイズする場合に、オリゴマーは、標的オリゴヌクレオチドと、「特異的にハイブリダイズする」。このようなハイブリダイゼーションは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に対応することが好ましい。所与のイオン強度および pH において、 T_m は、標的配列のうちの50%が、相補的な配列とハイブリダイズする温度である。このようなハイブリダイゼーションは、アンチセンスオリゴマーの、標的配列への「ほぼ (near)」または「実質的な」相補性により生じうるほか、正確な相補性によっても生じうる。一部の実施形態では、オリゴマーは、標的配列と、約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%でハイブリダイズしうる。

10

【0087】

本明細書で使用される、「サブユニット」という用語は、天然に存在するヌクレオチド、または少なくとも1つの修飾を含む、天然に存在するヌクレオチドを指す。修飾は、(i) 修飾ヌクレオチド間連結、(ii) 修飾糖部分、または(iii) 前出の組合せのうちの少なくとも1つを含みうる。さらなる実施形態では、修飾は、修飾ヌクレオ塩基を含みうる。

20

【0088】

本明細書で使用するとき、「十分な長さ」という用語は、エクソン80 / イントロン80を含むヒトVII型コラーゲンプレmRNAエクソン / イントロンスプライス接合部領域にわたる領域内の少なくとも12、より典型的には12 ~ 40の連続ヌクレオ塩基と相補的なアンチセンスオリゴマーを指す。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ヒトVII型コラーゲンプレmRNA配列の標的領域と特異的にハイブリダイズすることが可能な、少なくともいくつかのヌクレオチドを含む。十分な長さのオリゴマーは、12 ~ 30ヌクレオチド、12 ~ 25ヌクレオチド、12 ~ 22ヌクレオチド、15 ~ 25ヌクレオチド、15 ~ 22ヌクレオチド、または15 ~ 20ヌクレオチドの長さであることが、これらの範囲の間の全ての整数を含めて、好ましい。より好ましくは、十分な長さのオリゴマーは、12 ~ 27、12 ~ 22、または15 ~ 22ヌクレオチドの長さである。

30

【0089】

本明細書で使用するとき、「被験体」または「それを必要とする被験体」という用語は、ヒト被験体などの哺乳動物被験体を含む。例示的な哺乳動物被験体は、表皮水疱症および関連障害を有するか、またはこれを有する危険性がある。本明細書で使用するとき、「表皮水疱症」および「関連障害」という用語は、罹患個体における機能不全のヒトVII型コラーゲンタンパク質の発現を多くの場合特徴とする、ヒト常染色体優性または常染色体劣性疾患である、一群の遺伝性の機械的水疱障害または関連障害を指す。一部の実施形態では、表皮水疱症 (DB) および関連障害は、劣性型栄養障害型表皮水疱症 (RDEB)、優性型栄養障害型表皮水疱症 (DDEB)、Hallopeau-Siemens型栄養障害型表皮水疱症 (RDEB-HS)、非重症型の劣性栄養障害型表皮水疱症、反対型の劣性栄養障害型表皮水疱症、求心型の劣性栄養障害型表皮水疱症、非Hallopeau-Siemens型栄養障害型表皮水疱症 (非HS RDEB) のいずれかを含めた栄養障害型表皮水疱症 (DEB) を含むが、これらに限定されない。他の実施形態では、単純型表皮水疱症 (EBS) および接合型表皮水疱症 (JEB) を処置する方法を提供する。

40

【0090】

本明細書で使用するとき、「標的」という用語は、本明細書で企図するアンチセンスオリゴマーと関係している、プレmRNA転写物内の領域を指す。多様な態様では、標的は

50

、ヒトV I I型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる、ヒトV I I型コラーゲンプレmRNAの領域である。多様な実施形態では、標的領域は、ヒトV I I型コラーゲンのプレmRNAのエクソン80/イントロン80を含むエクソン/イントロンスプライス接合部領域である。多様な実施形態では、標的領域は、配列番号1の全部、または少なくともエクソン80/イントロン80のスプライス接合部にわたる少なくとも一部を含む。複数の実施形態では、エクソン/イントロンスプライス接合部は、ヒトV I I型コラーゲンのドナーエクソン/イントロンスプライス接合部である。さらなる実施形態では、ドナーエクソン/イントロンスプライス接合部は、エクソン80/イントロン80のドナーエクソン/イントロンスプライス接合部を含む。

【0091】

多様な実施形態では、「ターゲティング配列」という用語は、アンチセンスオリゴマー内またはアンチセンスオリゴマー類似体内の配列であって、プレmRNA転写物内の標的配列と相補的な配列を指す。アンチセンスオリゴマーの全配列が、標的配列と相補的な場合もあり、アンチセンスオリゴマーの一部だけが、標的配列と相補的な場合もある。例えば、20～30塩基を有するオリゴマー内の、約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30個は、プレmRNA転写物内の標的領域と相補的な配列（例えば、「ターゲティング配列」）を含有しうる。ターゲティング配列は、オリゴマー内の連続塩基から形成されることが典型的であるが、代替的に、例えば、オリゴマーの反対側の末端から一体とされると、標的配列にわたる配列を構成する非連続配列から形成される場合もある。

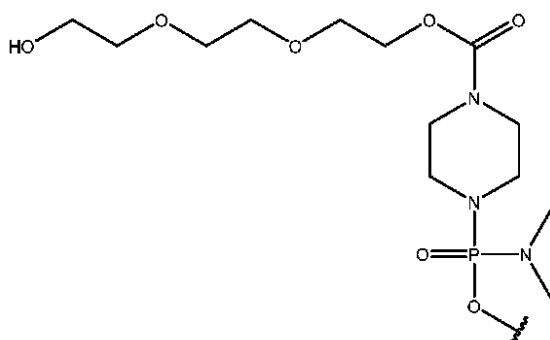
【0092】

「ターゲティング配列」は、標的配列に対して「ほぼ」または「実質的な」相補性を有し得、それでもなお、その意図した目的のため、例えば、ヒトV I I型コラーゲンエクソン80をコードするプレmRNAの発現を減少させる、または機能的なヒトV I I型コラーゲンタンパク質の発現を増加させる、または係留線維における機能的なヒトV I I型コラーゲンの蓄積を増加させる、または係留線維の蓄積を増加させるために機能しうる。本開示で用いるアンチセンスオリゴマー化合物は、標的配列に対して、多くても12ヌクレオチドに1つのミスマッチ、好ましくは、多くても20ヌクレオチドに1つのミスマッチを有することが好ましい。代替的に、用いるアンチセンスオリゴマーは、本明細書で示す例示的なターゲティング配列に対して、少なくとも90%の配列相同性、好ましくは、少なくとも95%の配列相同性を有する。ターゲティング配列は、ヒトV I I型コラーゲンCOL7A1遺伝子のエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる配列でよい。一部の実施形態では、エクソン/イントロンスプライス接合部は、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部を含む。

【0093】

本明細書で使用される「TEG」、「トリエチレングリコールテール」または「EG3」という用語は、例えば、その3'末端または5'末端でオリゴマーにコンジュゲートしたトリエチレングリコール部分を指す。例えば、一部の実施形態では、「TEG」は、式(I)の化合物のTが、式：

【化15】



を有するものを含む。

【 0 0 9 4 】

本明細書で使用される、組成物の「治療有効量」または「有効量」という用語は、組成物が有効な処置のために、障害の防止または処置において有効な量を指す。「障害」とは、組成物による処置から利益を得る、任意の栄養障害型表皮水疱症または関連障害を指す。

【 0 0 9 5 】

本明細書で使用される「～を定量化すること」、「定量化」という用語、または他の類縁の語は、核酸、オリゴヌクレオチド、オリゴマー、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の、数量、質量、または単位容量中の濃度を決定することを指す。

【 0 0 9 6 】

多様な実施形態では、本明細書で使用される「処置」という用語は、被験体（例えば、ヒトなどの哺乳動物）または細胞の処置（処理）であって、被験体または細胞の現在の経過を変更する処置を含む。処置は、医薬組成物の投与を含むがこれに限定されず、予防的に実施することもでき、病理学的事象の開始または病因作用物質との接触に後続して実施することもできる。また、処置される疾患もしくは状態の進行速度の低減、この疾患もしくは状態の発症の遅延、またはその発症の重症度の軽減を指向しうる「予防的」処置も含まれる。「処置」または「予防」とは、必ずしも、疾患もしくは状態、またはこれらの関連する症状の、完全な根絶、治癒、または防止を指し示すものではない。

【 0 0 9 7 】

II. ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン80エクソン/イントロンスプライス接合部のモジュレーション

多様な態様は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのイントロンおよびエクソンのスプライシングをモジュレートするための方法に関する。さらなる態様は、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部部位でのスプライシングを阻害することに関する。さらなる態様では、所与の試料（例えば、血清試料、血漿試料、組織試料、細胞試料など）において、エクソン80を除くヒトVII型コラーゲンコードmRNAの発現が、例えば、エクソン80を含有する野生型mRNAと比べて、増加する。多様な方法は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNA内の標的領域と相補的な、本明細書で記載されるアンチセンスオリゴマーを投与するステップを含み、エクソン80を排除したヒトVII型コラーゲンmRNAの発現は、エクソン80を含有する野生型（すなわち、対照）mRNAの発現と比べて増加する。

【 0 0 9 8 】

例示を目的とし、理論に束縛されずに述べると、本明細書で記載される通りのアンチセンスオリゴマーは、スプライソソームの作用および成熟mRNA転写物の産生を阻害するなどにより、プレmRNAのプロセシングの遮断、阻害、またはモジュレーションを促進すると考えられ、また、標的としたmRNAの分解も誘導しうる。一部の例では、スプライソソーム（spliceosome）がエクソン/イントロンスプライス接合部に結合するのを阻害して、エクソン/イントロンスプライス接合部がスキップされ、mRNA転写物から1つまたは複数のエクソンが除去されるようにすることができる。野生型mRNA転写物より1つまたは複数少ないエクソンを有する成熟mRNA転写物は、オープンリーディングフレームを保持するmRNA転写物をもたらし得、それにより、mRNA転写物は、分解されるのではなく、機能的なタンパク質へと翻訳されうる。野生型mRNAより少ないエクソンを有するmRNA転写物から翻訳されたタンパク質は、結果として、野生型mRNA転写物から転写されたタンパク質より少ないアミノ酸残基を含む転写タンパク質となりうる。野生型タンパク質より少ないアミノ酸残基で構成された機能的なタンパク質は、野生型タンパク質と同じまたは同様の活性/機能性を有しうる。アンチセンスオリゴマーは、それがハイブリダイズする標的配列または標的領域「を指向する」またはこれら「に対してターゲティングされた」ということができる。ある特定の実施形態では、標的配列は、プレmRNAの3'スプライス接合部位もしくは5'スプライス接合部位を含む領域、分岐点、エクソンのスプライシングエンハンサー（ESE）もしくはイントロンのスプライシ

10

20

30

40

50

ングエンハンサー (I S E)、またはスプライシングの調節に關与する他の配列を含む。イントロン内では、ドナー部位 (イントロンの 5 ' 末端) およびアクセプター部位 (イントロンの 3 ' 末端) がスプライシングに必要である。スプライスドナー部位は、イントロンの 5 ' 末端にあるほとんど不変の配列 G U を、より大きい、それほど高度に保存されていない領域内に含む。イントロンの 3 ' 末端にあるスプライスアクセプター部位は、ほとんど不変の A G 配列によってイントロンを終結させる。標的配列は、エクソン / イントロンスプライス接合部部位内にある、またはエクソン / イントロンスプライス接合部にわたる配列を含み得る。標的配列は、エクソン / イントロンドナーズプライス部位を含み得る。

【 0 0 9 9 】

標的プレ m R N A 配列に対する配列相補性であって、標的 R N A のスプライシングをモジュレートするのに十分な配列相補性を有するアンチセンスオリゴマーは、スプライソーム複合体に対する結合部位の遮蔽または妨害を誘発するのに十分な配列であって、他の点で、このようなスプライシングに影響を及ぼし、かつ / または、他の点で、ターゲティングされたプレ m R N A の三次元構造の変更を含む配列を有するアンチセンスオリゴマーを含む。

【 0 1 0 0 】

多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ヒト V I I 型コラーゲンプレ m R N A のエクソン 8 0 / イントロン 8 0 スプライス接合部にわたる配列に対する、十分な長さで相補性を有する。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマー内のターゲティング配列は、標的配列、例えば、下記の表 1 に示される、配列番号 1 とハイブリダイズする。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、短い、例えば、約 1 2 塩基の場合もあり、長い、例えば、約 4 0 塩基の場合もあり、配列が、標的配列へのハイブリダイゼーション時に、スプライスモジュレーションを行うのに十分に相補的であり、任意選択で、R N A と共に、T m が、4 5 またはこれを超える、ヘテロ二重鎖を形成する限り、少数のミスマッチを含む。

【 0 1 0 1 】

【 表 1 】

表 1		
ヒト VII 型コラーゲンを標的とするオリゴマーの標的配列 (GenBank/EMBL L23982 から)		
名称	配列 (5'-3')	配 列 番 号
エクソン 80/ イントロン 80	GGTCTGCAGGGTCCAAGAGGCCCCCTGGCCCAGTG/GTGA GTACCCAAGAACCTTCACCTGTC	1
「/」は、スプライス部位を示す		
チミン (T) 塩基は、ウラシル (U) 塩基でもよい		

【 0 1 0 2 】

多様な実施形態では、アンチセンスターゲティング配列と、標的配列との相補性の程度は、安定的な二重鎖を形成するのに十分である。アンチセンスオリゴマーの、標的配列との相補性の領域は、1 2 ~ 1 5 塩基という短い領域でありうるが、1 2 ~ 2 0 塩基またはこれを超える領域であることが可能であり、例えば、これらの範囲の間の全ての整数を含む、1 2 ~ 4 0 塩基、1 2 ~ 3 0 塩基、1 2 ~ 2 5 塩基、1 2 ~ 2 2 塩基、1 5 ~ 2 5 塩基、1 5 ~ 2 2 塩基、または 1 5 ~ 2 0 塩基でありうる。約 1 2 ~ 1 5 塩基のアンチセンスオリゴマーは一般に、固有の相補配列を有する程度に十分に長い。ある特定の実施形態では、本明細書で論じられる、必須の結合 T m を達成するのに、最小の長さの相補塩基が

要請されうる。

【0103】

多様な態様では、オリゴマーを、バイオアベイラビリティ、安定性、細胞更新 (cellular update)、およびヌクレアーゼ分解に対する耐性を含むがこれらに限定されない、さらなる機能性のために構成する。一般に、40塩基を含むオリゴマーは、適切である可能性があり、ここで、少なくとも最小数の塩基、例えば、12塩基は、標的配列と相補的である。多様な態様では、オリゴマーを、促進された細胞取込みまたは能動的な細胞取込みを増強するように構成する。多様な実施形態では、これらのオリゴマーを、約30塩基未満または約30塩基の長さへと最適化する。多様な態様では、アンチセンスオリゴマーは、1または複数のホスホルアミデートモルホリノ単量体サブユニットまたはホスホロジアミデートモルホリノ単量体サブユニットを含む。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約18~25ホスホルアミデートモルホリノ単量体サブユニットまたはホスホロジアミデートモルホリノ単量体サブユニットを含む。本開示のさらなる態様に従い、アンチセンスオリゴマーの長さと、ホスホルアミデートモルホリノ単量体サブユニットまたはホスホロジアミデートモルホリノ単量体サブユニットのうちのいずれかを含む、修飾単量体サブユニットの数とを変動させて、製剤の最適の均衡および投与後の安定性、ならびに細胞取込みを得る。ある特定の実施形態では、最適化されたアンチセンスオリゴマーは、ホスホルアミデートモルホリノ単量体サブユニットまたはホスホロジアミデートモルホリノ単量体サブユニットを含む全てのサブユニットまたは実質的に全てのサブユニットについて、18~25塩基の長さを含む。

【0104】

多様な態様では、アンチセンスオリゴマーは、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である、少なくとも1つのサブユニットと；ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列とを任意選択で含む、12~40サブユニットを含むか、これらからなるか、またはこれらから本質的になる。多様な実施形態では、連続ヌクレオチドは、エクソン/イントロンスプライス接合部ヒトVII型コラーゲン (the exon/intron splice junction human type VII collagen) を含む。さらなる実施形態では、スプライス接合部は、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部 (例えば、配列番号1) を含む。

【0105】

さらなる態様は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる標的領域と特異的にハイブリダイズする、12~40サブユニットのアンチセンスオリゴマーを含む。スプライス接合部は、エクソン80/イントロン80の交点にあるスプライス接合部を含む。複数の実施形態では、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部は、配列番号1内のスプライス接合部を含む。

【0106】

さらなる態様は、修飾糖部分を含む、ヌクレオチド類似体サブユニットを有する、アンチセンスオリゴマーを含む。多様な実施形態では、修飾糖部分は、ペプチド核酸 (PNA) サブユニット、ロケット核酸 (LNA) サブユニット、2' O, 4' C - エチレン架橋核酸 (ENA) サブユニット、トリシクロDNA (tc-DNA) サブユニット、2' O - メチルサブユニット、2' O - メトキシエチルサブユニット、2' - フルオロサブユニット、2' - O - [2 - (N - メチルカルバモイル) エチル] サブユニット、およびモルホリノサブユニットから選択される。

【0107】

さらなる態様は、修飾ヌクレオシド間連結を含む、ヌクレオチド類似体サブユニットを有する、アンチセンスオリゴマーを含む。多様な実施形態では、修飾ヌクレオシド間連結は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結から選択される。さらなる実施形態では、ホス

ホロジアミデートヌクレオシド間連結は、(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、置換(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分、または置換4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分に共有結合したリン原子を含む。

【0108】

さらなる態様は、修飾糖部分と修飾ヌクレオシド間連結との少なくとも1つの組合せを含む、ヌクレオチド類似体サブユニットを有する、アンチセンスオリゴマーであって、多様な実施形態では、1または複数のサブユニットが、

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、モルホリノサブユニット、

10

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、2' O - メチルサブユニット、

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、2' O - メトキシエチルサブユニット、

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、2' - フルオロサブユニット、

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、2' O, 4' C - エチレン架橋核酸サブユニット、

20

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、2' - O - [2 - (N - メチルカルバモイル)エチル]サブユニット、

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、トリシクロDNAサブユニット、

任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結、もしくはホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換された、ロックト核酸サブユニット、

30

ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結をさらに含み、ホスホロジアミデートのリン原子を、モルホリン環の窒素原子に共有結合させ、かつ、(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、もしくは置換(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分に共有結合させたモルホリノサブユニット、

ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結をさらに含み、ホスホロジアミデートのリン原子を、4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分、もしくは置換4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分に共有結合させたモルホリノサブユニット、

ホスホロチオエートヌクレオシド間もしくはホスホルアミデートヌクレオシド間連結で置換された、リボース糖サブユニット、

40

ホスホロチオエートヌクレオシド間連結もしくはホスホルアミデートヌクレオシド間連結で置換された、デオキシリボース糖サブユニット、

任意選択で置換された、ペプチド核酸サブユニット、

または前出の任意の組合せ

から選択されるアンチセンスオリゴマーを含む。

【0109】

多様な態様および実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴマーに共有結合したペプチドをさらに含む。多様な実施形態では、アルギニンに富む細胞透過性ペプチドを、アンチセンスオリゴマーの3'末端または5'末端にコンジュゲートさせる。

50

【0110】

複数の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40塩基からなる場合もあり、12~40、12~30、14~25、15~30、17~30、17~27、12~27、12~25、および12~20塩基の範囲の場合もある。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約12~約40または約12~約30塩基の長さである。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約14~約25または約17~約27塩基の長さである。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマー配列は、少なくとも約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40の連続塩基または非連続塩基であって、表1の標的配列（例えば、配列番号1、もしくは配列番号1の少なくとも一部にわたる配列）と相補的な連続塩基または非連続塩基を含む。

10

【0111】

アンチセンスオリゴマーは、ヒトVII型コラーゲンのpre-mRNA配列の、エクソン80内もしくはイントロン80内の配列もしくは領域またはこれらと隣接する配列もしくは領域と十分に相補的な塩基配列を含むことが典型的である。アンチセンスオリゴマーは、VII型コラーゲンpre-mRNAの異常なスプライシングを、有効にモジュレートし、これにより、機能的なヒトVII型コラーゲンタンパク質の発現を増加させることが可能なことが理想的である。この要件は、任意選択で、オリゴマー化合物が、哺乳動物細胞により能動的に取り込まれ、取り込まれると、標的mRNAと共に、任意選択で、Tmが、約40 または45 を超える、安定的な二重鎖（またはヘテロ二重鎖）を形成する能力を有する場合に満たされる。

20

【0112】

本明細書で使用される「相補的 (complementary)」または「相補的 (complementary)」とは、標的配列と相補的なヌクレオチド配列のうちの、約90%~約100%を有するアンチセンスオリゴマーを指す。複数の実施形態では、相補的なヌクレオチド配列は、標的配列と特異的にハイブリダイズして、所望の効果、例えば、本明細書で記載される治療効果を誘導する。ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、オリゴマーと標的配列との間に形成されるヘテロ二重鎖が、細胞ヌクレアーゼの作用、およびin vivoにおいて生じうる、他の様態の分解に抗するのに十分に安定である限りにおいて、標的配列と100%相補的な場合もあり、例えば、改変体を擁するように、ミスマッチを含む場合もある。よって、ある特定のオリゴマーは、オリゴマーと、標的配列との間の、約90%または少なくとも約90%の配列相補性、例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列相補性を意味する、実質的な相補性を有しうる。本明細書では、ヌクレアーゼによる切断を受けにくいオリゴマーのヌクレオチド間連結が提供される。ミスマッチは、存在する場合、ハイブリッド二重鎖の中央部より、末端領域に向かって、より不安定化しにくくなるのが典型的である。許容されるミスマッチの数は、よく理解されている、二重鎖安定性の原理に従い、オリゴマーの長さ、二重鎖内のG:C塩基対の百分率、および二重鎖内のミスマッチの位置に依存すると予想される。このようなアンチセンスオリゴマーは必ずしも、標的配列に対する、100%の相補性を含むわけではないが、標的pre-mRNAのスプライシングを十分にモジュレートする、例えば、本明細書で記載される治療効果を達成するように、標的配列に、有効に、安定的に、かつ特異的に結合するのに十分な相補性を有するべきである。

30

40

【0113】

理論に束縛されずに述べると、オリゴマーと、標的配列との間で形成される二重鎖の安定性は、結合Tmと、二重鎖の、細胞酵素による切断の受けやすさとの関数であると考えられる。相補配列であるRNA二重鎖との関連における、オリゴマーのTmは、Hame

