

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-509242
(P2025-509242A)

(43)公表日 令和7年4月11日(2025.4.11)

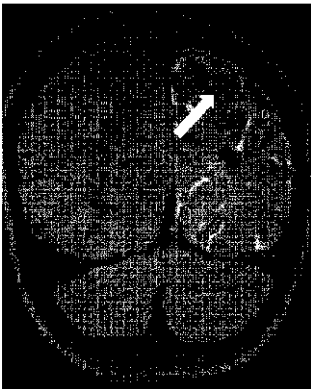
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00		4 C 0 8 4
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00		4 C 0 8 5
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 6
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全97頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-553192(P2024-553192)			(71)出願人	519041013
(86)(22)出願日	令和5年3月7日(2023.3.7)				ザ フランシス クリック インスティテ
(85)翻訳文提出日	令和6年10月9日(2024.10.9)				ュート リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/055817				The Francis Crick I
(87)国際公開番号	WO2023/170109				nstitute Limited
(87)国際公開日	令和5年9月14日(2023.9.14)				イギリス NW1 1AT グレーター ロ
(31)優先権主張番号	2203164.5				ンドン ロンドン ミッドランド ロード 1
(32)優先日	令和4年3月7日(2022.3.7)				1 Midland Road Lond
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)				on Greater London N
(31)優先権主張番号	2203233.8				W1 1AT United Kingd
(32)優先日	令和4年3月8日(2022.3.8)			(74)代理人	110000796
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)				弁理士法人三枝国際特許事務所
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ			(72)発明者	キンズラー ペロニカ
		最終頁に続く			イギリス国 NW1 1AT グレーター
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 GNAQ及びGNA11駆動疾患の治療方法

(57)【要約】

本発明は、がん、スタージ・ウェーバー症候群（SW S）、色素血管母斑症（PPV）、広範囲皮膚黒色症（EDM）、及び先天性血管腫（急速退縮性先天性血管腫（RICH）、部分退縮性先天性血管腫（PICH）、及び非退縮性先天性血管腫（NICH）を含む）を含む、GNAQ及びGNA11体細胞変異から生じる臨床状態を治療する新規組成物及び方法に関する。

Figure 1B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

10～50個の連結されたヌクレオシドの第1の鎖を含む核酸分子であって、前記第1の鎖が、GNAQ又はGNA11をコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、核酸分子。

【請求項 2】

前記第1の鎖が、GNAQの機能獲得バリエーションをコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、いずれかの先行請求項に記載の核酸分子。

【請求項 3】

前記第1の鎖が、GNA11の機能獲得バリエーションをコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記第1の鎖が、20～25個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行請求項に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記第1の鎖が、21個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行請求項に記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記第1の鎖が、バリエーションGNAQ p.(R183Q)、p.(R183G)、p.(R183L)、又はp.(R183*)をコードするmRNAの等長部分と少なくとも95%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、請求項1、2、4、又は5のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 7】

前記核酸分子が、インビトロでのバリエーションGNAQ p.(R183Q/G/L/*)の発現を少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%阻害することができる、請求項1、2、又は4～6のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記核酸分子が、インビトロでの野生型GNAQの発現の阻害と比較して、インビトロでのバリエーションGNAQ p.(R183Q/G/L/*)の発現をより大きな程度で阻害する、請求項1、2、又は4～7のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 9】

前記バリエーションGNAQ p.(R183Q)が、GNAQゲノム配列におけるc.G548A変異によって引き起こされる、請求項1、2、又は4～8のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 10】

前記第1の鎖が、配列番号13～18からなる群から選択される配列と少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の同一性を有する配列を含む、請求項9に記載の核酸分子。

【請求項 11】

前記第1の鎖が、バリエーションGNA11 p.(R183C)又はp.(R183H)をコードするmRNAの等長部分と少なくとも95%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、請求項1又は3～5のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 12】

前記核酸分子が、インビトロでのバリエーションGNA11 p.(R183C/H)の発現を少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%阻害することができる、請求項1、3～5、又は11のいずれか一項に記載の核酸分子。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

前記核酸分子が、インビトロでの野生型 GNA11 の発現の阻害と比較して、インビトロでのバリエーション GNA11 p. (R183C/H) の発現をより大きな程度で阻害する、請求項 1、3～5、又は 11～12 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 14】

前記バリエーション GNA11 p. (R183C) が、GNA11 ゲノム配列における c. C547T 変異によって引き起こされる、請求項 1、3～5、又は 11～13 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 15】

前記第 1 の鎖が、配列番号 19～24 からなる群から選択される配列と少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、又は少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含む、請求項 14 に記載の核酸分子。

【請求項 16】

前記核酸分子が、一本鎖核酸分子である、いずれかの先行請求項に記載の核酸分子。

【請求項 17】

前記核酸分子が、二本鎖核酸分子である、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 18】

前記二本鎖核酸分子が、10～50 個の連結されたヌクレオシドの第 2 の鎖を含み、前記第 2 の鎖が、前記第 1 の鎖に少なくとも部分的に相補的である、請求項 17 に記載の核酸分子。

【請求項 19】

前記第 2 の鎖が、前記第 1 の鎖に少なくとも 95 % 相補的である、請求項 17 又は 18 に記載の核酸分子。

【請求項 20】

1、2、3、4、5 個以上のヌクレオシドの前記第 1 の鎖の 5' 末端及び 3' 末端の両方にオーバーハングを有する、請求項 17～19 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 21】

2 つのヌクレオシドの前記第 1 の鎖の 5' 末端及び 3' 末端の両方にオーバーハングを有し、任意選択的に、前記オーバーハングが、2 つのチミンヌクレオチド (TT) を含む、請求項 17～20 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 22】

いずれかの先行請求項に記載の核酸分子と、標的化部分と、を含む、化合物。

【請求項 23】

前記標的化