50

sら、「Nucleic Acid Hybridization」、IRL Press、1985年、107～108頁により記載されている方法、またはMiyada C. G. およびWallace R. B.、1987年、「Oligomer Hybridization Techniques」、Methods Enzymol.、154巻、94～107頁（この内容は、本明細書中に参考として援用される）において記載されている方法など、従来の方法により測定することができる。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、相補配列であるRNA二重鎖との関連における結合T_mであって、例えば、約45 または50 を超えるなど、体温を超えるT_mを有する。60～80 またはこれを超える範囲のT_mもまた含まれる。周知の原理に従い、相補性ベースのRNAハイブリッド二重鎖との関連における、オリゴマーのT_mは、二重鎖内のC：G対合塩基の比を増加させ、かつ/またはヘテロ二重鎖の長さ（塩基対での）を増加させることにより、上昇させることができる。同時に、細胞取込みを最適化させる目的では、オリゴマーのサイズを制限することもありうる。この理由で、25塩基またはこれ未満の長さで、高T_m（45～50 またはこれを超える）を示す化合物は一般に、高T_m値のために25塩基を超える長さを必要とする化合物より好ましい。

【0114】

下記の表2は、ヒトVII型コラーゲン遺伝子のエクソン80/イントロン80のプレmRNA配列に関するイントロン/エクソンスプライス接合部と相補的な、例示的なターゲティング配列を示す（5' - 3'の配向性で）。

【0115】

【表2】

表2		
ヒトVII型コラーゲンを標的とするオリゴマーのアンチセンスオリゴマー配列		
名称	配列(5'-3')	配列番号
COL7A1 エクソン 80 アンチセンス配列		
Col7a1-4 D(+27-12)	XXGGGXACXCACCACXGGGCCA	2
Col7a1-2 D(+31-16)	GXXCXXGGGXACXCACCACXGG	3
Col7a1-1 D(+34-19)	AAGGXXCXXGGGXACXCACCAC	4
Col7a1-3 D(+24-09)	GGXACXCACCACXGGGCCAGIG	6
「X」は、ウラシル(U)またはチミン(T)のいずれかから選択される		
「I」は、イノシンである		

【0116】

こうして、ある特定のアンチセンスオリゴマーは、表2における配列（例えば、配列番号2、3、4もしくは6）を含むか、これらからなるか、またはこれらから本質的になるか、配列番号2、3、4もしくは6から選択されるか、配列番号2、3、4もしくは6から選択される配列のうちの、少なくとも12連続ヌクレオチドの断片であるか、あるいは、配列番号2、3、4もしくは6から選択される配列に対する、少なくとも90%の配列同一性を有する改変体であり、ここで、Xは、ウラシル（U）またはチミン（T）から選択される。例えば、ある特定のアンチセンスオリゴマーは、配列番号2、3、4もしくは6のいずれかのうちの約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30の連続ヌクレオチドもしくは非連続ヌクレオチド、または少なくともほぼこれらの数の連続ヌクレオチドもしくは非連続ヌクレオチドを含む。非連続部分については、介在ヌクレオチドを、欠失させるか、または異なるヌクレオチドで置換することもでき、介在ヌクレオチドを付加するこ

ともできる。改変体のさらなる例は、約 90% または少なくとも約 90% の配列同一性または配列相同性、例えば、配列番号 2、3、4 もしくは 6 のいずれかの全長にわたる、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性または配列相同性を有するオリゴマーを含む。好ましい実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される。

【0117】

アンチセンスオリゴマーおよびその改変体の活性/機能性は、当技術分野における慣例的な技法に従いアッセイすることができる。例えば、サーベイされる RNA のスプライス形態および発現レベルを、転写される核酸またはタンパク質のスプライス形態および/または発現を検出するための、多種多様な周知の方法のうちのいずれかにより評価することができる。このような方法の非限定的な例は、RNA のスプライシング形態についての RT-PCR に続く、PCR 産物のサイズによる分離、核酸ハイブリダイゼーション法、例えば、ノーザンブロット、ならびに/または核酸アレイ；核酸増幅法；タンパク質を検出するための免疫学的方法；タンパク質精製法；およびタンパク質機能アッセイまたはタンパク質活性アッセイの使用を含む。

【0118】

RNA 発現レベルは、mRNA / cDNA (すなわち、転写されるオリゴヌクレオチド) を、細胞、組織、または生物体から調製し、mRNA / cDNA を、アッセイされる核酸またはその断片の相補体である基準オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせることにより評価することができる。cDNA は、任意選択で、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの前に、様々なポリメラーゼ連鎖反応または *in vitro* における転写法のうちのいずれかを使用して増幅することもできるが；増幅しないことが好ましい。1 または複数の転写物の発現はまた、転写物の発現レベルについて評価する、定量的 PCR を使用して検出することもできる。

【0119】

III. アンチセンスオリゴマー化学

A. 一般的特徴

多様な態様および実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ヒト V II 型コラーゲンプレ mRNA のスプライス接合部領域と特異的にハイブリダイズする。例示的なアンチセンスオリゴマーは、表 2 に明示されたターゲティング配列、表 2 のターゲティング配列のうちの、少なくとも 12 連続ヌクレオチドの断片、または表 2 のターゲティング配列に対する、少なくとも 90% の配列同一性を有する改変体を含む。他の例示的なアンチセンスオリゴマーは、表 2 に明示されたターゲティング配列からなるか、またはこれらから本質的になる。

【0120】

さらなる態様では、ヌクレアーゼ耐性アンチセンスオリゴマーが提供される。多様な実施形態では、1 または複数のヌクレオシド間連結の修飾を含むアンチセンスオリゴマーが提供される。他の実施形態では、1 または複数の修飾糖部分を含むアンチセンスオリゴマーが提供される。他の実施形態では、1 または複数の修飾ヌクレオシド間連結と、1 または複数の修飾糖部分との組合せを含む、アンチセンスオリゴマーが提供される。他の実施形態では、修飾ヌクレオ塩基単独、または修飾ヌクレオシド間連結もしくは修飾糖部分のうちのいずれかと組み合わせた修飾ヌクレオ塩基を含む、アンチセンスオリゴマーが提供される。

【0121】

多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、完全に修飾されたヌクレオシド間連結を有するオリゴマーを含むことが可能であり、例えば、ヌクレオシド間連結の 100% が修飾されている (例えば、25mer のアンチセンスオリゴマーは、本明細書で記載される修飾のうちの 1 つまたはこれらの任意の組合せで修飾された、24 のヌクレオシド間連結を含む)。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、そのヌクレオシド間連結の約 100% ~ 2.5% が修飾されたものを含みうる。多様な実施形態では、アンチセ

ンスオリゴマーは、そのヌクレオシド間連結のうちの約 99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、または 2.5%、およびその間の整数 (iteration) の%が修飾されたものを含みうる。他の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、本明細書で記載される修飾の任意の組合せを含みうる。

【0122】

修飾ヌクレオシド間連結のパーセントについての実施形態と組み合わせた実施形態を含む、多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、完全修飾糖部分を有するオリゴマーを含むことが可能であり、例えば、糖部分の 100% が修飾されている (例えば、25mer のアンチセンスオリゴマーは、本明細書で記載される修飾のうちの 1 つまたはこれらの任意の組合せで修飾された、25 の糖部分を含む)。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、その糖部分の約 100% ~ 2.5% が修飾されたものを含みうる。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、その糖部分のうちの約 99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、または 2.5%、およびその間の整数の%が修飾されたものを含みうる。他の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、本明細書で記載される修飾の任意の組合せを含みうる。

【0123】

多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、実質的に非荷電であり、任意選択で、細胞膜を横切る、能動的な輸送または促進された輸送のための基質として適する。一部の実施形態では、全てのヌクレオシド間連結は、非荷電である。オリゴマーが、標的プレ mRNA と共に、安定的な二重鎖を形成する能力はまた、標的との関連における、アンチセンスオリゴマーの相補性の長さおよび程度、G : C 塩基マッチの、A : T 塩基マッチに対する比、ならびに任意のミスマッチ塩基の位置を含む、オリゴマーの他の特色にも関しうる。アンチセンスオリゴマーが、細胞ヌクレアーゼに抵抗する能力は、薬剤の存続および細胞質への最終的な送達を促進しうる。

【0124】

多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、生理学的 pH で正に荷電しているか、またはカチオン性である、少なくとも 1 つのヌクレオシド間連結を有する。さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約 5.5 ~ 約 12 の間の pKa を呈示する、少なくとも 1 つのヌクレオシド間連結を有する。さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、もしくは 10 のヌクレオシド間連結、少なくともほぼこれらの数のヌクレオシド間連結、またはほぼこれらの数を超えないヌクレオシド間連結であって、約 4.5 ~ 約 12 の間の pKa を呈示するヌクレオシド間連結を含有する。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは 100% のヌクレオシド間連結、または少なくともほぼこれらの比率のヌクレオシド間連結であって、約 4.5 ~ 約 12 の間の pKa を呈示するヌクレオシド間連結を含有する。任意選択で、アンチセンスオリゴマーは、塩基性の窒素と、アルキル基、アリール基、またはアラキル基との両方を伴う、少なくとも 1 つのヌクレオシド間連結を有する。特定の実施形態では、1 または複数のカチオン性ヌクレオシド間連結は、4 - アミノピペリジン - 1 - イル (APN) 基またはその誘導体を含む。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、モルホリン環を含む。理論に束縛されるわけではないが、オリゴマー内の、1 または複数のカチオン性連結 (例えば、APN 基または APN 誘導体) の存在は、標的ヌクレオチド内の、負に荷電したホスフェートへの結合を促進することが考えられる。こうして、変異体 RNA と、カチオン性連結を含有するオリゴマーとの間のヘテロ二重鎖の形成は、イオン性引力およびワトソン - クリック塩基対合の両方により一体に保持されうる。

【0125】

多様な実施形態では、カチオン性連結の数は、少なくとも 2 つであり、全ヌクレオシド

10

20

30

40

50

間連結の約半分を超えず、例えば、約 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 のカチオン性連結、またはほぼこれらを超えないカチオン性連結である。一部の実施形態では、しかし、ヌクレオシド間連結のうちの、最大で全ては、カチオン性連結であり、例えば、全ヌクレオシド間連結のうちの約 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、もしくは 40、または少なくともほぼこれらの数は、カチオン性連結である。さらなる実施形態では、約 19 ~ 20 単量体サブユニットのオリゴマーは、2 つ ~ 10、例えば、4 ~ 8 つのカチオン性連結と、残りの非荷電連結とを有しうる。他の具体的な実施形態では、14 ~ 15 サブユニットのオリゴマーは、2 ~ 7 つ、例えば、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、または 7 つのカチオン性連結と、残りの非荷電連結とを有しうる。こうして、オリゴマー内のカチオン性連結の総数は、約 1 ~ 10 ~ 15 ~ 20 ~ 30 またはこれを超えて（間の全ての整数を含む）変動することが可能であり、オリゴマー全体にわたり散在しうる。

10

【0126】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、10 の非荷電連結ごとに約 4 つ ~ 5 つまたは 4 つもしくは 5 つなど、2 つ ~ 5 つまたは 2 つ、3 つ、4 つ、もしくは 5 つの非荷電連結ごとに約 1 つのカチオン性連結または最大で約 1 つのカチオン性連結を有しうる。

20

【0127】

ある特定の実施形態は、約 10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、または 100 % のカチオン性連結を含有するアンチセンスオリゴマーを含む。ある特定の実施形態では、アンチセンス活性の最適な改善は、ヌクレオシド間連結のうちの約 25 % がカチオン性である場合に見ることができる。ある特定の実施形態では、増強は、少数（例えば、10 ~ 20 %）のカチオン性連結に関して見ることでもでき、カチオン性連結の数が、約 60 % など、50 ~ 80 % の範囲内にある場合に見ることでもできる。

【0128】

さらなる実施形態では、カチオン性連結を、ヌクレオシド間連結に沿って散在させる。このようなオリゴマーは任意選択で、少なくとも 2 つの連続非荷電連結を含有する；すなわち、オリゴマーは任意選択で、その全長に沿って、厳密に交互のパターンを有さない。具体的な場合では、各 1 つまたは 2 つのカチオン性連結は、ヌクレオシド間連結に沿って、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、もしくは 5 つの非荷電連結により隔てられる。

30

【0129】

また、カチオン性連結のブロックと、非荷電連結のブロックとを有するオリゴマーも含まれる。例えば、中央の非荷電連結のブロックが、カチオン性連結のブロックに挟まれる場合もあり、この逆の場合もある。一部の実施形態では、オリゴマーは、ほぼ等長の 5' 領域、3' 領域、および中央領域を有し、中央領域内のカチオン性連結の百分率は、カチオン性連結の総数のうちの、約 50 %、60 %、70 %、または 80 % を超える。

40

【0130】

ある特定のアンチセンスオリゴマーでは、カチオン性連結のバルク（例えば、カチオン性連結のうちの 70 %、75 %、80 %、90 %）は、ヌクレオシド間連結の「中央領域」、例えば、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、10、11、12、13、14、または 15 の真ん中の連結（centermost linkage）に近接して分布する。例えば、16、17、18、19、20、21、22、23、または 24 mer のオリゴマーは、全カチオン性連結のうちの、少なくとも 50 %、60 %、70 %、または 80 % を、8 つ、9 つ、10、11、または 12 の真ん中の連結へと局在化させうる。

【0131】

B．化学の特色

50

アンチセンスオリゴマーは、様々なヌクレオチド類似体サブユニットを含有しうる。さらなる例は、

ホスホルアミデート (phosphoroamidate) を含有するオリゴマー、
 ホスホロジアミデートを含有するオリゴマー、
 ホスホロチオエート含有するオリゴマー、

モルホリノ含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結またはホスホロジアミデートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

2' O - メチル含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

ロケット核酸 (LNA) を含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

2' O - メトキシエチル (MOE) を含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

2' - フルオロ含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

2' O, 4' C - エチレン架橋核酸 (ENA) を含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

トリシクロDNA (tc-DNA) を含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

2' - O - [2 - (N - メチルカルバモイル) エチル] を含有するオリゴマーであって、任意選択で、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結で置換されたオリゴマー、

モルホリノ含有するオリゴマーであって、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結をさらに含み、ホスホロジアミデートのリン原子を、モルホリン環の窒素原子に共有結合させ、かつ、(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、または置換(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル (PMO プラス) 部分に共有結合させたオリゴマー、

モルホリノ含有するオリゴマーであって、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結をさらに含み、ホスホロジアミデートのリン原子を、モルホリン環の窒素原子に共有結合させ、かつ、4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分 (すなわち、APN) または置換4 - アミノピペリジン - 1 - イル (PMO - X) 部分に共有結合させたオリゴマー、

リボース糖含有するオリゴマーであって、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結またはホスホルアミデートヌクレオシド間連結をさらに含むオリゴマー、

デオキシリボース糖含有するオリゴマーであってホスホロチオエートヌクレオシド間連結オリゴマーまたはホスホルアミデートヌクレオシド間連結をさらに含むオリゴマー、

任意選択でさらに置換された、ペプチドコンジュゲートホスホロジアミデートモルホリノ含有オリゴマー (PPMO)、

さらなる置換を含む、任意選択でさらに置換された、ペプチド核酸 (PNA) オリゴマー、

および前出のうちのいずれかの組合せを含む。

【0132】

ある特定の実施形態では、ホスホロジアミデート連結のリン原子を、(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、置換(1, 4 - ピペラジン) - 1 - イル部分、4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分、または置換4 - アミノピペリジン - 1 - イル部分で、さらに置換する。

【0133】

一般に、PNA 化学および LNA 化学は、PMO および 2' O - Me オリゴマーと比べた、それらの比較的高度な標的結合強度のために、より短いターゲティング配列を活用しうる。ホスホロチオエート化学と、2' O - Me 化学とを組み合わせると、2' O - Me - ホスホロチオエート類似体を作出することができる。例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、PCT 公開第 WO / 2013 / 112053 号および同第 WO / 2009 / 008725 号を参照されたい。

【 0 1 3 4 】

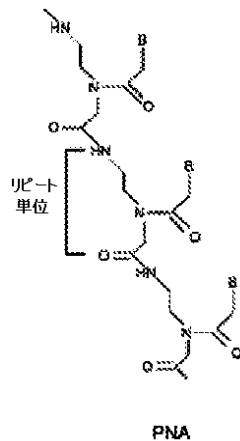
場合によって、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（PMO）などのアンチセンスオリゴマーを、細胞透過性ペプチド（CPP）にコンジュゲートさせて、細胞内送達を促進することができる。ペプチドコンジュゲートPMOは、PPMOと呼ばれ、ある特定の実施形態は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO/2012/150960号において記載されているPPMOを含む。一部の実施形態では、例えば、本明細書で記載されるアンチセンスオリゴマーの3'末端にコンジュゲートまたは連結させた、アルギニンに富むペプチド配列を使用することができる。

【 0 1 3 5 】

1. ペプチド核酸（PNA）

ペプチド核酸（PNA）とは、骨格が、デオキシリボース骨格と構造的に同形である、DNAの類似体であって、ピリミジン塩基またはプリン塩基を結合させた、N-（2-アミノエチル）グリシン単位からなる類似体である。天然のピリミジン塩基およびプリン塩基を含有するPNAは、ワトソン-クリック塩基対合則に従う相補的オリゴマーとハイブリダイズし、塩基対認識の点で、DNAを模倣する（Egholm、Buchardtら、1993年）。PNAのヌクレオシド間連結は、ホスホジエステル結合ではなく、ペプチド結合により形成されることから、アンチセンス適用（下記の構造を参照されたい）に良好に適する。骨格が非荷電である結果として、通常を超える熱安定性を呈示する、PNA/DNA二重鎖またはPNA/RNA二重鎖がもたらされる。PNAは、ヌクレアーゼによっても、プロテアーゼによっても認識されない。PNAサブユニットを含むPNAオリゴマーの非限定的な例を、下記：

【 化 1 6 】



に描示する。

【 0 1 3 6 】

天然構造に対する大幅な構造変化にもかかわらず、PNAは、ヘリックス形態による、DNAまたはRNAへの配列特異的結合が可能である。PNAの特徴は、相補的なDNAまたはRNAに対する高結合アフィニティー、単一塩基ミスマッチにより引き起こされる不安定化効果、ヌクレアーゼおよびプロテアーゼに対する耐性、塩濃度に依存しない、DNAまたはRNAとのハイブリダイゼーション、およびホモプリンDNAとの三重鎖形成を含む。PANAGENE（Daeyeon、Korea）は、Bts PNA単量体（Bts；ベンゾチアゾール-2-スルホニル基）と、オリゴマー化工程とを開発している。Bts PNA単量体を使用する、PNAのオリゴマー化は、脱保護、カップリング、およびキャッピングの反復的サイクルから構成される。PNAは、当技術分野で公知の任意の技法を使用して、合成により作製することができる。例えば、米国特許第6,969,766号、同第7,211,668号、同第7,022,851号、同第7,125,994号、同第7,145,006号、および同第7,179,896号を参照されたい。PNAの調製についてはまた、米国特許第5,539,082号；同第5,714,331号；および同第5,719,262号も参照されたい。PNA化合物についてのさら

なる教示は、Nielsenら、Science、254巻：1497～1500頁、1991年においても見出すことができる。前出の各々は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。

【0137】

2. ロックト核酸 (LNA)

アンチセンスオリゴマー化合物はまた、「ロックト核酸」サブユニット (LNA) も含有しうる。「LNA」とは、架橋核酸 (BNA) と呼ばれる修飾のクラスのメンバーである。BNAは、リボース環のコンフォメーションを、C3'-エンド (ノーザン) 糖パッカー (sugar pucker) にロックする共有結合的連結を特徴とする。LNAでは、架橋は、2'-O位と4'-C位との間のメチレンから構成される。LNAは、骨格の事前組織化 (preorganization) および塩基スタッキングを増強して、ハイブリダイゼーションおよび熱安定性を増加させる。

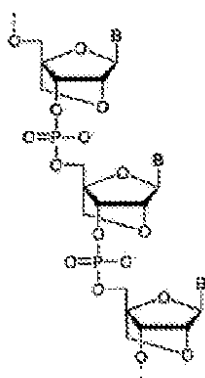
10

【0138】

LNAの構造は、例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、Wengelら、Chemical Communications (1998年)、455巻；Tetrahedron (1998年)、54巻：3607頁、およびAccounts of Chem. Research (1999年)、32巻：301頁；Obikaら、Tetrahedron Letters (1997年)、38巻：8735頁；(1998年)、39巻：5401頁、ならびにBioorganic Medicinal Chemistry (2008年)、16巻：9230頁において見出すことができる。LNAサブユニットと、ホスホジエステルヌクレオシド間連結とを含む、LNAオリゴマーの非限定的な例を、下記：

20

【化17】



LNA

30

に描示する。

【0139】

本開示の化合物には、1または複数のLNAを組み込むことができ、場合によって、化合物を、LNAから完全に構成することもできる。個別のLNAヌクレオシドサブユニットの合成およびオリゴマーへのそれらの組込みのための方法については、例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第7,572,582号、同第7,569,575号、同第7,084,125号、同第7,060,809号、同第7,053,207号、同第7,034,133号、同第6,794,499号、および同第6,670,461号において記載されている。典型的なヌクレオシド間リンカーは、ホスホジエステル部分およびホスホロチオエート部分を含み、代替的に、リン非含有リンカーを使用することもできる。さらなる実施形態は、LNA含有化合物を含み、各LNAサブユニットは、DNAサブユニットで隔てられている。ある特定の化合物は、交互のLNAサブユニットおよびDNAサブユニットから構成され、ヌクレオシド間リンカーは、ホスホロチオエートである。

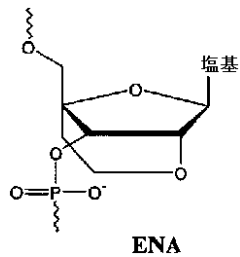
40

【0140】

50

2' O, 4' C - エチレン架橋核酸 (ENA) は、BNA クラスの別のメンバーである。ENA サブユニットおよびホスホジエステルヌクレオシド間連結の非限定的な例を、下記：

【化 18】



10

に描示する。

【0141】

ENA オリゴマーおよびそれらの調製については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Obika ら、Tetrahedron Lett、38 巻 (50 号) : 8735 頁において記載されている。本開示の化合物には、1 または複数の ENA サブユニットを組み込むことができる。

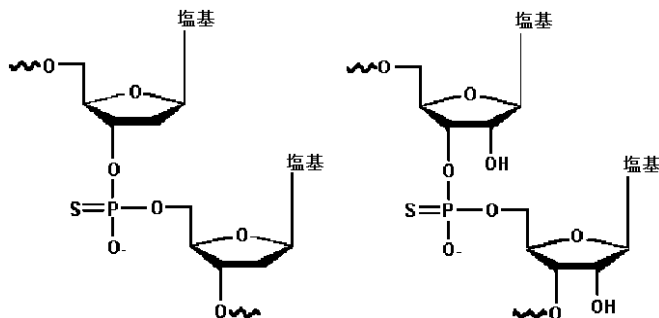
【0142】

3. ホスホロチオエート

「ホスホロチオエート」(または S - オリゴ) とは、生来 DNA または生来 RNA の改変体であって、ホスホジエステルヌクレオシド間連結の非架橋酸素のうちの 1 つを、硫黄で置きかえた改変体である。デオキシリボースサブユニットと、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結とを含む、ホスホロチオエート DNA (左)、および、リボースサブユニットと、ホスホロチオエート (phosphorothioate) ヌクレオシド間連結とを含む、ホスホロチオエート RNA (右) の非限定的な例を、下記：

20

【化 19】



30

に描示する。

【0143】

ヌクレオシド間結合の硫黄化 (sulfurization) は、5' - 3' および 3' - 5' DNA POL 1 エクソヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ S1 および P1、RNA ーゼ、血清ヌクレアーゼ、ならびにヘビ毒ホスホジエステラーゼを含む、エンドヌクレアーゼおよびエクソヌクレアーゼの作用を低減する。ホスホロチオエートは、2 つの主要な経路：ホスホン酸水素上の炭素ジスルフィド内の硫黄元素の溶解作用、または亜リン酸トリエステルを、テトラエチルチウラムジスルフィド (TETD) もしくは 3H - 1, 2 - ベンジチオール - 3 - オン 1, 1 - ジオキシド (3H-1,2-bensodithiol-3-one 1,1-dioxide; BDTD) で硫黄化する方法 (例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、Iyer ら、J. Org. Chem. 55 巻、4693 ~ 4699 頁、1990 年を参照されたい) により作製し得る。後者の方法は、大半の有機溶媒中の硫黄元素の不溶性および炭素ジスルフィドの毒性の問題を回避する。TETD 法および BDTD 法はまた、高純度のホスホロチオエートももたらす。

40

【0144】

50

4. トリシクロDNAおよびトリシクロホスホロチオエートヌクレオチド

トリシクロDNA (tc-DNA) とは、各ヌクレオチドを、シクロプロパン環の導入により修飾して、骨格のコンフォメーション可撓性を制約し、ねじれ角の骨格形状を最適化した、拘束DNA類似体のクラスである。ホモ塩基性のアデニン含有tc-DNAおよびチミン含有tc-DNAは、相補的なRNAと共に、極めて安定的なA-T塩基対を形成する。トリシクロDNAおよびそれらの合成については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2010/115993号において記載されている。本開示の化合物には、1または複数のトリシクロDNAサブユニットを組み込むことができ、場合によって、化合物は、トリシクロDNAサブユニットから完全に構成されうる。

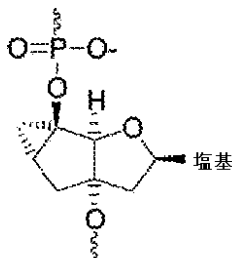
10

【0145】

トリシクロホスホロチオエートヌクレオチドとは、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結を伴うトリシクロDNAサブユニットである。トリシクロホスホロチオエートヌクレオチドおよびそれらの合成については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2013/053928号において記載されている。本開示の化合物には、1または複数のトリシクロDNAサブユニットを組み込むことができ、場合によって、化合物は、トリシクロDNAヌクレオチドから完全に構成されうる。トリシクロDNA/三環系 (tricyclic) サブユニットおよびホスホジエステルヌクレオシド間連結の非限定的な例を、下記：

【化20】

20



トリシクロ-DNA

に描示する。

【0146】

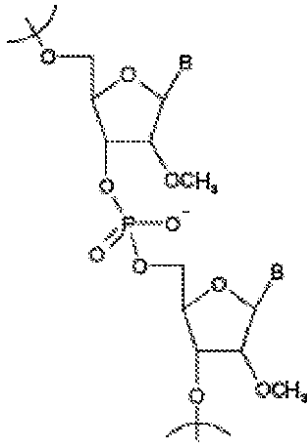
30

5. 2'-O-メチルオリゴマー、2'-O-MOEオリゴマー、および2'-Fオリゴマー

「2'-O-Meオリゴマー」分子は、リボース分子の2'-OH残基において、メチル基を保有するサブユニットを含む。2'-O-Me-RNAは、DNAと同じ（または類似の）挙動を示すが、ヌクレアーゼによる分解に対して保護されている。2'-O-Me-RNAはまた、さらなる安定化のために、ホスホロチオエートオリゴマー (PTO) と組み合わせることもできる。2'-O-Meオリゴマー (2'-OMeサブユニットが、ホスホジエステルヌクレオシド間連結またはホスホロチオエートヌクレオシド間連結により接続されている) は、当技術分野における慣例的な技法（例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Yooら、Nucleic Acids Res., 32巻：2008～16頁、2004年を参照されたい）に従い、合成することができる。2'-OMeサブユニットおよびホスホジエステルサブユニット間連結を含む2'-O-Meオリゴマーの非限定的な例を、下記：

40

【化 2 1】



10

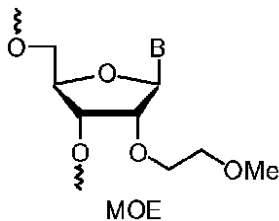
に描示する。

【0147】

2'-O-Meオリゴマーはまた、ホスホロチオエート連結(2'-O-Meホスホロチオエートオリゴマー)も含みうる。2'-O-Meオリゴマーなどの2'-O-メトキシエチルオリゴマー(2'-O-MOE)は、リボース分子の2'-OH残基において、メトキシエチル基を保有するサブユニットを含み、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Martinら、Helv. Chim. Acta、78巻、486~504頁、1995年において論じられている。2'-O-MOEサブユニットの非限定的な例を、下記：

20

【化 2 2】



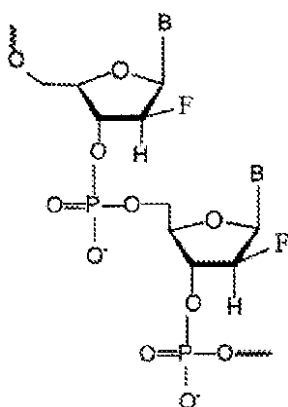
に描示する。

30

【0148】

前出のアルキル化2'-OHリボース誘導体と対照的に、2'-フルオロオリゴマーは、2'位において、2'-OHの代わりにフルオロラジカルを有するサブユニットを含む。2'-Fサブユニットおよびホスホジエステルヌクレオシド間連結を含む2'-Fオリゴマーの非限定的な例を、下記：

【化 2 3】



40

に描示する。

【0149】

2'-フルオロオリゴマーについては、参照によりその全体において本明細書に組み込

50

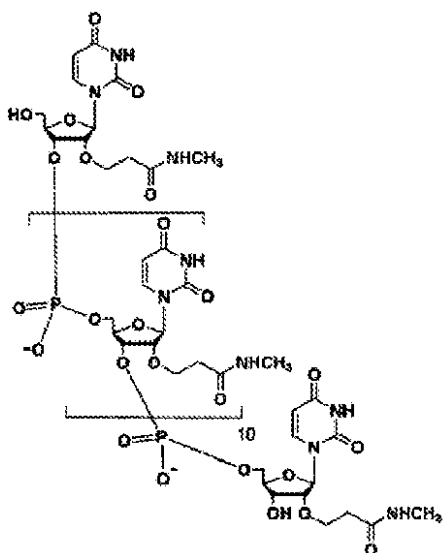
まれる、WO 2 0 0 4 / 0 4 3 9 7 7 においてさらに記載されている。本開示の化合物には、1または複数の2' O - メチルサブユニット、2' O - MOEサブユニット、および2' - Fサブユニットを組み込むことができ、本明細書で記載されるヌクレオシド間連結のうちのいずれかを活用することができる。場合によって、本開示の化合物は、2' O - メチル、2' O - MOE、または2' - Fサブユニットから完全に構成しうると予想される。本開示の化合物についての一実施形態は、2' O - メチルサブユニットから完全に構成される。

【 0 1 5 0 】

6. 2' - O - [2 - (N - メチルカルバモイル) エチル] オリゴマー (M C E)

M C E は、本開示の化合物中で有用な、2' O 修飾リボヌクレオシドの別の例である。この例では、2' O H を、2 - (N - メチルカルバモイル) エチル部分へと誘導体化して、ヌクレアーゼ耐性を増加させる。M C E サブユニットおよびホスホジエステルヌクレオシド間連結を含むM C E オリゴマーの非限定的な例を、下記：

【 化 2 4 】



に描示する。

【 0 1 5 1 】

M C E およびそれらの合成については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Yamadaら、J. Org. Chem.、76巻(9号)：3042～53頁において記載されている。本開示の化合物には、1または複数のM C E サブユニットを組み込むことができる。

【 0 1 5 2 】

7. モルホリノベースのオリゴマー

モルホリノベースのオリゴマーとは、ヌクレオ塩基を支持するモルホリノサブユニットを含むオリゴマーを指し、リボースの代わりに、モルホリン環を含有する。例示的なヌクレオシド間連結は、例えば、1つのモルホリノサブユニットのモルホリン環窒素を、隣接するモルホリノサブユニットの4' 環外炭素に接合する、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結またはホスホロジアミデートヌクレオシド間連結を含む。各モルホリノサブユニットは、塩基特異的水素結合により、オリゴヌクレオチド内の塩基に結合するのに有効な、プリンまたはピリミジンのヌクレオ塩基を含む。

【 0 1 5 3 】

モルホリノベースのオリゴマー(アンチセンスオリゴマーを含む)については、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第5,698,685号；同第5,217,866号；同第5,142,047号；同第5,034,506号；同第5,166,315号；同第5,185,444号；同第5,521,063号；同第5,506,337号；ならびに係属中の米国特許出願第12/271,036号；同第

10

20

30

40

50

12/271,040号;およびPCT公開第WO/2009/064471号および同第WO/2012/043730号;ならびにSummertonら、1997年、「Antisense and Nucleic Acid Drug Development」、7巻、187~195頁において詳述されている。

【0154】

オリゴマー構造内で、リン酸基は一般に、オリゴマーの「ヌクレオシド間連結」を形成する基として言及される。RNAおよびDNAの天然に存在するヌクレオシド間連結は、3'-5'ホスホジエステル連結である。「ホスホルアミデート」基が、3つの結合酸素原子と、1つの結合窒素原子とを有するリンを含むのに対し、「ホスホロジアミデート」基は、2つの結合酸素原子と、2つの結合窒素原子とを有するリンを含む。本明細書で記載されるモルホリノベースのオリゴマーの非荷電ヌクレオシド間連結またはカチオン性ヌクレオシド間連結では、1つの窒素は常に、連結鎖に対してペンダントであるものである。ホスホロジアミデート連結における第2の窒素は、モルホリン環構造内の環窒素であることが典型的である。

10

【0155】

「PMO-X」とは、(i)モルホリン環の窒素原子への共有結合、および(ii)例えば、4-アミノピペリジン-1-イル(すなわち、APN)または4-アミノピペリジン-1-イルの誘導体の環窒素への第2の共有結合を伴うリン原子を有するホスホロジアミデートモルホリノベースのオリゴマーを指す。例示的なPMO-Xオリゴマーについては、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、PCT出願第PCT/US2011/38459号およびPCT公開第WO2013/074834号において開示されている。PMO-Xは、リン原子を、モルホリノ基、および4-アミノピペリジン-1-イル(すなわち、APN)の環窒素へと連結する、少なくとも1つのヌクレオシド間連結を含む、PMO-Xオリゴマーを指す、「PMO-apn」または「APN」を含む。具体的な実施形態では、表2に明示されたターゲティング配列を含むアンチセンスオリゴマーは、少なくとも1つのAPNを含有する連結またはAPN誘導体を含有する連結を含む。多様な実施形態は、モルホリノベースのオリゴマーであって、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の、APN/APN誘導体を含有する連結を有し、残りの連結(100%未満である場合)が、非荷電連結であり、例えば、全ヌクレオシド間連結のうちの約1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40、または少なくともほぼこれらの数が、APN/APN誘導体を含有する連結であるオリゴマーを含む。

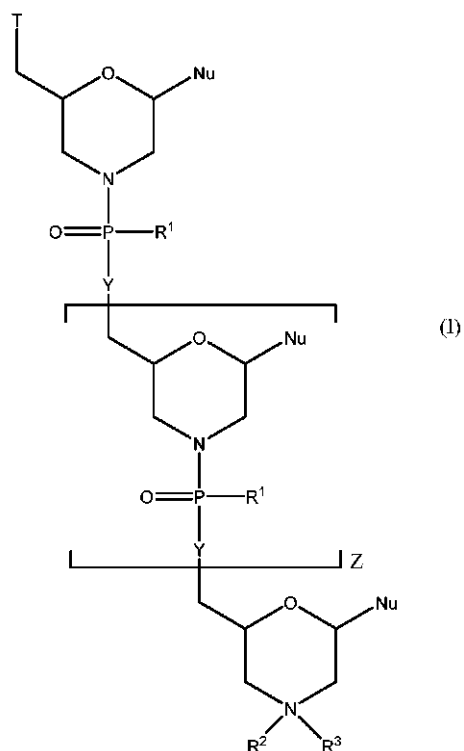
20

30

【0156】

多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、式(I)：

【化 2 5】



10

20

の化合物または薬学的に許容されるその塩〔式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

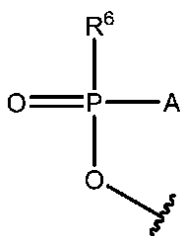
Z は、10～38の整数であり；

各 Y は、O および $-NR^4$ から独立に選択され、式中、各 R^4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アラルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ 、および G から独立に選択され、式中、 R^5 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、n は、1～5の整数であり；

T は、OH および式：

30

【化 2 6】



の部分から選択され、式中、

A は、 $-OH$ 、 $-N(R^7)_2R^8$ 、および R^1 から選択され、式中、

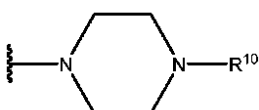
40

各 R^7 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、そして

R^6 は、OH、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ 、および式：

【化 2 7】



の部分から選択され、式中、

R^9 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

50

R^{10} は、G、 $-C(O)-R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

m は、1～5の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、 y は、3～10の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

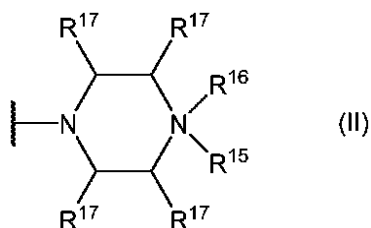
R^{12} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^{13} の各例は、

$-N(R^{13})_2R^{14}$ [式中、各 R^{13} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、そして R^{14} は、電子対およびHから選択される] ；

式 (II) :

【化28】



の部分 [式中、

R^{15} は、H、G、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_qNR^{18}C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{18}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

R^{18} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

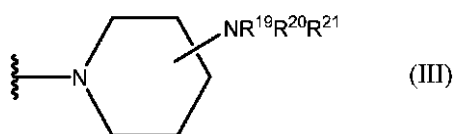
q は、1～5の整数であり；

R^{16} は、電子対およびHから選択され；そして

各 R^{17} は、Hおよびメチルから独立に選択される] ；および

式 (III) :

【化29】



の部分 [式中、

R^{19} は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_rNR^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{22}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_4NH_2$ 、および G から選択され、式中、

R^{22} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

r は、1～5の整数であり、

R^{20} は、Hおよび $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、そして

R^{21} は、電子対およびHから選択される]

から独立に選択され；

R^{22} は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)-R^{23}$ 、 $-C(O)(CH_2)_sNR^{24}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{24}C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)CH(NH_2)(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、および式：

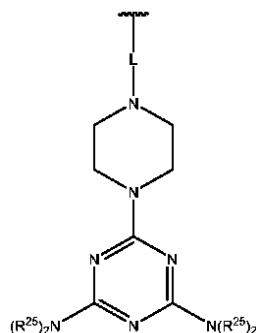
10

20

30

40

【化 3 0】



10

の部分から選択され、式中、

R^{23} は、式 $-(O-アルキル)_v-OH$ を有し、式中、 v は、3 ~ 10 の整数であり、 v 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{24} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

s は、1 ~ 5 の整数であり；

L は、 $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$ および $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$ から選択され；

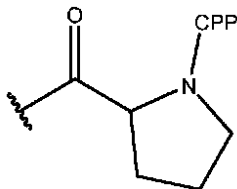
各 R^{25} は、式 $-(CH_2)_2OC(O)N(R^{26})_2$ を有し、式中、各 R^{26} は、式 $-(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$ を有し、そして

R^3 は、電子対、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

20

ここで、 G は、 $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、および $-C(O)CH_2NH-CPP$ から選択される細胞透過性ペプチド（「CPP」）およびリンカー部分であるか、または G は、式：

【化 3 1】



30

を有し、式中、CPP は、 G の最大で 1 つの例が存在するという条件で、CPP のカルボキシ末端において、アミド結合により、リンカー部分に結合している」である。

【0157】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン80/イントロン80（例えば、配列番号1）内のスプライス接合部領域の少なくとも一部と相補的である、またはそれにわたっている。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロン接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的であり、前記エクソン/イントロンスプライス接合部は、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部を含む。多様な実施形態では、連続ヌクレオチドは、エクソン/イントロンスプライス接合部を含む。

40

【0158】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号2、3、4、もしくは6の1つを含むか、配列番号2、3、4、もしくは6から選択されるか、配列番号2、3、4、もしくは6の少なくとも1つから選択される配列のうちの少なくとも12連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号2、3、4、もしくは6の少なくとも1つから選択される配列に対する、少なくとも90%の配列同一性を有する改変体（variant）であり、配列中、 X は、ウラシル（U）またはチミン（T）から選択され、 I は、イノシンである。

50

一部の実施形態では、式 (I) のターゲティング配列は、

- 10

一部の実施形態では、 R^3 は、式：

*L1CCN(C1)c2nc(N(R25))nc(N(R25))n2

20

各 $R^{2.5}$ は、式 - $(CH_2)_2OC(O)N(R^{2.6})_2$ を有し、式中、各 $R^{2.6}$ は、
式 - $(CH_2)_6NHC(=NH)NH_2$ を有する]

30

ある特定の実施形態では、 R^3 は、下記：

CN(C)CC(=O)Nc1nc2nc(N3CCN(C)CC3)nc2nc1OCCOCCN

40

で描示されるいずれかの部分を含みうる。

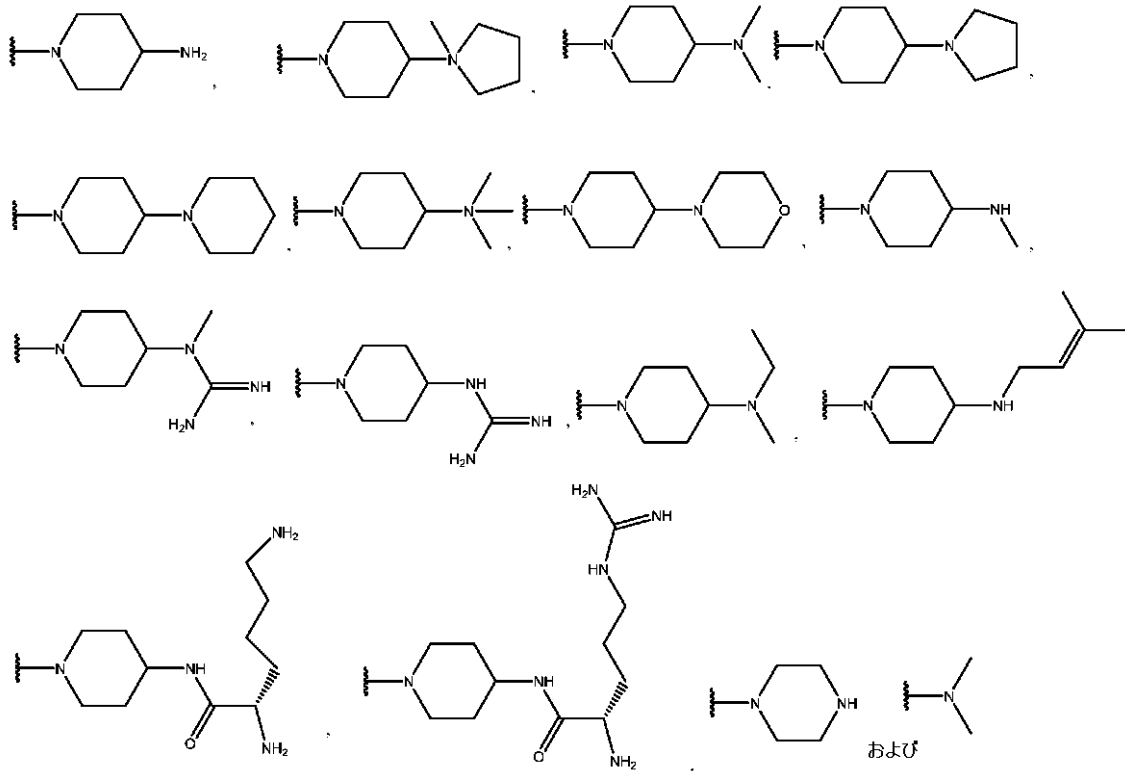
多様な実施形態では、Yは、Oであり、R²は、HまたはGから選択され、R³は、電子対またはHから選択される。一部の実施形態では、R²は、Gであり、C P Pは、配列番号9～24から選択される配列を有する。ある特定の実施形態では、R²は、Hである。

50

【 0 1 6 4 】

本開示の一部の実施形態では、 R^1 は、

【化 3 4】



10

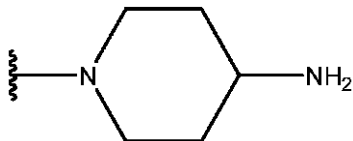
20

から選択することができる。

【 0 1 6 5 】

一部の実施形態では、少なくとも1つの R^1 は、

【化 3 5】



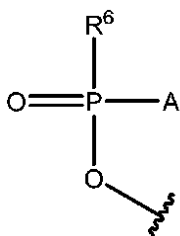
30

である。

【 0 1 6 6 】

ある特定の実施形態では、 T は、式：

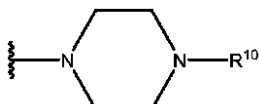
【化 3 6】



40

[式中、 A は、 $-N(CH_3)_2$ であり、 R^6 は、式：

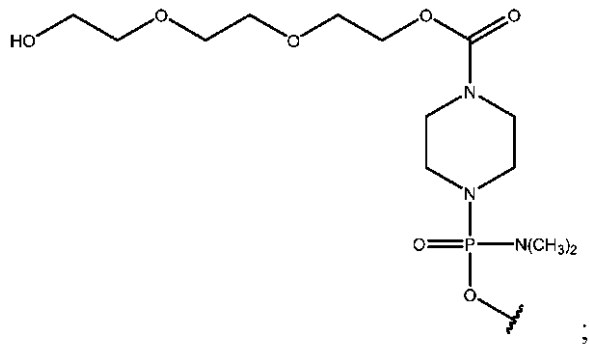
【化 3 7】

を有し、式中、 R^{10} は、 $-C(O)R^{11}OH$ である]
を有する。

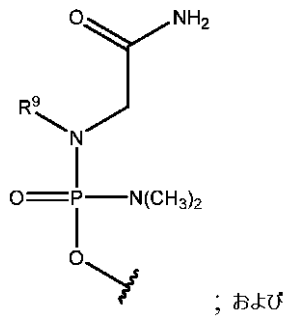
50

【 0 1 6 7 】

一部の実施形態では、Yは、Oであり、Tは、
【化38】



10



20



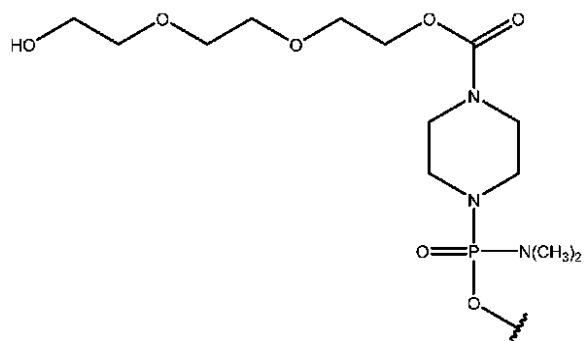
から選択される。

【 0 1 6 8 】

ある特定の実施形態では、Tは、式：

30

【化39】



40

を有する。

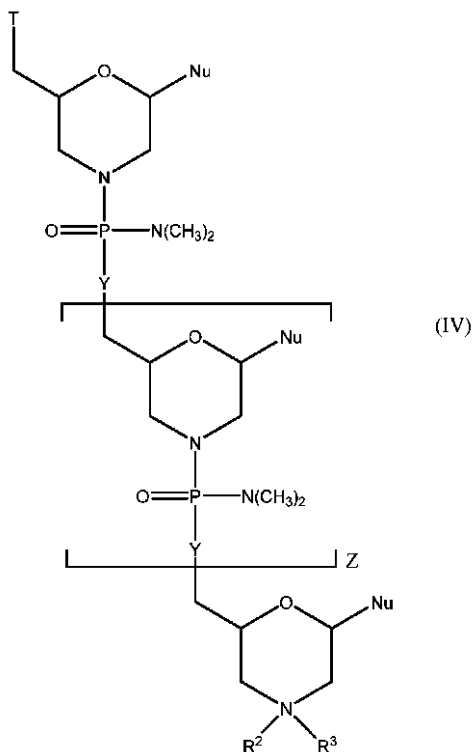
【 0 1 6 9 】

多様な実施形態では、Yは、Oであり、R²は、HまたはGから選択され、R³は、電子対またはHから選択される。一部の実施形態では、R²は、Gであり、C P Pは、下記に記載される、配列番号9～24から選択される配列を有する。

【 0 1 7 0 】

他の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、式(IV)：

【化 4 0】



10

20

の化合物または薬学的に許容されるその塩〔式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

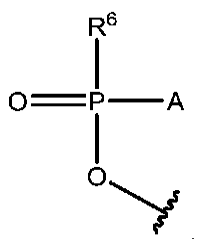
Z は、10～38の整数であり；

各 Y は、O および $-NR^4$ から独立に選択され、式中、各 R^4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アラルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ 、および G から独立に選択され、式中、 R^5 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、n は、1～5の整数であり；

T は、OH および式：

30

【化 4 1】



の部分から選択され、式中、

A は、 $-OH$ および $-N(R^7)_2R^8$ から選択され、式中、

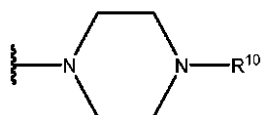
40

各 R^7 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、そして

R^6 は、OH、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ 、および式：

【化 4 2】



の部分から選択され、式中、

R^9 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

50

R^{10} は、G、 $-C(O)-R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

m は、1 ~ 5 の整数であり、

R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、 y は、3 ~ 10 の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{12} は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

R^2 は、H、G、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)-R^{23}$ から選択され、そして

R^3 は、電子対、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される]
である。

【0171】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン80/イントロン80（例えば、配列番号1）内のスプライス接合部領域の少なくとも一部と相補的である、またはそれにわたる。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的であり、前記エクソン/イントロンスプライス接合部は、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部を含む。多様な実施形態では、連続ヌクレオチドは、エクソン/イントロンスプライス接合部を含む。

【0172】

多様な実施形態では、化合物(IV)のターゲティング配列は、配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列を含むか、配列番号2、3、4、もしくは6から選択されるか、配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列のうちの少なくとも12連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列に対する、少なくとも90%の配列同一性を有する改変体であり、配列中、Xは、ウラシル(U)またはチミン(T)から選択され、Iは、イノシンである。

一部の実施形態では、式(IV)のターゲティング配列は、

a) 配列番号2 (X X G G G X A C X C A C C A C X G G G C C A) [Zは、22である]
]

b) 配列番号3 (G X X C X X G G G X A C X C A C C A C X G G) [Zは、22である]
]

c) 配列番号4 (A A G G X X C X X G G G X A C X C A C C A C) [Zは、22である]
]

d) 配列番号6 (G G X A C X C A C C A C X G G G C C A G I G) [Zは、22である]
]

から選択され、Xは、ウラシル(U)またはチミン(T)から選択され、Iは、イノシンである。

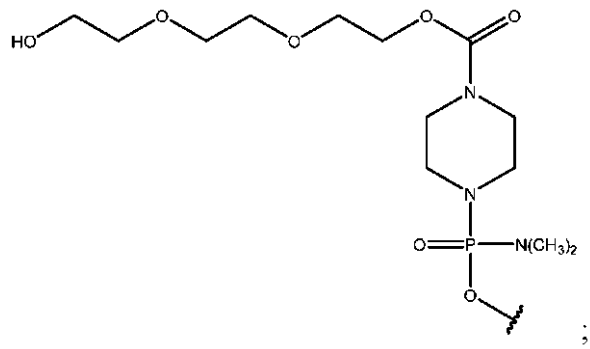
【0173】

多様な実施形態では、Yは、Oであり、 R^2 は、HまたはGから選択され、 R^3 は、電子対またはHから選択される。一部の実施形態では、 R^2 は、Gであり、CPPは、配列番号9 ~ 24から選択される配列を有する。ある特定の実施形態では、 R^2 は、Hである。

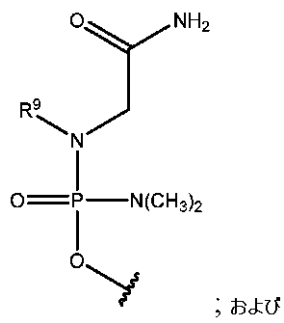
【0174】

一部の実施形態では、Yは、Oであり、Tは、

【化 4 3】



10



20

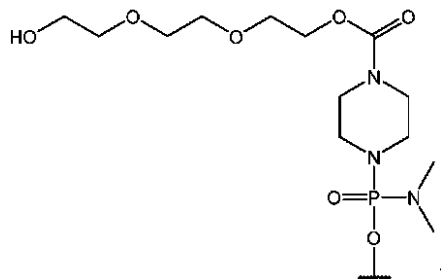


から選択される。

【 0 1 7 5】

一部の実施形態では、Tは、式：

【化 4 4】



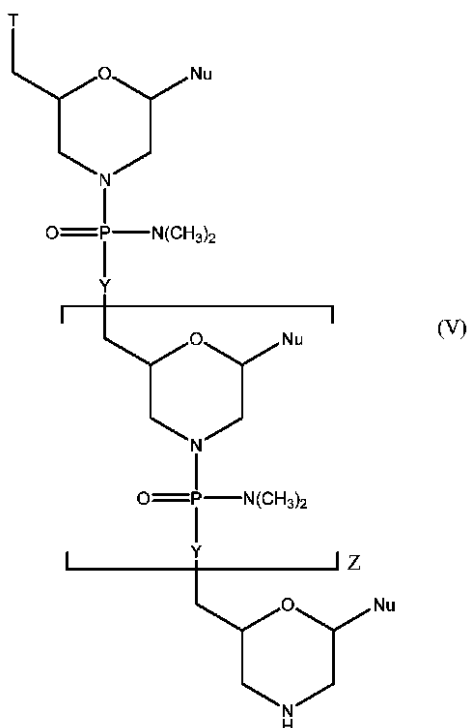
30

を有し、 R^2 は、水素であり、 R^3 は、電子対である。

【 0 1 7 6】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、式(V)：

【化 4 5】



10

20

の化合物または薬学的に許容されるその塩〔式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

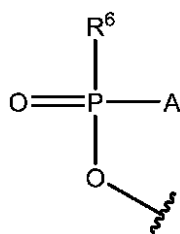
Z は、10～38の整数であり；

各 Y は、O および $-NR^4$ から独立に選択され、式中、各 R^4 は、H、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、アラルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_nNR^5C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^5C(=NH)NH_2$ 、および G から独立に選択され、式中、 R^5 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、n は、1～5の整数であり；

T は、OH および式：

30

【化 4 6】



の部分から選択され、式中、

A は、 $-OH$ および $-N(R^7)_2R^8$ から選択され、式中、

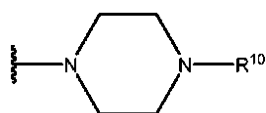
40

各 R^7 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され、

R^8 は、電子対および H から選択され、そして

R^6 は、OH、 $-N(R^9)CH_2C(O)NH_2$ 、および式：

【化 4 7】



の部分から選択され、式中、

R^9 は、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

50

R^{10} は、 G 、 $-C(O)-R^{11}OH$ 、アシル、トリチル、4-メトキシトリチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-C(O)(CH_2)_mNR^{12}C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NR^{12}C(=NH)NH_2$ から選択され、式中、

m は、1 ~ 5 の整数であり、

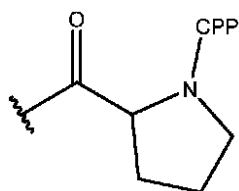
R^{11} は、式 $-(O-アルキル)_y-$ を有し、式中、 y は、3 ~ 10 の整数であり、

y 個のアルキル基の各々は、 $C_2 \sim C_6$ アルキルから独立に選択され；

R^{12} は、 H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され；

ここで、 G は、 $-C(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NH-CPP$ 、 $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-CPP$ 、および $-C(O)CH_2NH-CPP$ から選択される細胞透過性ペプチド（「 CPP 」）およびリンカー部分であるか、または G は、式：

【化48】



を有し、式中、 CPP は、 G の最大で1つの例が存在するという条件で、 CPP のカルボキシ末端において、アミド結合により、リンカー部分に結合している]である。

【0177】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン80/イントロン80（例えば、配列番号1）内のスプライス接合部領域の少なくとも一部と相補的である、またはそれにわたる。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロン接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的であり、前記接合部は、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部を含む。多様な実施形態では、連続ヌクレオチドは、エクソン/イントロンスプライス接合部を含む。

【0178】

多様な実施形態では、化合物(V)のターゲティング配列は、配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列を含むか、配列番号2、3、4、もしくは6から選択されるか、配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列のうちの少なくとも12連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列に対する、少なくとも90%の配列同一性を有する改変体であり、配列中、 X は、ウラシル(U)またはチミン(T)から選択され、 I は、イノシンである。

一部の実施形態では、式(V)のターゲティング配列は、

a) 配列番号2 ($XXGGGXACXCACCA CXGGGCCA$) [Z は、22である]

b) 配列番号3 ($GXXCX XGGGXACXCACCA CXGG$) [Z は、22である]

c) 配列番号4 ($AAGGX XCX XGGGXACXCACCA C$) [Z は、22である]

d) 配列番号6 ($GGXACXCACCA CXGGGCCAGIG$) [Z は、22である]

から選択され、 X は、ウラシル(U)またはチミン(T)から選択され、 I は、イノシンである。

【0179】

10

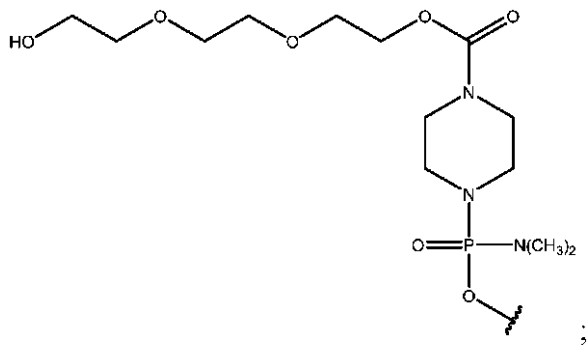
20

30

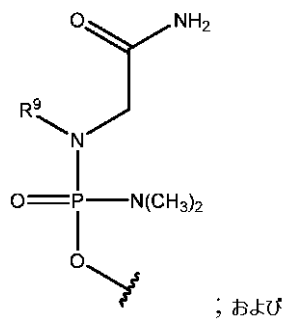
40

50

一部の実施形態では、Yは、Oであり、Tは、
【化49】



10



20

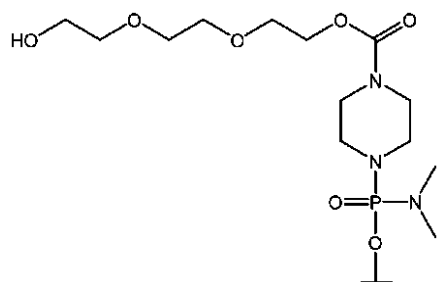


から選択される。

【0180】

一部の実施形態では、Tは、式：

【化50】



30

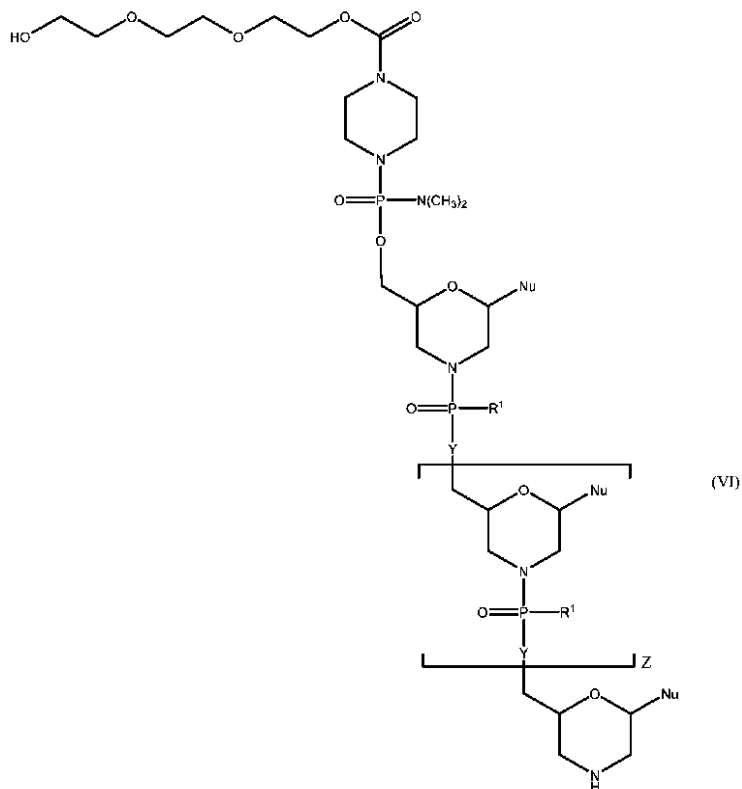
を有する。

【0181】

ある特定の実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式(VI)：

40

【化 5 1】



の化合物または薬学的に許容されるその塩〔式中、

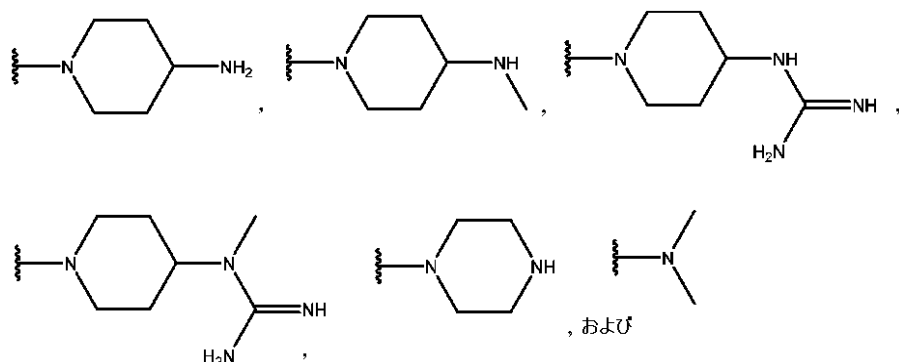
各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

Z は、15 ~ 25 の整数であり；

各 Y は、O であり；

各 R¹ は、

【化 5 2】



から独立に選択される]

である。

【0182】

多様な実施形態では、少なくとも1つの R¹ は、-N(CH₃)₂ である。一部の実施形態では、各 R¹ は、-N(CH₃)₂ である。

【0183】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン80/イントロン80（例えば、配列番号1）内のスプライス接合部領域の少なくとも一部と相補的である、またはそれにわたる。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロン接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的であり、前記接合部は、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部を含む。多様な実施形態では、連続ヌ

クレオチドは、エクソン/イントロンスプライス接合部を含む。

【0184】

多様な実施形態では、化合物(VI)のターゲティング配列は、配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列を含むか、配列番号2、3、4、もしくは6から選択されるか、配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列のうちの少なくとも12連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列に対する、少なくとも90%の配列同一性を有する改変体であり、配列中、Xは、ウラシル(U)またはチミン(T)から選択され、Iは、イノシンである。

【0185】

一部の実施形態では、式(VI)のターゲティング配列は、

a) 配列番号2 (XXGGGXACXCACCA CXGGG CCA) [Zは、22である]
]

b) 配列番号3 (GXXCXXGGGXACXCACCA CXGG) [Zは、22である]
]

c) 配列番号4 (AAGGXXCXXGGGXACXCACCA C) [Zは、22である]
]

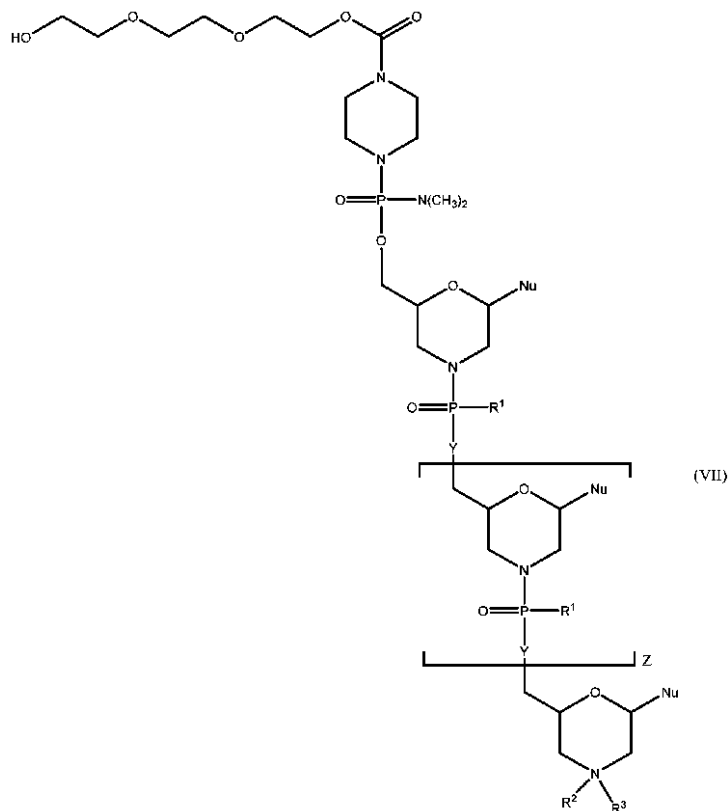
d) 配列番号6 (GGXACXCACCA CXGGG CCA GIG) [Zは、22である]
]

から選択され、Xは、ウラシル(U)またはチミン(T)から選択され、Iは、イノシンである。

【0186】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、式(VII)：

【化53】



の化合物または薬学的に許容されるその塩[式中、

各Nuは、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

Zは、10～38の整数であり；

各Yは、Oであり；

各R¹は、

10

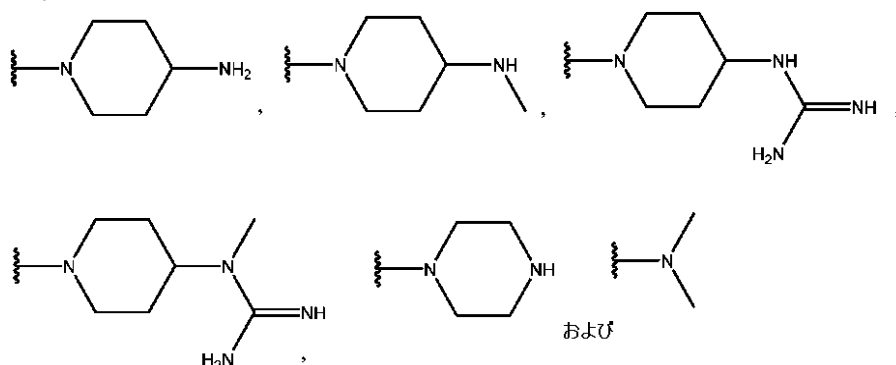
20

30

40

50

【化 5 4】



10

から独立に選択され；

R^2 は、H、アシル、トリチル、4 - メトキシトリチル、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、および $-C(O)-R^{2,3}$ から選択され、そして

R^3 は、電子対、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される]

である。

【0187】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン80/イントロン80（例えば、配列番号1）内のスプライス接合部領域の少なくとも一部と相補的である、またはそれにわたる。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的であり、前記エクソン/イントロン接合部は、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部を含む。多様な実施形態では、連続ヌクレオチドは、エクソン/イントロンスプライス接合部を含む。

20

【0188】

多様な実施形態では、化合物(VII)のターゲティング配列は、配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列を含むか、配列番号2、3、4、もしくは6から選択されるか、配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列のうちの少なくとも12連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列に対する、少なくとも90%の配列同一性を有する改変体であり、配列中、Xは、ウラシル(U)またはチミン(T)から選択され、Iは、イノシンである。

30

【0189】

一部の実施形態では、式(VII)のターゲティング配列は、

a) 配列番号2 (XXGGGXACXCACCA CXGGGCCA) [Zは、22である]、

b) 配列番号3 (GXXCX XGGGXACXCACCA CXGG) [Zは、22である]、

c) 配列番号4 (AAGGX XCX XGGGXACXCACCA C) [Zは、22である]、および

d) 配列番号6 (GGXACXCACCA CXGGGCCAGIG) [Zは、22である]

40

から選択され、Xは、ウラシル(U)またはチミン(T)から選択され、Iは、イノシンである。

【0190】

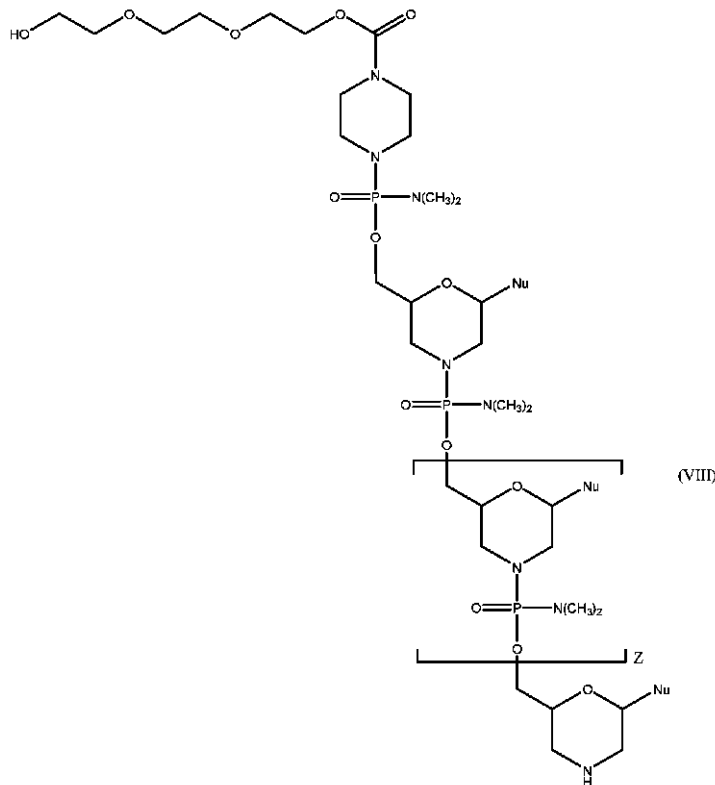
多様な実施形態では、Yは、Oであり、 R^2 は、HまたはGから選択され、 R^3 は、電子対またはHから選択される。一部の実施形態では、 R^2 は、Gであり、CPPは、配列番号9~24から選択される配列である。ある特定の実施形態では、 R^2 は、Hである。

【0191】

ある特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、式(VIII)：

50

【化 5 5】



の化合物または薬学的に許容されるその塩〔式中、

各 Nu は、一緒になってターゲティング配列を形成するヌクレオ塩基であり；

Z は、10～38の整数である〕

である。

【0192】

多様な実施形態では、ターゲティング配列は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン80/イントロン80（例えば、配列番号1）内のスプライス接合部領域の少なくとも一部と相補的である、またはそれにわたる。一部の実施形態では、ターゲティング配列は、ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的であり、前記接合部は、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部を含む。多様な実施形態では、連続ヌクレオチドは、エクソン/イントロンスプライス接合部を含む。

【0193】

多様な実施形態では、化合物(VIII)のターゲティング配列は、配列番号2、3、4、もしくは6から選択される配列を含むか、配列番号2、3、4、もしくは6から選択されるか、配列番号2、3、4、もしくは6から選択されるターゲティング配列のうちの少なくとも12連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号2、3、4、もしくは6から選択されるターゲティング配列に対する、少なくとも90%の配列同一性を有する改変体であり、配列中、Xは、ウラシル(U)またはチミン(T)から選択され、Iは、イノシンである。

【0194】

一部の実施形態では、化合物(VIII)のターゲティング配列は、

a) 配列番号2 (XXGGGXACXCACCA CXGGG CCA) [Zは、22である]、

b) 配列番号3 (GXXCX XGGGXACXCACCA CXGG) [Zは、22である]、

c) 配列番号4 (AAGGX XCX XGGGXACXCACCA C) [Zは、22である]、および

10

20

30

40

50

d) 配列番号 6 (G G X A C X C A C C A C X G G G C C A G I G) [Z は、 2 2 である]

から選択され、X は、ウラシル (U) またはチミン (T) から選択され、I は、イノシンである。

【 0 1 9 5 】

一部の実施形態では、式 (I)、(I V)、(V)、(V I)、(V I I)、および (V I I I) の化合物を含む本開示のアンチセンスオリゴマーの各 Nu は、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、シトシン、ヒポキサンチン (イノシン)、2 , 6 - ジアミノプリン、5 - メチルシトシン、C 5 - プロピニル修飾ピリミジン、および 1 0 - (9 - (アミノエトキシ) フェノキサジニル) から独立に選択される。一部の実施形態では、式 (I)、(I V)、(V)、(V I)、(V I I)、および (V I I I) の化合物を含む本開示のアンチセンスオリゴマーのターゲティング配列は、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される配列を含むか、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択されるか、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される配列のうちの、少なくとも 1 2 連続ヌクレオチドの断片であるか、または、配列番号 2、3、4 もしくは 6 から選択される配列に対する、少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する改変体であり、ここで、X は、ウラシル (U) またはチミン (T) から選択され、I は、イノシンである。

【 0 1 9 6 】

本開示に従い使用されうる、さらなるアンチセンスオリゴマー / 化学は、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、以下の特許および特許公報 : P C T 公開第 W O 2 0 0 7 / 0 0 2 3 9 0 号 ; 同第 W O 2 0 1 0 / 1 2 0 8 2 0 号 ; および同第 W O 2 0 1 0 / 1 4 8 2 4 9 号 ; 米国特許第 7 , 8 3 8 , 6 5 7 号 ; ならびに米国特許出願第 2 0 1 1 / 0 2 6 9 8 2 0 号 において記載されているアンチセンスオリゴマー / 化学を含む。

【 0 1 9 7 】

C . モルホリノサブユニットおよびホスホルアミデートヌクレオシド間リンカーの調製
モルホリノ単量体サブユニット、修飾ヌクレオシド間連結、およびこれらを含むオリゴマーは、例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第 5 , 1 8 5 , 4 4 4 号 および 同第 7 , 9 4 3 , 7 6 2 号 において記載されている通りに調製することができる。モルホリノサブユニットは、以下の一般的な反応スキーム I に従い調製することができる。

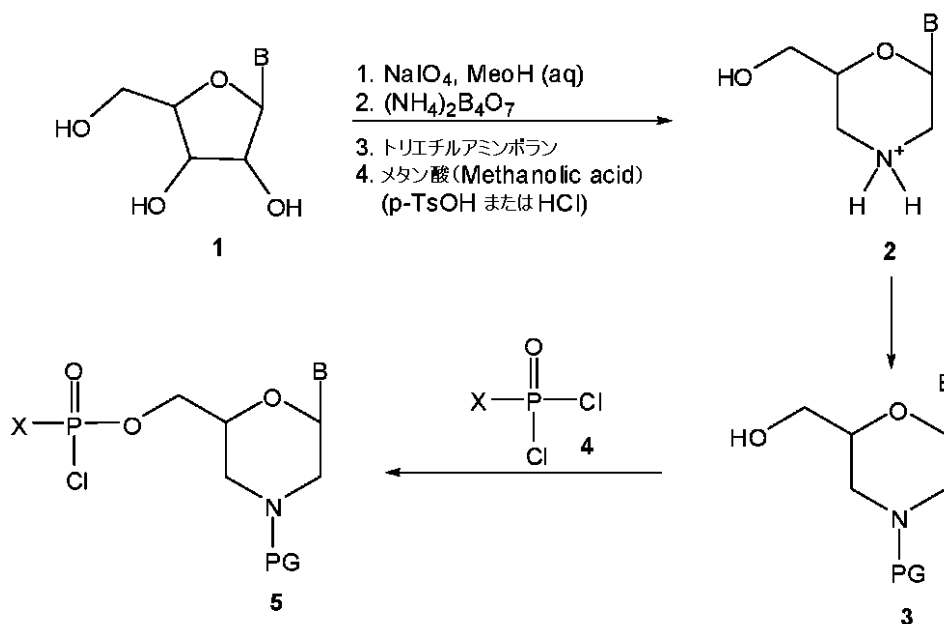
【 0 1 9 8 】

10

20

30

反応スキーム1。モルホリノサブユニットの調製、保護および活性化



反応スキーム 1 [式中、B は、塩基対合部分を表し、PG は、保護基を表す] を参照すると、モルホリノサブユニットは、示される通り、対応するリボヌクレオシド (1) から調製することができる。モルホリノサブユニット (2) は、任意選択で、適切な保護基前駆体、例えば、トリチルクロリドを伴う反応により保護することができる。下記でより詳細に記載される通り、3' 保護基は一般に、固体オリゴマー合成時に除去する。塩基対合部分は、固相オリゴマー合成に適するように保護することができる。適切な保護基は、アデニンおよびシトシンのためのベンゾイル、グアニンのためのフェニルアセチル、およびヒポキサンチン (I) のためのピバロイルオキシメチルを含む。ピバロイルオキシメチル基は、ヒポキサンチン複素環塩基の N 1 位へと導入することができる。非保護のヒポキサンチンサブユニットも使用しうるが、塩基を保護する場合の活性化反応の収率は、はるかに優れている。他の適切な保護基は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。米国特許第 8, 076, 476 号において開示されている保護基を含む。

活性化リン化合物 4 を伴う化合物 3 の反応は、所望の連結部分である化合物 5 を有するモルホリノサブユニットをもたらす。構造 4 の化合物は、任意の数の、当業者に公知の方法を使用して調製することができる。例えば、このような化合物は、対応するアミンと、オキシ塩化リン (phosphorous oxychloride) との反応により調製することができる。この点で、アミン出発材料は、当技術分野で公知の任意の方法、例えば、実施例、ならびに参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第 5, 185, 444 号、同第 7, 943, 762 号、および同第 8, 779, 128 号において記載されている方法を使用して調製することができる。

構造 5 の化合物は、ヌクレオシド間連結を含むオリゴマーを調製するための固相自動式オリゴマー合成において使用することができる。このような方法は、当技術分野で周知である。略述すると、構造 5 の化合物は、固体支持体へのリンカーを含有するように、5'末端において修飾することができる。例えば、化合物 5 は、 L^{11} および L^{15} を含むリンカーにより、固体支持体へと連結することができる。例示的な方法を、図 1 A に実証する。支持がなされたら、保護基（例えば、トリチル）を除去し、遊離アミンを、第 2 の構造 5 の化合物の活性化リン部分と反応させる。このシークエンスを、所望の長さのオリゴ

が得られるまで繰り返す。5'末端における保護基は、除去することもでき、5'修飾が望ましい場合は、残すこともできる。オリゴは、任意の数の方法、例えば、D T Tによる処理に続く、水酸化アンモニウムによる処理を使用して、固体支持体から除去することができる。

【0202】

修飾モルホリノサブユニットおよびモルホリノベースのオリゴマーの調製については、実施例においてより詳細に記載する。本明細書に記載される方法、当技術分野で公知であり、かつ/または参照により本明細書に記載される方法を使用して、任意の数の修飾連結を含有するモルホリノベースのオリゴマーを調製することができる。実施例ではまた、既に記載されている（例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、P C T公開第W O 2 0 0 8 / 0 3 6 1 2 7号を参照されたい）通りに調製された、モルホリノベースのオリゴマーの全般的な修飾についても記載する。

10

【0203】

「保護基」という用語は、化合物の一部または全部の反応性部分をブロックし、保護基を除去するまで、このような部分が、化学反応に参加することを防止する化学的部分、例えば、T. W. Greene, P. G. M. Wuts, 「Protective Groups in Organic Synthesis」、3版、John Wiley & Sons (1999年) (その全体が本明細書において参考として援用される) において列挙および記載されている部分を指す。異なる保護基を使用する場合、各(異なる)保護基が、異なる手段により除去可能であることは、有利でありうる。完全に非対応の反応条件下で切断される保護基は、このような保護基の示差的な除去を可能とする。例えば、保護基は、酸、塩基、および加水分解により除去することができる。トリチル、ジメトキシトリチル、アセタール、およびtert-ブチルジメチルシリルなどの基は、酸不安定性であり、加水分解により除去可能なCbz基、および塩基不安定性のFmoc基で保護されるアミノ基の存在下で、カルボキシ反応性部分およびヒドロキシ反応性部分を保護するのに使用することができる。カルボン酸部分は、限定なしに述べると、メチルまたはエチルなどの塩基不安定性基でブロックすることができ、ヒドロキシ反応性部分は、tert-ブチルカルバメートなどの酸不安定性基、または酸安定性であり、かつ、塩基安定性であるが、加水分解により除去可能なカルバメートでブロックされるアミンの存在下では、アセチルなどの塩基不安定性基でブロックすることができる。

20

30

【0204】

カルボン酸反応性部分およびヒドロキシル反応性部分はまた、ベンジル基など、加水分解により除去可能な保護基でブロックしうるので、アミン基は、Fmocなどの塩基不安定性基でブロックすることができる。式(I)の化合物を合成するのに、特に有用なアミン保護基は、トリフルオロアセトアミドである。カルボン酸反応性部分が、2,4-ジメトキシベンジルなど、酸化により除去可能な保護基(protective group)でブロックしうるので、共存するアミノ基は、フルオリド不安定性シリルカルバメートでブロックすることができる。

【0205】

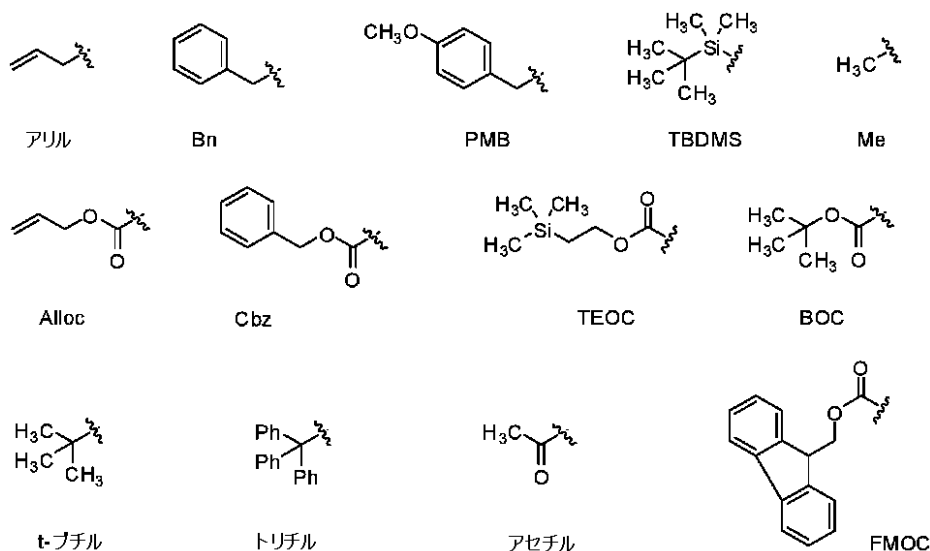
アリルブロッキング基は、酸保護基および塩基保護基の存在下において、前者が、安定であり、その後、金属またはパイ-酸触媒により除去されうるので、有用である。例えば、アリルでブロックされたカルボン酸は、酸不安定性t-ブチルカルバメートまたは塩基不安定性アセテートアミン保護基の存在下で、パラジウム(0)触媒反応により脱保護することができる。保護基のさらに別の形態は、化合物または中間体が結合しうる樹脂である。残基が樹脂に結合する限りにおいて、その官能基は、ブロックされており、反応することができない。樹脂から放出されると、官能基は、反応に利用可能である。

40

【0206】

典型的なブロッキング/保護基は、当技術分野で公知であり、以下：

【化 57】



10

の部分を含むがこれらに限定されない。

【0207】

そうでないことが注記されない限りにおいて、全ての化学物質は、Sigma-Aldrich-Fluka (St. Louis, MO) から得た。ベンゾイルアデノシン、ベンゾイルシチジン、およびフェニルアセチルグアノシンは、Carbosynth Limited (Berkshire, UK) から得た。

20

【0208】

本明細書で記載される、さらなる連結修飾を含有する、PMO、PMOプラス、PPMO、およびPMO-Xの合成は、当技術分野で公知であり、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許出願第12/271,036号および同第12/271,040号ならびにPCT公開第WO2009/064471号において記載されている方法を使用して行った。

【0209】

3'トリチル修飾を伴うPMOは、脱トリチル化(detritylation)ステップを省くことを除き、本質的に、PCT公開第WO2009/064471号において記載されている通りに合成する。

30

【0210】

D. 細胞透過性ペプチド

本開示のアンチセンスオリゴマー化合物は、本明細書ではまた、細胞透過性ペプチド(CPP)とも称するペプチドにコンジュゲートしていてもよい。ある特定の好ましい実施形態では、ペプチドは、化合物の、細胞への輸送を増強するのに有効な、アルギニンに富むペプチド輸送部分である。輸送部分は、オリゴマーの末端に、例えば、オリゴマーの3'末端に、結合させることが好ましい。例示的な輸送部分は、図1Bおよび1Cに示される。ペプチドは、全身投与されると、所与の細胞培養物集団の細胞のうちの30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%であって、間の全ての整数を含む%の細胞内の細胞透過を誘導し、in vivoにおいて、複数の組織内の高分子のトランスロケーションを可能とする能力を有する。一実施形態では、細胞透過性ペプチドは、アルギニンに富むペプチド輸送体でありうる。別の実施形態では、細胞透過性ペプチドは、ペネトラチンまたはTatペプチドでありうる。当技術分野では、これらのペプチドが周知であり、例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国公開第2010-0016215A1号において開示されている。ペプチドの、本開示のアンチセンスオリゴマーへのコンジュゲーションのための1つの手法は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2012/150960号において見出すことができる。本開示のペプチドコンジュゲートオリゴマーについての一部

40

50

の実施形態は、C P P と、アンチセンスオリゴマーとの間のリンカーとして、グリシンを活用する。例えば、本開示のペプチドコンジュゲート P M O は、 $R_6 - G - P M O$ からなる。

【 0 2 1 1 】

上記で記載した輸送部分は、結合オリゴマーの細胞移入を、結合輸送部分の非存在下におけるオリゴマーの取込みと比べて大幅に増強することが示されている。取込みは、非コンジュゲート化合物と比べて、少なくとも 10 倍増強することが好ましく、20 倍増強することがより好ましい。

【 0 2 1 2 】

アルギニンに富むペプチド輸送体（すなわち、細胞透過性ペプチド）の使用は、本開示を実施するのに特に有用である。ある特定のペプチド輸送体は、アンチセンス化合物の、筋細胞を含む初代細胞への送達において、高度に有効であることが示されている（参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、Marshall, Odaら、2007年；Jearawiriyapaisarn, Moultonら、2008年；Wu, Moultonら、2008年）。さらに、ペネトラチンおよび Tat ペプチドなど、他の公知のペプチド輸送体と比較して、本明細書で記載されるペプチド輸送体は、アンチセンス P M O にコンジュゲートさせると、複数の遺伝子転写物のスプライシングを変更する能力の増強を裏付ける（参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Marshall, Odaら、2007年）。

【 0 2 1 3 】

リンカーを除く、例示的なペプチド輸送体（例えば、アルギニンリッチペプチド）を、下記の表 3 に示す。

【 0 2 1 4 】

10

20

【表 3】

表 3. 例示的なペプチド輸送体

名称(呼称)	配列	配列番号 ^A
rTAT	RRRQRRKKR	9
Tat	RKKRRQRRR	10
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFF	11
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRRFFRRRR	12
R ₄	RRRR	13
R ₅	RRRRR	14
R ₆	RRRRRR	15
R ₇	RRRRRRR	16
R ₈	RRRRRRRR	17
R ₉	RRRRRRRRR	18
(RX) ₈	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhx	19
(RAhxR) ₄ ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	20
(RAhxR) ₅ ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	21
(RAhxRRBR) ₂ ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	22
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRARFF	23
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRRGRGRFF	24

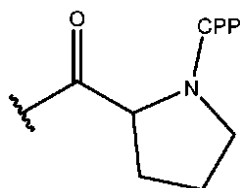
^A配列番号に割り当てられた配列は、連結部分(例えば、C(cys)、G(gly)、P(pro)、Ahx、B、AhxB[式中、AhxおよびBは、それぞれ、6-アミノヘキサン酸およびベータアラニンを指す])を含まない。

【0215】

多様な実施形態では、G(式I、IV、およびVで列挙された)は、以下：

- C(O)(CH₂)₅NH-CPP、- C(O)(CH₂)₂NH-CPP、- C(O)(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₅NH-CPP、および - C(O)CH₂NH-CPPから選択される細胞透過性ペプチド(「CPP」)およびリンカー部分であるか、またはGは、式：

【化58】



を有し、式中、CPPは、CPPのカルボキシ末端において、アミド結合により、リンカー部分に結合している。

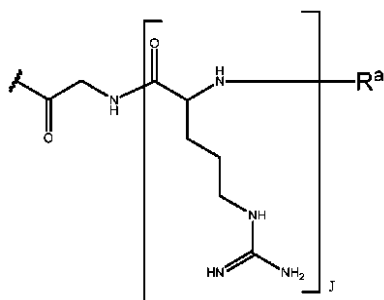
【0216】

一部の実施形態では、CPPは、配列番号9～24から選択される。

【 0 2 1 7 】

一部の実施形態では、G（式Ⅰ、Ⅳ、およびⅤにおいて列挙する通り）は、式：

【化 5 9】



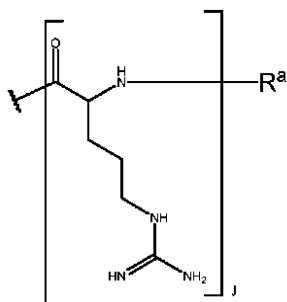
10

であり、 R^a は、H、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択され、J は、4～9の整数である。ある特定の実施形態では、J は、6である。

【 0 2 1 8 】

多様な実施形態では、CPP（式Ⅰ、Ⅳ、およびⅤにおいて列挙する通り）は、式：

【化 6 0】



20

であり、 R^a は、H、アセチル、ベンゾイル、およびステアロイルから選択され、J は、4～9の整数である。ある特定の実施形態では、CPPは、配列番号15である。多様な実施形態では、J は、6である。一部の実施形態では、 R_a は、Hおよびアセチルから選択される。例えば、一部の実施形態では、 R_a は、Hである。ある特定の実施形態では、 R_a は、アセチルである。

30

【 0 2 1 9 】

Ⅳ．製剤

本開示の化合物はまた、取込み、分布、および/または吸収を支援するために、例えば、リポソーム、受容体にターゲティングされた分子、経口製剤、直腸製剤、局所製剤、または他の製剤として、他の分子、分子構造、または化合物の混合物と混合するか、これらと共に封入するか、これらにコンジュゲートさせるか、またはこれらと他の形で会合させることもできる。このような取込み支援製剤、分布支援製剤、および/または吸収支援製剤の調製について教示する、代表的な米国特許は、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第5,108,921号；同第5,354,844号；同第5,416,016号；同第5,459,127号；同第5,521,291号；同第5,543,158号；同第5,547,932号；同第5,583,020号；同第5,591,721号；同第4,426,330号；同第4,534,899号；同第5,013,556号；同第5,108,921号；同第5,213,804号；同第5,227,170号；同第5,264,221号；同第5,356,633号；同第5,395,619号；同第5,416,016号；同第5,417,978号；同第5,462,854号；同第5,469,854号；同第5,512,295号；同第5,527,528号；同第5,534,259号；同第5,543,152号；同第5,556,948号；同第5,580,575号および同第5,595,756号を含むがこれらに限定されない。

40

【 0 2 2 0 】

50

本開示のアンチセンス化合物は、任意の薬学的に許容される塩、エステル、もしくはこのようなエステルの塩、またはヒトを含む動物へと投与されると、生物学的に活性の代謝物もしくはその残余物をもたらす（直接的または間接的に）ことが可能な、他の任意の化合物を包含する。したがって、例えば、本開示はまた、本開示の化合物のプロドラッグおよび薬学的に許容される塩、このようなプロドラッグの薬学的に許容される塩、および他の生物学的同等物へも導かれる。

【0221】

「プロドラッグ」という用語は、内因性酵素または他の化学物質および／もしくは条件の作用により、体内またはその細胞内で活性形態（すなわち、薬物）へと転換される、不活性形態で調製された治療剤を指し示す。特に、本開示のオリゴマーのプロドラッグバージョンは、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、1993年12月9日に公開された、GosselinらによるPCT公開第WO1993/24510号またはImbachらによる、PCT公開第WO1994/26764号および米国特許第5,770,713号において開示されている方法に従い、SATE[（S-アセチル-2-チオエチル）ホスフェート]誘導体として調製される。

10

【0222】

「薬学的に許容される塩」という用語は、本開示の化合物の、生理学的かつ薬学的に許容される塩：すなわち、親化合物の望ましい生物学的活性を保持し、望ましくない毒性効果をこれに付与しない塩を指す。オリゴマーについては、薬学的に許容される塩およびそれらの使用の例については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。

20

【0223】

本開示はまた、本開示のアンチセンス化合物を含む医薬組成物および製剤も含む。多様な実施形態では、医薬組成物は、12～40サブユニットのアンチセンスオリゴマー化合物および薬学的に許容される担体を含み、ここで、上記化合物は、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である、少なくとも1つのサブユニットと；ヒトVII型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロン接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列とを含み、連続ヌクレオチドは、エクソン/イントロン接合部を含み、前記エクソン/イントロン接合部は、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部を含む。さらなる実施形態では、医薬組成物および製剤は、式(I)の化合物を含む。多様な実施形態では、医薬組成物および製剤は、アンチセンスオリゴマーの3'末端にコンジュゲートしたアルギニンに富むペプチド配列をさらに含み、ここで、アルギニンに富むペプチド配列は、表3に提供される配列番号9～配列番号24から選択される配列を含む。本開示の医薬組成物は、局所処置が望ましいのか、全身処置が望ましいのか、および処置される領域に応じて、多数の方式で投与することができる。投与は、局所投与（眼投与および膣送達および直腸送達を含む粘膜への投与を含む）、肺投与、例えば、噴霧器による投与を含む、散剤またはエアゾールによる吸入または送気による投与；気管内投与、鼻腔内投与、表皮投与および経皮投与、経口投与、または非経口投与でありうる。非経口投与は、静脈内注射もしくは静脈内注入、動脈内注射もしくは動脈内注入、皮下注射もしくは皮下注入、腹腔内注射もしくは腹腔内注入、または筋肉内注射もしくは筋肉内注入；あるいは頭蓋内投与、例えば、髄腔内投与または脳室内投与を含む。少なくとも1つの2'-O-メトキシエチル修飾を伴うオリゴマーは、経口投与に特に有用であると考えられる。局所投与のための医薬組成物および製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、坐剤、スプレー、液剤(liquid)、および散剤を含みうる。従来の医薬担体、水性、粉末、または油性の基剤、増粘剤などが、必要であるかまたは望ましい場合がある。コーティングされたコンドーム、手袋などもまた、有用でありうる。

30

40

【0224】

単位剤形で提示されると好都合でありうる本開示の医薬製剤は、製薬業界で周知の従来

50

の技法に従い調製することができる。このような技法は、有効成分を、医薬担体または賦形剤と会合させるステップを含む。一般に、製剤は、有効成分を、液体担体もしくは微細に分割された固体担体、またはこれらの両方と、均一かつ十分に会合させ、次いで、必要な場合、生成物を成形することにより調製する。

【0225】

本開示の組成物は、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、軟質ゲル、坐剤、および浣腸剤 (enema) などであるがこれらに限定されない、多くの可能な剤形のうちのいずれかへと製剤化することができる。本開示の組成物はまた、水性媒体中、非水性媒体中、または混合媒体中の懸濁物としても製剤化することができる。水性懸濁物は、懸濁物の粘性を増加させる物質であって、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および/またはデキストランを含む物質をさらに含有しうる。懸濁物はまた、安定化剤も含有しうる。

10

【0226】

本開示の医薬組成物は、溶液、エマルジョン、泡沫、およびリボソームを含有する製剤を含むがこれらに限定されない。本開示の医薬組成物および製剤は、1または複数の浸透増強剤、担体、賦形剤、または他の活性成分もしくは不活性成分を含みうる。

【0227】

エマルジョンは、通常 $0.1\ \mu\text{m}$ の直径を超える液滴の形態で、別の液体中に分散させた1つの液体による不均質系であることが典型的である。エマルジョンは、分散相に加えたさらなる成分と、水相中、油相中の溶液、または分離相としてのそれ自体として存在しうる活性薬物とを含有しうる。マイクロエマルジョンは、本開示の実施形態として含まれる。当技術分野では、エマルジョンおよびそれらの使用が周知であり、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。

20

【0228】

本開示の製剤は、リボソーム製剤を含む。本開示で使用される「リボソーム」という用語は、1または複数の球状の二重層内に配置された、両親媒性脂質から構成される小胞を意味する。リボソームとは、親油性材料から形成された膜と、送達される組成物を含有する水性の内部とを有する、単層または多重層の小胞である。カチオン性リボソームは、正に荷電したリボソームであり、負に荷電したDNA分子と相互作用して、安定的な複合体を形成すると考えられる。pH感受性であるか、または負に荷電したリボソームは、DNAと複合体化するのではなく、DNAを捕獲すると考えられる。カチオン性リボソームおよび非カチオン性リボソームのいずれも、DNAを、細胞へと送達するのに使用されている。

30

【0229】

リボソームはまた、本明細書で使用される用語であって、1または複数の特殊化された脂質を含むリボソームを指す、「立体安定化」リボソームも含み、この脂質は、リボソームへと組み込まれると、このような特殊化された脂質を欠くリボソームと比べて、循環寿命の増強を結果としてもたらす。立体安定化リボソームの例は、リボソームの小胞形成脂質部分の一部が、1もしくは複数の糖脂質を含むか、またはリボソームの小胞形成脂質部分の一部を、ポリエチレングリコール (PEG) 部分など、1もしくは複数の親水性ポリマーで誘導体化した立体安定化リボソームである。リボソームおよびそれらの使用については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。

40

【0230】

本開示の医薬製剤および医薬組成物はまた、界面活性剤も含みうる。当技術分野では、薬物製品中、製剤中、およびエマルジョン中の界面活性剤の使用が周知である。界面活性剤およびそれらの使用については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。

【0231】

50

一部の実施形態では、本開示は、多様な浸透増強剤を使用して、核酸、特に、オリゴマーの効率的な送達を行う。細胞膜を横切る非親油性薬物の拡散の支援に加えて、浸透増強剤はまた、親油性薬物の透過性も増強する。浸透増強剤は、5つの大きな類別、すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート化剤、および非キレート化非界面活性剤のうちの1つに属するものとして分類することができる。浸透増強剤およびそれらの使用については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。

【0232】

当業者は、製剤が、それらの意図される使用、すなわち、投与経路に従い、慣例的にデザインされることを認識するであろう。

【0233】

局所投与のための製剤は、本開示のオリゴマーを、脂質、リボソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート化剤、および界面活性剤など、局所送達剤と混合した製剤を含む。脂質およびリボソームは、中性（例えば、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンDOPE、ジミリストイルホスファチジルコリンDMPC、ジステアロイルホスファチジルコリン）、陰性（例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロールDMPG）、およびカチオン性（例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピルDOTAPおよびジオレオイルホスファチジルエタノールアミンDOTMA）を含む。

【0234】

局所投与または他の投与のために、本開示のオリゴマーを、リボソーム内に封入することもでき、リボソーム、特に、カチオン性リボソームとの複合体を形成することもできる。代替的に、オリゴマーは、脂質、特に、カチオン性脂質と複合体化させることもできる。脂肪酸およびエステル、薬学的に許容されるそれらの塩、ならびにそれらの使用については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。局所製剤については、それらの全体において本明細書に参考として援用される、1999年5月20日に出願された、米国特許出願第09/315,298号およびMourichら, 2009, J. Invest. Dermatol., 129(8): 1945-53において詳細に記載されている。

【0235】

経口投与のための組成物および製剤は、粉末または顆粒、マイクロ粒子、ナノ粒子、水中または非水性媒体中の懸濁物または溶液、カプセル、ゲルカプセル、小袋(sachet)、錠剤またはミニ錠剤(minitablet)を含む。増粘剤、矯味矯臭剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤、または結合剤が望ましい場合がある。経口製剤は、本開示のオリゴマーを、1または複数の浸透増強剤、界面活性剤、およびキレート剤と共に投与する経口製剤である。界面活性剤は、脂肪酸および/またはそのエステルもしくは塩、胆汁酸および/またはその塩を含む。胆汁酸/塩および脂肪酸ならびにそれらの使用については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。一部の実施形態では、本開示は、浸透増強剤の組合せ、例えば、胆汁酸/塩と組み合わせた脂肪酸/塩を提示する。例示的な組合せは、ラウリン酸、カプリン酸、およびUDCAのナトリウム塩である。さらなる浸透増強剤は、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-20-セチルエーテルを含む。本開示のオリゴマーは、経口送達することもでき、噴霧乾燥粒子を含む顆粒形態で送達することもでき、マイクロ粒子またはナノ粒子を形成するように複合体化させることもできる。オリゴマー複合体化剤およびそれらの使用については、その全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,287,860号においてさらに記載されている。オリゴマーのための経口製剤およびそれらの調製については、それらの全体において本明細書に参考として援用される、米国出願第09/108,673号(1998年7月1日に出願された)、同第09/315,298号(1999年5月20日に出願された)、および同第10/071,822号(2002年2月8日に出願された)において詳細に記載されている。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 6 】

非経口投与、髄腔内投与、または脳室内投与のための組成物および製剤は、浸透増強剤、担体化合物、および他の薬学的に許容される担体または賦形剤などであるがこれらに限定されない、緩衝液、希釈剤および他の適切な添加剤もまた含有しうる、滅菌水溶液を含みうる。

【 0 2 3 7 】

別の関連する実施形態では、本開示の組成物は、第 1 の核酸へとターゲティングされた、1 または複数のアンチセンス化合物、特にオリゴマーと、第 2 の核酸標的へとターゲティングされた、1 または複数のさらなるアンチセンス化合物とを含有しうる。代替的に、本開示の組成物は、同じ核酸標的の異なる領域へとターゲティングされた、2 つまたはこれを超えるアンチセンス化合物を含有しうる。当技術分野では、アンチセンス化合物の多数の例が公知である。2 つまたはこれを超える組合せ化合物を、併せて使用することもでき、逐次的に使用することもできる。

【 0 2 3 8 】

V . 使用方法

多様な態様は、被験体における機能的なヒト V I I 型コラーゲン発現を増加させる方法に関する。さらなる態様では、被験体における栄養障害型表皮水疱症 (D E B) および関連障害を処置または防止する方法であって、被験体が、健康被験体であってよい場合、または皮膚の水疱形成に関連する疾患、障害、もしくは状態に罹患した被験体などを含む。さらなる態様では、機能的なヒト V I I 型コラーゲン発現を増加させる方法が提供される。さらなる態様では、機能的なヒト V I I 型コラーゲンの翻訳を増加させる方法が提供される。さらなる態様では、係留線維における機能的なヒト V I I 型コラーゲンの蓄積を増加させる、および / または係留線維の蓄積を増加させる方法が提供される。

【 0 2 3 9 】

さらなる態様では、ヒト V I I 型コラーゲン遺伝子のゲノムエクソン 8 0 の発現を阻害する方法が提供される。さらなる態様では、スプライス接合部を含むヒト V I I 型コラーゲンプレ m R N A 配列のスプライシングを阻害する方法が提供される。さらなる態様では、成熟 m R N A ヒト V I I 型コラーゲン転写物内の、エクソン 8 0 の発現を阻害する方法が提供される。さらなる態様では、例えば、機能的なヒト V I I 型コラーゲタンパク質の発現を増加させることなどのモジュレートする方法が提供される。さらなる態様では、栄養障害型表皮水疱症の進行を阻害する方法が提供される。

【 0 2 4 0 】

さらなる態様および実施形態では、栄養障害型表皮水疱症および関連障害に罹患するか、またはこれらを発症する危険性がある個体を処置する方法であって、有効量の、本開示のアンチセンスオリゴマーを、被験体に投与するステップを含む方法が提供される。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ヒト V I I 型コラーゲン遺伝子のプレ m R N A 転写物内の、スプライス接合部領域と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さおよび相補性を有するヌクレオチド配列を含み、ここで、アンチセンスオリゴマーの、前記領域への結合は、被験体の細胞内および / または組織内の、エクソン 8 0 を含有するヒト V I I 型コラーゲン m R N A のレベルを低下させる。さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、式 (I) を含む。さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 もしくは配列番号 6 から選択されるターゲティング配列を含むか、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 もしくは配列番号 6 から選択されるか、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 もしくは配列番号 6 から選択される配列のうちの少なくとも 1 2 連続ヌクレオチドの断片であるか、または配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4 もしくは配列番号 6 から選択される配列に対する、少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する改変体であり、配列中、X は、ウラシル (U) またはチミン (T) から選択される。さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴマーの、ヒト V I I 型コラーゲン遺伝子のプレ m R N A 転写物内の、スプライス接合部領域への結合は、機能的なヒト V I I 型コラーゲン m R N A の翻訳を増加させる。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマー

の、ヒトV I I型コラーゲン遺伝子のプレmRNA転写物内の、スプライス接合部領域への結合は、機能的なヒトV I I型コラーゲンの発現を増加させる。例示的なアンチセンスターゲティング配列を、表2に示す。

【0241】

また、栄養障害型表皮水疱症および関連障害を処置するための医薬の調製における使用のためのアンチセンスオリゴマーであって、ヒトV I I型コラーゲン遺伝子のプレmRNA転写物内の領域と特異的にハイブリダイズするのに十分な長さおよび相補性を有するヌクレオチド配列を含み、アンチセンスオリゴマーの、標的領域への結合が、エクソン80ヒトV I I型コラーゲンmRNAのレベルを低下させるアンチセンスオリゴマーも含まれる。さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴマーの、ヒトV I I型コラーゲン遺伝子のプレmRNA転写物内の、スプライス接合部領域への結合は、機能的なヒトV I I型コラーゲンmRNAの翻訳を増加させる。多様な実施形態では、アンチセンスオリゴマーの、ヒトV I I型コラーゲン遺伝子のプレmRNA転写物内の、スプライス接合部領域への結合は、機能的なヒトV I I型コラーゲンの発現を増加させる。

【0242】

多様な態様および実施形態では、(i)修飾ヌクレオシド間連結、(ii)修飾糖部分、または(iii)前出の組合せを有するヌクレオチド類似体である、少なくとも1つのサブユニットと；ヒトV I I型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる標的領域内の、12またはこれを超える連続ヌクレオチドと相補的なターゲティング配列とを任意選択で有する、12~40サブユニットを含むアンチセンスオリゴマーを投与することを含む、栄養障害型表皮水疱症および関連障害を処置する方法と、栄養障害型表皮水疱症および関連障害を処置するための医薬が提供される。多様な実施形態では、連続ヌクレオチドは、エクソン/イントロンスプライス接合部を含む。さらなる実施形態では、スプライス接合部は、エクソン80/イントロン80(例えば、配列番号1)を含む。これらは、ヒトV I I型コラーゲンプレmRNAのエクソン/イントロンスプライス接合部にわたる標的領域と特異的にハイブリダイズする、12~40サブユニットを含みうる。スプライス接合部は、エクソン80/イントロン80の境目にあるスプライス接合部を含む。複数の実施形態では、エクソン80/イントロン80のスプライス接合部は、配列番号1のスプライス接合部を含む。

【0243】

これらのさらなる態様および実施形態は、修飾糖部分を含む、ヌクレオチド類似体サブユニットを有する、アンチセンスオリゴマーを含む。多様な実施形態では、修飾糖部分は、ペプチド核酸(PNA)サブユニット、ロクト核酸(LNA)サブユニット、2' O, 4' C-エチレン架橋核酸(ENA)サブユニット、トリシクロDNA(tc-DNA)サブユニット、2' O-メチルサブユニット、2' O-メトキシエチルサブユニット、2'-フルオロサブユニット、2'-O-[2-(N-メチルカルバモイル)エチル]サブユニット、およびモルホリノサブユニットから選択される。

【0244】

これらのさらなる態様および実施形態は、修飾ヌクレオシド間連結を含む、ヌクレオチド類似体サブユニットを有する、アンチセンスオリゴマーを含む。多様な実施形態では、修飾ヌクレオシド間連結は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結、ホスホルアミデートヌクレオシド間連結、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結から選択される。さらなる実施形態では、ホスホロジアミデートヌクレオシド間連結は、(1,4-ピペラジン)-1-イル部分、置換(1,4-ピペラジン)-1-イル部分、4-アミノピペリジン-1-イル部分、または置換4-アミノピペリジン-1-イル部分に共有結合したリン原子を含む。

【0245】

これらのさらなる態様および実施形態は、修飾糖部分と修飾ヌクレオシド間連結との少なくとも1つの組合せを含む、ヌクレオチド類似体サブユニットを有する、アンチセンスオリゴマーを含む。

【 0 2 4 6 】

多様な態様は、本明細書で記載されるアンチセンスオリゴマーを使用して、細胞、組織、および／または被験体における、エクソン 80 を含有するヒト V I I 型コラーゲン m R N A 転写物の発現を減少させる方法に関する。場合によって、エクソン 80 を含有するヒト V I I 型コラーゲン m R N A 転写物または機能障害的なヒト V I I 型コラーゲタンパク質を、対照、例えば、対照細胞／被験体（例えば、栄養障害型表皮水疱症または関連障害を有する被験体）、アンチセンスオリゴマーを伴わない対照組成物、処置の非存在、および／または早期の時点と比べて、約 5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、もしくは 100 %、または少なくともほぼこれらの比率で減少させるかまたは低減する。また、エクソン 80 を含有する m R N A 転写物、または機能障害的なヒト V I I 型コラーゲタンパク質の発現を、対照、例えば、養障害型表皮水疱症または関連障害を有する被験体のレベルと比べて減少させる方法も含まれる。

10

【 0 2 4 7 】

多様な態様は、本明細書で記載されるアンチセンスオリゴマーを使用して、細胞、組織、および／または被験体における、機能的なヒト V I I 型コラーゲタンパク質の発現を増加させる、係留線維における機能的なヒト V I I 型コラーゲンの蓄積を増加させる、および／または係留線維の蓄積を増加させる方法に関する。場合によって、機能的なヒト V I I 型コラーゲン、機能的なヒト V I I 型コラーゲン係留線維または係留線維を、対照、例えば、対照細胞／被験体（例えば、栄養障害型表皮水疱症または関連障害を有する被験体）、アンチセンスオリゴマーを伴わない対照組成物、処置の非存在、および／または早期の時点と比べて、約 5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、もしくは 100 %、または少なくともほぼこれらの比率で増加させるかまたは増強する。また、対照、例えば、養障害型表皮水疱症または関連障害を有する被験体のレベルと比べて、機能的なヒト V I I 型コラーゲタンパク質の発現を増加させる、係留線維における機能的なヒト V I I 型コラーゲンの蓄積を増加させる、および／または係留線維の蓄積を増加させる方法も含まれる。

20

30

【 0 2 4 8 】

多様な態様は、本明細書で記載される、細胞、組織、および／または被験体における機能障害的／不活性なヒト V I I 型コラーゲタンパク質の発現を減少させる方法に関する。ある特定の場合には、機能障害的／不活性なヒト V I I 型コラーゲタンパク質のレベルを、対照、例えば、対照細胞／被験体（例えば、栄養障害型表皮水疱症または関連障害を有する被験体）、アンチセンスオリゴマーを伴わない対照組成物、処置の非存在、および／または早期の時点と比べて、約 5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、もしくは 100 %、または少なくともほぼこれらの比率で低下させる。また、機能障害的／不活性なヒト V I I 型コラーゲタンパク質の発現を、罹患対照、例えば、栄養障害型表皮水疱症または関連障害を有する被験体のレベルと比べて減少させる方法も含まれる。

40

【 0 2 4 9 】

多様な態様は、本明細書で記載されるアンチセンスオリゴマーを使用して、被験体における、栄養障害型表皮水疱症および関連障害の進行を阻害する方法に関する。

【 0 2 5 0 】

多様な態様は、適切な場合、それを必要とする被験体における、栄養障害型表皮水疱症および関連障害の、1または複数の症状を低減または改善する方法に関する。特定の例は、軽度の外傷後の皮膚および粘膜の水疱形成、皮膚がん、転移性扁平上皮癌ならびに真皮

50

表皮接着の喪失など、進行性皮膚脆弱性の症状を含む。

【0251】

本明細書のアンチセンスオリゴマーを被験体に投与して、栄養障害型表皮水疱症および関連障害を処置する（予防的または治療的に）ことができる。このような処置と共に、ゲノム薬理学（すなわち、個体の遺伝子型と、外来化合物または薬物へのその個体の応答との関係についての研究）について考慮することもできる。治療剤の代謝の差違は、薬理的な活性薬物の用量と血中濃度との関係を変更することにより、重度の毒性または治療の失敗をもたらしうる。

【0252】

こうして、医師または臨床医は、治療剤を投与すべきなのかどうかの決定においてのほ
か、治療剤による処置の投与量および/または治療レジメンの調整においても関与性のゲ
ノム薬理学研究において得られる知見の適用について考慮することができる。

10

【0253】

アンチセンスオリゴマーの、標的核酸への有効な送達は、処置の1つの側面である。アンチセンスオリゴマーの送達経路は、経口経路および非経口経路を含む、多様な全身経路、例えば、静脈内送達、皮下送達、腹腔内送達、および筋内送達のほか、吸入送達、経皮送達、および局所送達を含むがこれらに限定されない。適切な経路は、当業者が、処置下にある被験体の状態に適切な経路として決定することができる。血管循環または血管外循環の、血液またはリンパ系、および脳脊髄液は、RNAを導入しうる、一部の非限定的な部位である。直接的なCNS送達を使用することができ、例えば、脳室内投与または髄腔内投与を、投与経路として使用することができる。

20

【0254】

特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーを、被験体に、静脈内（IV）または皮下（SC）投与する、すなわち、アンチセンスオリゴマーを、静脈へと静脈内投与もしくは静脈内送達するか、または皮膚と筋肉との間の脂肪層へと皮下投与もしくは皮下送達する。静脈内注射部位の非限定的な例は、腕、手、脚、または足の静脈を含む。皮下注射部位の非限定的な例は、腹部、大腿部、下方背部（lower back）、または上腕部を含む。例示的な実施形態では、アンチセンスオリゴマーのPMO形態、PMO-X形態、またはPPMO形態を、IV投与またはSC投与する。他の実施形態では、アンチセンスオリゴマーを、被験体に、筋内（IM）投与する、例えば、アンチセンスオリゴマーを、腕部の三角筋、脚部の外側広筋、腰部の腹側臀筋（ventrogluteal muscle）、または臀部の背側臀筋（dorsogluteal muscle）へと投与または送達する。

30

【0255】

ある特定の実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、経皮的な方法により（例えば、このようなアンチセンスオリゴマーを、任意選択で、リボソームへとパッケージングする、アンチセンスオリゴマーの、例えば、エマルジョンへの組込みを介して）送達することができる。送達のこのような経皮的な方法およびエマルジョン/リボソーム媒介型の方法は、アンチセンスオリゴマーの送達について、当技術分野、例えば、それらの全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,965,025号において記載されている。

40

【0256】

本明細書で記載されるアンチセンスオリゴマーはまた、植込み可能なデバイスを介して送達することもできる。このようなデバイスのデザインは、当技術分野で認知された工程であって、例えば、それらの全体において本明細書に参考として援用される、米国特許第6,969,400号において記載されている、例えば、合成インプラントデザインを伴う工程である。

【0257】

当技術分野で認知された技法（例えば、トランスフェクション、電気穿孔、融合、リボソーム、コロイド状ポリマー性粒子、およびウイルスベクターおよび非ウイルスベクター

50

のほか、当技術分野で公知の他の手段)を使用して、アンチセンスオリゴマーを、細胞へと導入することができる。選択される送達法は、少なくとも、オリゴマー化学、処置(処理)される細胞、および細胞の場所に依存し、そして当業者には明らかであろう。例えば、局在化は、表面上にリポソームを方向づける特異的なマーカーを伴うリポソーム、標的細胞を含有する組織への直接的な注射、特異的な受容体媒介型の取込みなどにより達成することができる。

【0258】

当技術分野で公知の通り、アンチセンスオリゴマーは、例えば、リポソーム媒介型の取込み、脂質コンジュゲート、ポリリシン媒介型の取込み、ナノ粒子媒介型の取込み、および受容体媒介型のエンドサイトーシスのほか、マイクロインジェクション、透過化(例えば、ストレプトリジンOによる透過化、アニオン性ペプチドによる透過化)、電気穿孔、およびエンドサイトーシス以外の多様な非侵襲性送達法であって、当技術分野で公知の送達法など、エンドサイトーシス以外のさらなる送達方式(参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、DokkaおよびRojanasakul、Advanced Drug Delivery Reviews、44巻、35~49頁(2000)を参照されたい)を伴う方法を使用して送達することができる。

【0259】

アンチセンスオリゴマーは、生理学的小および/または薬学的に許容される、任意の好都合なビヒクルまたは担体により投与することができる。このような組成物は、薬学的に許容される、様々な標準的担体であって、当業者により使用される担体のうちのいずれかを含みうる。例は、食塩水、リン酸緩衝食塩水(PBS)、水、水性エタノール、油/水エマルジョンまたはトリグリセリドエマルジョンなどのエマルジョン、錠剤、およびカプセルを含むがこれらに限定されない。生理学的小に許容される適切な担体の選出は、選出される投与方式に応じて変動するであろう。「薬学的に許容される担体」は、薬学的投与に適合性の担体など、任意で全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤を含むことを意図する。当技術分野では、薬学的に活性な物質のための、このような媒体および薬剤の使用が周知である。任意の従来の媒体または薬剤が、活性化化合物に不適合性である場合を除き、組成物中のその使用が想定される。補充の活性化化合物もまた、組成物へと組み込むことができる。

【0260】

本開示のアンチセンスオリゴマーは一般に、遊離酸または遊離塩基として活用することができる。代替的に、本開示の化合物は、酸付加塩または塩基付加塩の形態で使用することもできる。本開示の遊離アミノ化合物の酸付加塩は、当技術分野で周知の方法により調製することができ、有機酸および無機酸から形成することができる。適切な有機酸は、マレイン酸、フマル酸、安息香酸、アスコルビン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、シュウ酸、プロピオン酸、酒石酸、サリチル酸、クエン酸、グルコン酸、乳酸、マンデル酸、ケイ皮酸、アスパラギン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、グリコール酸、グルタミン酸、およびベンゼンスルホン酸を含む。

【0261】

適切な無機酸は、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、および硝酸を含む。塩基付加塩は、カルボン酸アニオンと共に形成される塩を含み、さらに、アルカリ金属およびアルカリ土類金属(例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、バリウム、およびカルシウム)から選択されるもののほか、アンモニウムイオンおよびその置換誘導体(例えば、ジベンジルアンモニウム、ベンジルアンモニウム、2-ヒドロキシエチルアンモニウムなど)などの、有機カチオンおよび無機カチオンと共に形成される塩を含む。こうして、「薬学的に許容される塩」という用語は、任意で全ての許容される塩形態を包含することを意図する。

【0262】

加えて、本開示の文脈にはまた、プロドラッグも含まれる。プロドラッグとは、このようなプロドラッグを、患者へと投与すると、in vivoにおいて、化合物を放出する

10

20

30

40

50

、共有結合した任意の担体である。プロドラッグは一般に、慣例的な操作により、または *in vivo* において、修飾が切断されて、親化合物をもたらすように、官能基を修飾することにより調製する。プロドラッグは、例えば、本開示の化合物であって、ヒドロキシ基、アミン基、またはスルフヒドリル基を、患者へと投与されると、切断されて、ヒドロキシ基、アミン基、またはスルフヒドリル基を形成する任意の基に結合させた化合物を含む。こうして、プロドラッグの代表例は、本開示のアンチセンスオリゴマーのアルコール官能基およびアミン官能基の、酢酸誘導体、ギ酸誘導体、および安息香酸誘導体を含む（がこれらに限定されない）。さらに、カルボン酸（ $-COOH$ ）の場合は、メチルエステル、エチルエステルなどのエステルも使用することができる。

【0263】

場合によって、リポソームを使用して、アンチセンスオリゴマーの、細胞への取込みを促進することもできる（例えば、Williams, S. A., *Leukemia*, 10 巻 (12 号): 1980~1989 頁、1996 年; Lappalainen, *Antiviral Res.*, 23 巻: 119 頁、1994 年; Uhlmann, *Antisense oligomers: a new therapeutic principle*, *Chemical Reviews*, 90 巻、4 号、25544~584 頁、1990 年; Gregoriadis, G., 14 章、*Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine*, 287~341 頁、Academic Press, 1979 年を参照されたい）。例えば、PCT 公開番号 WO 1993/01286 において記載されている通り、ヒドロゲルもまた、アンチセンスオリゴマーを投与するためのビヒクルとして使用することができる。代替的に、オリゴマーは、マイクロスフェアまたはマイクロ粒子により投与することもできる（例えば、Wu, G. Y. および Wu, C. H., *J. Biol. Chem.*, 262 巻: 4429~4432 頁、301987 年を参照されたい）。代替的に、米国特許第 6,245,747 号において記載されている通り、アンチセンスオリゴマーと複合体化させたガス充填マイクロバブルの使用によっても、標的組織への送達を増強することができる。持続放出組成物もまた、使用することができる。これらは、フィルムまたはマイクロカプセルなどの成形品の形態にある半透性ポリマーマトリクスを含みうる。かかる文献の各々は、その全体が本明細書において参考として援用される。

【0264】

一実施形態では、アンチセンスオリゴマーを、適切な医薬担体中で、栄養障害型表皮水疱症および関連障害の症状を呈示する哺乳動物被験体、例えば、ヒトまたは飼育動物へと投与する。方法についての一態様では、被験体は、ヒト被験体、例えば、栄養障害型表皮水疱症および関連障害を有すると診断された患者である。好ましい一実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、薬学的に許容される担体中に含有され、経口送達される。別の好ましい実施形態では、オリゴマーは、薬学的に許容される担体中に含有され、静脈内（*i.v.*）送達される。

【0265】

一実施形態では、アンチセンス化合物を、少なくとも 200~400 nM のアンチセンスオリゴマーのピーク血中濃度を結果としてもたらすのに有効な量および様式で投与する。一般に、約 1~2 週間にわたり、定期的な間隔で、1 または複数の用量のアンチセンスオリゴマーが投与されることが典型的である。経口投与に好ましい用量は、70 kg 当たりのオリゴマー約 1~1000 mg である。場合によって、患者 1 人当たりのオリゴマー 1000 mg を超える用量が必要でありうる。*i.v.* 投与では、好ましい用量は、70 kg 当たりのオリゴマー約 0.5~1000 mg である。アンチセンスオリゴマーは、短期間にわたり、定期的な間隔で、例えば、2 週間またはこれ未満にわたり、毎日投与することができる。しかし、場合によって、オリゴマーを、より長期間にわたり、間欠的に投与する。投与は、抗生剤または他の治療的処置の投与が後続する場合もあり、これらと共時的な場合もある。処置レジメンは、処置下の被験体についての、イムノアッセイ、他の生化学的検査および生理学的精査の結果に基づき指示される通りに、調整することがで

きる（用量、頻度、経路など）。

【0266】

本開示のアンチセンスオリゴマーを使用する、*in vivo*における有効な処置レジメンは、持続期間、用量、頻度、および投与経路のほか、処置下の被験体の状態（すなわち、限局感染または全身感染にตอบสนองした投与と対比した予防的投与）に従い変化させることができる。したがって、このような*in vivo*における治療は、最適な治療転帰を達成するために、処置下にある特定の種類の障害に適切な検査によるモニタリング、および用量または処置レジメンにおける対応する調整を要請することが多いであろう。

【0267】

処置は、例えば、当技術分野で公知の、疾患についての一般的な指標によりモニタリングすることができる。*in vivo*において投与される、アンチセンスオリゴマーの効能は、アンチセンスオリゴマーの投与前、投与時、および投与後に、被験体から採取される生物学的試料（組織、血液、尿など）により決定することができる。このような試料についてのアッセイは、（１）当業者に公知の手順、例えば、電気泳動によるゲル移動度アッセイを使用して、標的配列および非標的配列とのヘテロ二重鎖形成の存在または非存在についてモニタリングすること；（２）RT-PCR、ノーザンブロット法、ELISA、またはウェスタンブロット法などの標準的技法により決定される、基準のエクソン80を含有するヒトVII型コラーゲンmRNAとの関係で、ヒトVII型コラーゲンエクソン80を含まないmRNAの量をモニタリングすることを含む。

【0268】

一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、哺乳動物細胞により、能動的に取り込まれる。さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴマーを、本明細書で記載される輸送部分（例えば、輸送ペプチドまたはCPP）に共有結合させて、このような取込みを促進することができる。多様な実施形態では、輸送部分は、表3に提供されるとおりのリンカーを排除する配列を含む、アルギニンに富むペプチド輸送体を含みうる。

【0269】

VII. 投薬

治療用組成物の製剤化およびそれらのその後における投与（投薬）は、当業者の技術の範囲内にあると考えられる。投薬は、処置される疾患状態の重症度および応答性に依存し、処置の過程は、数日間から数カ月間にわたり持続するか、または治癒がなされるか、もしくは疾患状態の減殺が達成されるまで持続する。最適の投薬スケジュールは、患者の体内の薬物蓄積の測定値から計算することができる。当業者は、最適の投与量、投薬法、および反復速度を容易に決定することができる。最適の投与量は、個々のオリゴマーの相対的効力に応じて変動させることができ、一般に、*in vitro*および*in vivo*の動物モデルにおいて有効であることが見出されているEC50に基づき推定することができる。一般に、投与量は、体重1kg当たり0.01μg~100gであり、毎日、毎週、毎月、もしくは毎年1回もしくは複数回にわたり、なおまたは2~20年間ごとに1回施すことができる。当業者は、体液中または組織内の、薬物の測定された滞留時間および濃度に基づき、投薬の反復速度を、容易に推定することができる。処置が成功した後、患者に、疾患状態の再発を防止する維持療法であって、オリゴマーを、経口投与のためには、体重70kg当たり1~1000mgのオリゴマー、または*i.v.*投与のためには、体重70kg当たり0.5mg~1000mgのオリゴマーの範囲の維持用量で、毎日1回または複数回~20年ごとに1回投与する維持療法を受けさせることが望ましい場合がある。

【0270】

その実施形態のうちのいくつかに従い、本開示について具体的に記載してきたが、以下の実施例は、本開示を例示することだけに資するものであり、これを限定することを意図するものではない。本出願で列挙される、参考文献、特許、特許出願、GenBank受託番号などの各々は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。

【実施例】

10

20

30

40

50

【0271】

VII. 実施例

(実施例1)

アンチセンスオリゴマーのデザインおよび製造

本開示のアンチセンスオリゴマーを、ヒトVII型コラーゲンプレmRNA転写物のエクソン80/イントロン80スプライス接合部にわたる標的領域に結合するようにデザインして、以下のプロトコルを使用して調製した。

【0272】

トリチルピペラジンフェニルカルバメート35の調製(図2A):ジクロロメタン中の化合物11の冷却懸濁物(6mL/gの11)に、水中の炭酸カリウム(3.2当量)溶液(4mL/gの炭酸カリウム)を添加した。この2相混合物に、ジクロロメタン中のクロロギ酸フェニル(1.03当量)溶液(2g/gのクロロギ酸フェニル)を、ゆっくりと添加した。反応混合物を、20℃へと温めた。反応が完了したら(1~2時間)、層を分離した。有機層を、水で洗浄し、無水炭酸カリウムで乾燥させた。生成物35を、アセトニトリルからの結晶化により単離した。

10

【0273】

カルバメートアルコール36の調製:水素化ナトリウム(1.2当量)を、1-メチル-2-ピロリジノン(32mL/gの水素化ナトリウム)中に懸濁させた。この懸濁物に、トリエチレングリコール(10.0当量)および化合物35(1.0当量)を添加した。結果として得られるスラリーを、95℃へと加熱した。反応が完了したら(1~2時間)、混合物を、20℃へと冷却した。この混合物に、30%のジクロロメタン/メチルtert-ブチルエーテル(v:v)および水を添加した。生成物を含有する有機層を、水性NaOH、水性コハク酸、および飽和水性塩化ナトリウムで、逐次洗浄した。生成物36を、ジクロロメタン/メチルtert-ブチルエーテル/ヘプタンからの結晶化により単離した。

20

【0274】

テール型酸(Tail acid)37の調製:テトラヒドロフラン中の化合物36の溶液(7mL/gの36)に、無水コハク酸(2.0当量)およびDMAp(0.5当量)を添加した。混合物を、50℃へと加熱した。反応が完了したら(5時間)、混合物を、20℃へと冷却し、水性NaHCO₃により、pH8.5へと調整した。メチルtert-ブチルエーテルを添加し、生成物を、水性層へと抽出した。ジクロロメタンを添加し、混合物を、水性クエン酸により、pH3へと調整した。生成物を含有する有機層を、クエン酸緩衝液と、飽和水性塩化ナトリウムとの、pH=3の混合物で洗浄した。この37のジクロロメタン溶液を、単離せずに、化合物38の調製において使用した。

30

【0275】

38の調製:化合物37の溶液に、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボン酸イミド(HONB)(1.02当量)、4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)(0.34当量)を添加し、次いで、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミドヒドロクロリド(EDC)(1.1当量)を添加した。混合物を、55℃へと加熱した。反応が完了したら(4~5時間)、混合物を、20℃へと冷却し、1:1の0.2Mクエン酸/ブラインおよびブラインで、逐次洗浄した。ジクロロメタン溶液に、アセトンへの溶媒交換、次いで、N,N-ジメチルホルムアミドへの溶媒交換を施し、生成物を、アセトン/N,N-ジメチルホルムアミドからの、飽和水性塩化ナトリウムへの沈殿により単離した。粗生成物を、水中で、複数回にわたり、再スラリー化させて、残留するN,N-ジメチルホルムアミドおよび塩を除去した。

40

【0276】

活性化「テール」の、アンカーロード樹脂への導入は、固相合成におけるサブユニットの組み込みのために使用される手順により、ジメチルイミダゾリジノン(DMI)中で実施した。

【0277】

50

モルホリノベースのオリゴマーの合成のための固体支持体の調製：この手順は、粗い多孔性（ $40 \sim 60 \mu\text{m}$ ）のガラスフリット、オーバーヘッド攪拌機、および、フリットを介して N_2 を沸騰させるかまたは真空抽出を可能とする、Teflon製の三方止め栓を伴う、シラン化、ジャケット付きのペプチド容器（ChemGlass、NJ、USA）内で実施した。

【0278】

以下の手順における樹脂処理／洗浄ステップは、2つの基本的な操作からなる：樹脂流動化または攪拌床樹脂反応器および溶媒／溶液抽出。樹脂の流動化のために、フリットを通して N_2 の逆流（flow up）を可能とするように、止め栓を位置付け、指定の樹脂処理／洗浄液を、反応器へと添加し、樹脂を透過化させ、完全に湿潤させた。次いで、混合を開始し、指定の回数にわたり、樹脂スラリーを混合した。溶媒／溶液抽出のために、混合および N_2 の流れを停止させ、真空ポンプを始動させ、次いで、樹脂処理／洗浄液を排出して廃棄することを可能とするように、止め栓を位置付けた。そうでないことが注記されない限りにおいて、樹脂処理／洗浄液の全容量は、樹脂1g当たり15mLであった。

【0279】

シラン化、ジャケット付きのペプチド容器内のアミノメチルポリスチレン樹脂（100～200メッシュ；窒素置換に基づき、1g当たり約1.0mmolのロード；75g、1当量、Polymer Labs、UK、型番：1464-X799）に、1-メチル-2-ピロリジノン（NMP；樹脂1g当たり20mL）を添加し、樹脂を、混合しながら、1～2時間にわたり膨潤させた。膨潤溶媒（swell solvent）の排出後、樹脂を、ジクロロメタン（ $2 \times 1 \sim 2$ 分間）、25%のイソプロパノール／ジクロロメタン中に5%のジイソプロピルエチルアミン（ $2 \times 3 \sim 4$ 分間）、およびジクロロメタン（ $2 \times 1 \sim 2$ 分間）で洗浄した。最終洗浄液を排出した後、樹脂を、1-メチル-2-ピロリジノン中の、ジスルフィドアンカー34溶液（0.17M；樹脂1g当たり15mL、約2.5当量）で処理し、樹脂／試薬混合物を、45℃で60時間にわたり加熱した。反応が完了したら、加熱を中断し、アンカー溶液を排出し、樹脂を、1-メチル-2-ピロリジノン（ $4 \times 3 \sim 4$ 分間）およびジクロロメタン（ $6 \times 1 \sim 2$ 分間）で洗浄した。樹脂を、ジクロロメタン中に10%（v/v）のジエチルジカーボネート溶液（16mL/g； $2 \times 5 \sim 6$ 分間）で処理し、次いで、ジクロロメタン（ $6 \times 1 \sim 2$ 分間）で洗浄した。樹脂39（図2Bを参照されたい）を、 N_2 流下で、1～3時間にわたり、次いで、真空下で、一定の重量（ $\pm 2\%$ ）まで乾燥させた。収率：元の樹脂重量の110～150%。

【0280】

アミノメチルポリスチレン-ジスルフィド樹脂のローディングの決定：樹脂のローディング（潜在的に利用可能な反応性部位の数）は、分光アッセイにより、樹脂1グラム当たりのトリフェニルメチル（トリチル）基の数について決定する。

【0281】

公知の重量（ $25 \pm 3 \text{mg}$ ）の乾燥樹脂を、25mLのシラン化メスフラスコへと移し、ジクロロメタン中に2%（v/v）のトリフルオロ酢酸約5mLを添加する。内容物を、静かな回旋により混合し、次いで、30分間にわたり静置する。容量を、ジクロロメタン中に2%（v/v）の、さらなるトリフルオロ酢酸により、25mLへと増量し、内容物を、完全に混合した。容積型ピペット（positive displacement pipette）を使用して、トリチル含有溶液（500 μL ）のアリコートをし、10mLのメスフラスコへと移し、容量を、メタンスルホン酸により、10mLへと増量する。

【0282】

最終溶液中のトリチルカチオン含量は、431.7nmにおけるUV吸光度により測定し、樹脂のローディングは、適切な容量、希釈率、消衰係数（ $41 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ）、および樹脂重量を使用して、樹脂1グラム当たりのトリチル基（ $\mu\text{mol} / \text{g}$ ）

により計算する。アッセイは、三連で実施し、平均ローディングを計算する。

【0283】

本実施例における樹脂のローディング手順により、約 $500 \mu\text{mol/g}$ のローディングを有する樹脂を提供する。ジスルフィドアンカーの組込みステップを、室温で24時間にわたり実施する場合、 $\mu\text{mol/g}$ 単位で300～400のローディングが得られた。

【0284】

テールローディング：アミノメチルポリスチレン - ジスルフィド樹脂を調製するための設定および容量と同じ設定および容量を使用して、テールを、固体支持体へと導入することができる。アンカーロード樹脂をまず、酸性条件下で脱保護し、結果として得られる材料を中性化させてから、カップリングした。カップリングステップのために、ジスルフィドアンカー溶液の代わりに、4 - エチルモルホリン (NEM、0.4 M) を含有するDMI中の、38の溶液 (0.2 M) を使用した。45 で2時間後、樹脂39を、25%のイソプロパノール / ジクロロメタン中に5%のジイソプロピルエチルアミンで2回にわたり洗浄し、DCMで1回洗浄した。樹脂に、安息香酸無水物 (0.4 M) およびNEM (0.4 M) の溶液を添加した。25分後、反応器ジャケットを、室温へと冷却し、樹脂を、25%のイソプロパノール / ジクロロメタン中に5%のジイソプロピルエチルアミンで、2回にわたり洗浄し、DCMで、8回にわたり洗浄した。樹脂40を濾過し、高真空下で乾燥させた。樹脂40に対するローディングは、テールローディングにおいて使用した、元のアミノメチルポリスチレン - ジスルフィド樹脂39のローディングであると規定する。

【0285】

固相合成：モルホリノベースのオリゴマーは、Gilson AMS - 422 Automated Peptide Synthesizer上、2 mLのGilsonポリプロピレン反応カラム (型番：3980270) 内で調製した。カラムを合成器に静置するとき、カラムの周囲に、水流のためのチャンネルを伴うアルミニウム製のブロックを入れた。AMS - 422は、代替的に、試薬 / 洗浄液を添加し、指定された時間にわたり保持し、真空を使用して、カラムを排気する。

【0286】

最大で約25サブユニットの長さの範囲のオリゴマーでは、ローディングを、樹脂1 g当たり約 $500 \mu\text{mol}$ とする、アミノメチルポリスチレン - ジスルフィド樹脂が好ましい。より大型のオリゴマーでは、ローディングを、樹脂1 g当たり300～400 μmol とする、アミノメチルポリスチレン - ジスルフィド樹脂が好ましい。5' テールを伴う分子が所望される場合も、同じローディング指針により、テールでローディングした樹脂を選択する。

【0287】

以下の試薬溶液を調製した。

脱トリチル化溶液：4 : 1 ジクロロメタン / アセトニトリル中に、10%のシアノ酢酸 (w/v) ; 中性化溶液：3 : 1 のジクロロメタン / イソプロパノール中に、5%のジイソプロピルエチルアミン ; カップリング溶液：所望の塩基型および連結型を有する、0.18 M (または20サブユニットより長くなったオリゴマーには、0.24 M) の活性化モルホリノサブユニット、ならびに1, 3 - ジメチルイミダゾリジノン中に、0.4 MのNエチルモルホリン。ジクロロメタン (DCM) を、異なる試薬溶液の洗浄を隔てる、一過性洗浄液として使用した。

【0288】

ブロックを42 に設定した合成器上で、30 mgのアミノメチルポリスチレン - ジスルフィド樹脂 (またはテール樹脂) を含有する各カラムに、2 mLの1 - メチル - 2 - ピロリジノンを添加し、室温で、30分間にわたり静置した。2 mLのジクロロメタンで、2回にわたる洗浄の後、以下の合成サイクルを使用した。

【0289】

【表 4】

表 4

ステップ	容量	送達	保持時間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
脱トリチル化	1.5 mL	マニホールド	15 秒間
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
カップリング	350～ 500uL	シリンジ	40 分間
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
中性化	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒間
DCM	1.5 mL	マニホールド	30 秒間

10

20

30

40

【 0 2 9 0 】

各カラムが、適正な配列の、適正なカップリング溶液（A、C、G、T、I）を受容するように、個々のオリゴマーの配列を、合成器へとプログラムした。カラム内のオリゴマーが、その最終的なサブユニットの組込みを完了したら、カラムを、ブロックから取り出し、0.89 M の 4 - エチルモルホリンを含有する、4 - メトキシトリフェニルメチルクロリド（DMI 中に 0.32 M）を含むカップリング溶液により、最終サイクルを、手動で実施した。

50

【0291】

樹脂からの切断ならびに塩基および保護基の除去：メトキシトリチル化の後、樹脂を、2 mLの1 - メチル - 2 - ピロリジノンで、8回にわたり洗浄した。1 - メチル - 2 - ピロリジノン中に、0.1 Mの1, 4 - ジチオトレイトール (DTT) および0.73 Mのトリエチルアミンを含む、1 mLの切断溶液を添加し、カラムに蓋をし、室温で、30分間にわたり静置した。この時間の後、溶液を、12 mLのWheatonバイアルへと排出した。大幅に縮んだ樹脂を、300 μ Lの切断溶液で、2回にわたり洗浄した。溶液に、4.0 mLの濃縮アンモニア水 (-20 で保存された) を添加し、バイアルにきつく蓋をし (テフロン (登録商標) 加工のねじ蓋により)、混合物を回旋にかけて、溶液をミックスした。バイアルを、45 のオープンに、16 ~ 24時間にわたり入れて、塩基および保護基の切断を行った。

10

【0292】

粗生成物の精製：バイアルに入れた (vial ed) アンモノリシス溶液を、オープンから取り出して、室温へと冷却した。溶液を、20 mLの0.28%の水性アンモニアで希釈し、Macroprep HQ樹脂 (BioRad) を含有する、2.5 x 10 cmのカラムに通した。塩勾配 (A: 0.28%のアンモニアに、B: 0.28%のアンモニア中に1 Mの塩化ナトリウムを伴う; 60分間でBを0 ~ 100%とする) を使用して、メトキシトリチルを含有するピークを溶出させた。合わせた画分をプールし、所望される生成物に応じて、さらに加工した。

【0293】

モルホリノベースのオリゴマーの脱メトキシトリチル化：Macroprepによる精製からプールされた画分を、1 MのH₃PO₄で処理して、pHを2.5へと低下させた。初期の混合の後、試料を、室温で4分間にわたり静置し、この時間に、それらを、2.8%のアンモニア/水で、pH 10 ~ 11へと中性化させる。生成物は、固相抽出 (SPE) により精製した。

20

【0294】

SPEカラムのパッキングおよびコンディショニング：Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) (3 mL) を、20 mLのフリットカラム (BioRad Econo-Pac Chromatography Columns (732 ~ 1011)) へとパッキングし、樹脂を、3 mLの以下のもの：0.28%のNH₄OH / 80%のアセトニトリル; 0.5 MのNaOH / 20%のエタノール; 水; 50 mMのH₃PO₄ / 80%のアセトニトリル; 水; 0.5 MのNaOH / 20%のエタノール; 水; 0.28%のNH₄OHですすいだ。

30

【0295】

SPEの精製：脱メトキシトリチル化からの溶液を、カラムへとロードし、樹脂を、0.28%の水性アンモニア3 ~ 6 mLで、3回にわたりすすいだ。Wheatonバイアル (12 mL) を、カラムの下に置き、生成物を、0.28%の水性アンモニア中に、45%のアセトニトリル2 mLで2回にわたる洗浄により溶出させた。

【0296】

生成物の単離：溶液を、ドライアイス内で凍結させ、バイアルを凍結乾燥機に入れて、綿毛状の白色粉末をもたらした。試料を、水中に溶解させ、シリンジを使用して、0.22ミクロンのフィルター (Pall Life Sciences, Acrodisc 25 mmシリンジフィルターに、0.2ミクロンのHT Tuffryn膜を伴う) を通して濾過し、UV分光光度計上で、光学濃度 (OD) を測定して、存在するオリゴマーのOD単位を決定したほか、試料を解析のために分注した。次いで、凍結乾燥させるために、溶液を、Wheatonバイアルに戻した。

40

【0297】

MALDIによる、モルホリノベースのオリゴマーについての解析：MALDI-TOF質量分析を、使用して、精製物中の画分の組成を決定したほか、オリゴマーの正体の証拠 (分子量) ももたらした。マトリックスとしての、3, 5 - ジメトキシ - 4 - ヒドロキ

50

シケイ皮酸（シナピン酸）、3, 4, 5 - トリヒドロキシアセトフェノン（THAP）、またはアルファ - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸（HCCA）の溶液による希釈後に、試料を試行にかけた。

【0298】

（実施例2）

アンチセンスオリゴマーについての *in vitro* 研究

in vitro 実験を実施して、上記で記載した通りにデザインおよび調製されたアンチセンスオリゴマーが、エクソン80を含有するヒトVII型コラーゲンプレmRNAの発現を減少させて、機能的なヒトVII型コラーゲンの発現を増加させる能力について探索した。言及した実験では、正常なヒト皮膚成体線維芽細胞（HDFa細胞；cat# C-013-5C、Cascade Biologics (Life Technologies；グランドアイランド、NY) および正常なヒト上皮成体ケラチノサイト（HEKa細胞；cat# C-005-5C、Cascade (Biologics, Life Technologies；グランドアイランド、NY) の両方を使用した。HDFa細胞またはHEKa細胞に、SGヌクレオフェクター溶液中またはP3ヌクレオフェクター溶液中のそれぞれに、10、3、1、および0.3 μMのアンチセンスオリゴマーをヌクレオフェクトし、5%のCO₂を伴う37℃で、終夜インキュベートした。全RNAを、細胞から単離し、プライマーである、DEB 79 FWD Set 2 (5' TAC CAG GAG AGC GTG GTA T 3'；配列番号25)と、DEB 83 REV Set 2 (5' GTC CTG GAG GTC CTG TCT 3'；配列番号26)とを使用して、RT-PCRを実施した。エクソン80スキッピングパーセントを決定するように、LabChip Caliperを使用して、増幅された試料を解析した。GraphPad Prismにおける非線形回帰解析を使用して、EC50値を決定した。EC50値は、被験PMOが、50%のエクソンスキッピングを誘導する濃度を表す。

【0299】

エクソン80 / イントロン80接合部（スプライスドナー部位）を含むヒトVII型コラーゲン遺伝子（COL7A1）のエクソン80を標的とするようにデザインされた、第1シリーズのアンチセンスオリゴマーを合成し、上記で記載した正常なヒト皮膚成体線維芽細胞（HDFa）および正常なヒト上皮成体ケラチノサイト（HEKa）を処理するのに使用した。本開示のアンチセンスオリゴマーは、Col7a1-1、Col7a1-2、Col7a1-3、およびCol7a1-4を含み、化合物Col7a1-5、Col7a1-6、およびCol7a1-7と比較した。これらは全て、以下の表5に記載する。

【0300】

図3（HDFa）および図4（HEKa）に示される通り、本開示に従うアンチセンスオリゴマー（Col7a1-1、Col7a1-2、Col7a1-3、およびCol7a1-4）は、エクソン80スキッピングを引き起こすのに特に有効であり、先行技術において公知の配列を含むアンチセンスオリゴマー（Col7a1-7（-02+22）；配列番号8；国際公開第WO2013/053819号）、エクソン80 / イントロン80接合部にハイブリダイズしないターゲティング配列を含むアンチセンスオリゴマー（Col7a1-6 D（-05-26）ターゲティング配列 配列番号5）、およびCol7a1-5 D（+17-02）（ターゲティング配列 配列番号7））と比較して改善された活性を示した。

【0301】

【表 5】

表 5:エクソン 80 アンチセンスオリゴマー

化合物 名称	標的エリア	配列 5'→3'*	配列 番号	5'末端	3'末端
Col7a1-1	D(+34-19)	AAGGTTCTTGGGTACTCACCAC	4	EG3	H
Col7a1-2	D(+31-16)	GTTCTTGGGTACTCACCCTGG	3	EG3	H
Col7a1-3	D(+24-09)	GGTACTCACCCTGGGCCAGIG	6	EG3	H
Col7a1-4	D(+27-12)	TTGGGTACTCACCCTGGGCCA	2	EG3	H
Col7a1-7	A(-02+22)	GGCCTCTTGGACCCTGCAGACC CT	8	EG3	H
Col7a1-6	D(-05-26)	ACAGGTGAAGGTTCTTGGGTAC	5	EG3	H
Col7a1-5	D(+17-02)	ACCACTGIGCCAGIGIGICCTC	7	EG3	H

*配列中、チミン(T)塩基は、ウラシル(U)塩基であってもよく、「I」はイノシンである

【 0 3 0 2 】

Col7a1-7 についての EC50 値と比較した場合の化合物 Col7a1-1、Col7a1-2、Col7a1-3、および Col7a1-4 の EC50 値を、以下の表 6 に示す。

【 0 3 0 3 】

【表 6】

表 6:EC50 値

化合物 名称	標的エリア	配列 5'→3'*	配列 番号	5'末端	3'末端	HDFa EC50	HEKa EC50
Col7a1-1	D(+34-19)	AAGGTTCTTGGGTACTCACCAC	4	EG3	H	0.14	0.05
Col7a1-2	D(+31-16)	GTTCTTGGGTACTCACCCTGG	3	EG3	H	0.46	0.11
Col7a1-3	D(+24-09)	GGTACTCACCCTGGGCCAGIG	6	EG3	H	2.75	0.66
Col7a1-4	D(+27-12)	TTGGGTACTCACCCTGGGCCA	2	EG3	H	1.99	0.73
Col7a1-7	A(-02+22)	GGCCTCTTGGACCCTGCAGACC CT	8	EG3	H	3.07	0.86

*配列中、チミン(T)塩基は、ウラシル(U)塩基であってもよく、「I」はイノシンである

【 0 3 0 4 】

本明細書で開示される配列を、下記の表 7 に、さらに列挙する。

【 0 3 0 5 】

【表 7 - 1】
表 7 -配列表

名称	配列 (5'-3')*	配列番号
エクソン 80/ イントロン 80	GGTCTGCAGGGTCCAAGAGGCCCCCTGGCC CAGTG/GTGAGTACCCAAGAACCTTCACCTGT C	1
Col7a1-4 D(+27-12)	XXGGGXACXCACCACXGGGCCA	2
Col7a1-2 D(+31-16)	GXXCXXGGGXACXCACCACXGG	3
Col7a1-1 D(+34-19)	AAGGXXCXXGGGXACXCACCAC	4
Col7a1-6 D(-05-26)	ACAGGXGAAGGXXCXXGGGXAC	5
Col7a1-3 D(+24-09)	GGXACXCACCACXGGGCCAGIG	6
Col7a1-5 D(+17-02)	ACCACXGIGCCAGIGIGICCXC	7
Col7a1-7 A(-02+22)	GGCCXCXXGGACCCXGCAGACCCX	8
rTAT	RRRQRRKKR	9
Tat	RKKRRQRRR	10
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFF	11
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRRFFRRRR	12
R ₄	RRRR	13
R ₅	RRRRR	14
R ₆	RRRRRR	15
R ₇	RRRRRRR	16
R ₈	RRRRRRRR	17
R ₉	RRRRRRRRR	18
(RX) ₈	RXXRXRXRXRXRXRX	19
(RAhxR) ₄ ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	20

10

20

30

40

【表 7 - 2】

(RAhxR) ₅ ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	21
(RAhxRRBR) ₂ ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	22
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRARFF	23
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRRGRRGRFF	24
DEB 79 FWD Set 2	TAC CAG GAG AGC GTG GTA T	25
DEB 83 REV Set 2	GTC CTG GAG GTC CTG TCT	26

*配列中、X は、チミンおよびウラシルから選択され、チミン(T)塩基は、ウラシル(U)塩基であってもよく、「I」はイノシンである

10

【図 1 A】

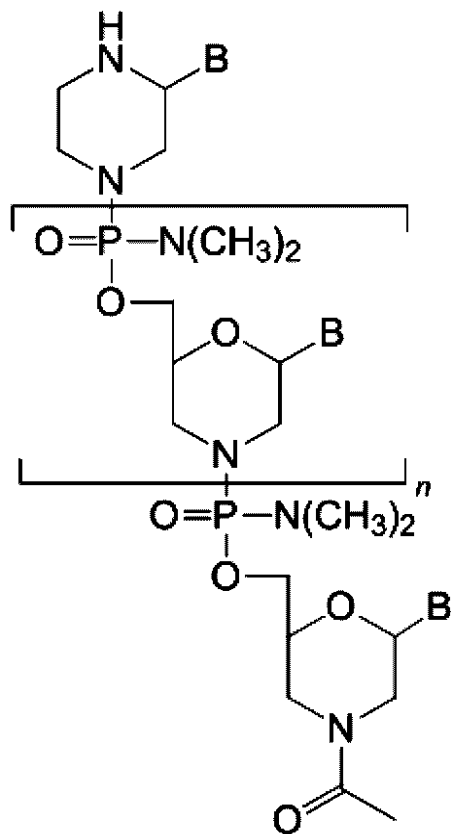


FIG 1A

【図 1 B】

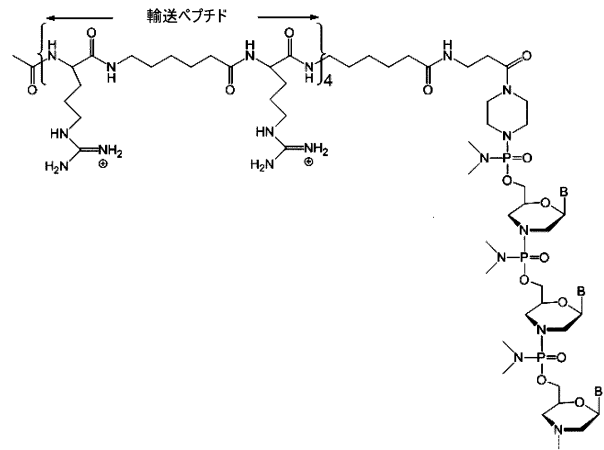


FIG 1B

【図 1 C】

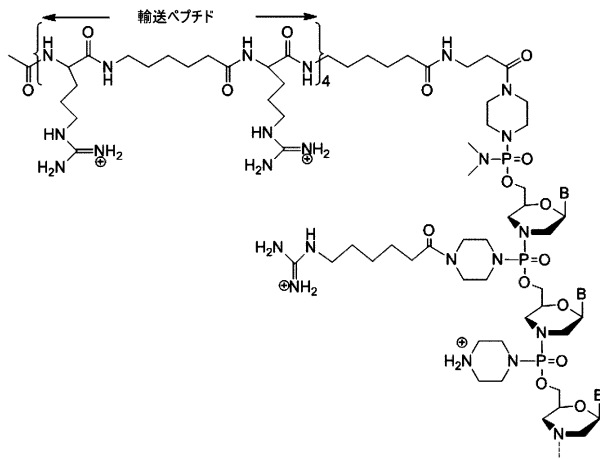


FIG 1C

【図 1 D - G】

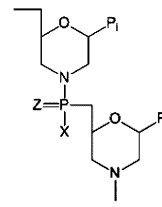


FIG 1D

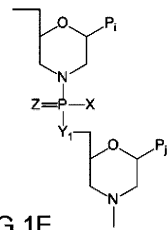


FIG 1E

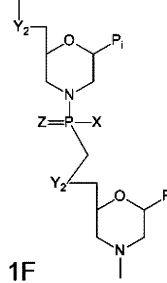


FIG 1F

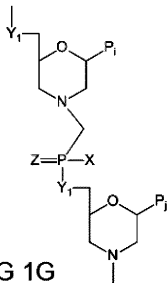


FIG 1G

【図 2 A】

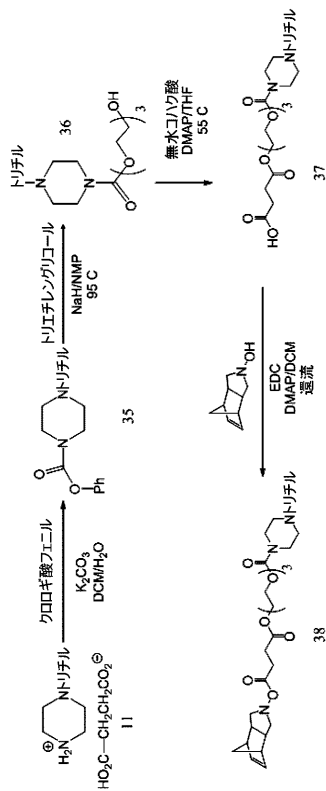


FIG 2A

【図 2 B】

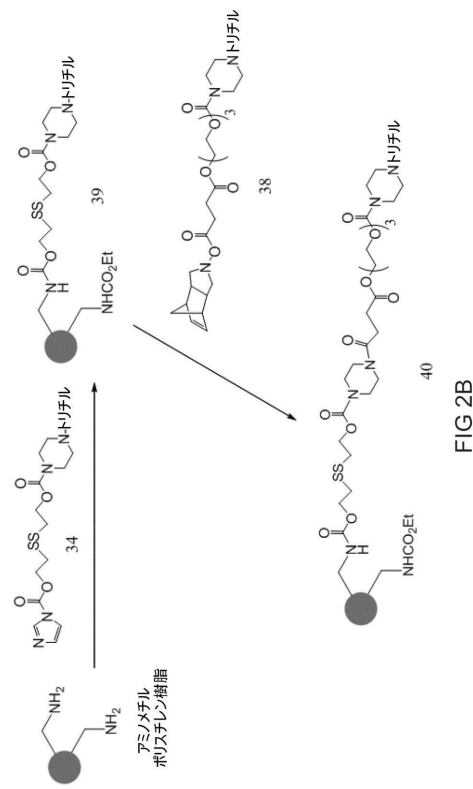


FIG 2B

【 図 3 】

HDFaにおけるDEB EX 80 PMOスクリーニング

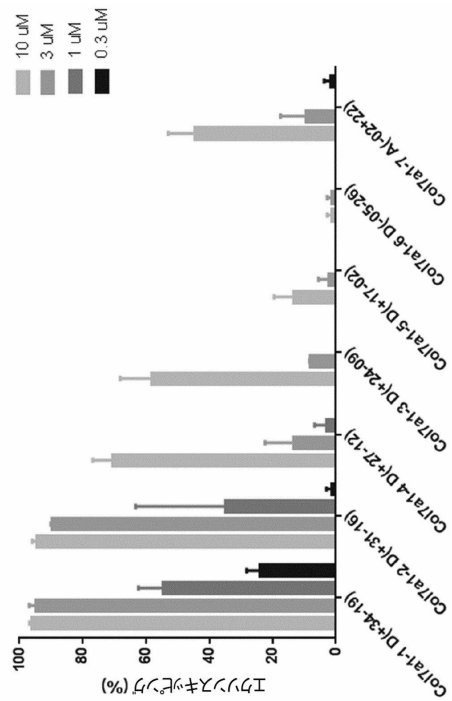


FIG. 3

【 図 4 】

HEKaにおけるDEB EX 80 PMOスクリーニング

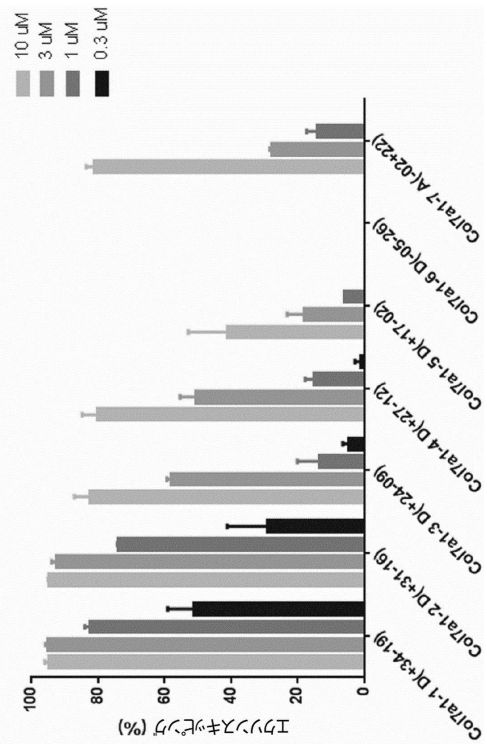


FIG. 4

【 配列表 】

[0006873052000001.app](#)

[0006873052000002.xml](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 8 G 79/02 (2016.01) C 0 8 G 79/02

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 モーリッチ, ダン ブイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ, ファースト ストリート
2 1 5

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 3 8 1 9 (WO , A 1)

特表 2 0 1 5 - 5 0 5 8 3 9 (JP , A)

特表 2 0 1 8 - 5 1 5 1 2 2 (JP , A)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 2 5 3 8 (WO , A 1)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 8 5 0 4 1 (WO , A 1)

GENOMICS , 1 9 9 4 年 , vol.21 , p.169-179

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 8 G 7 9 / 0 2

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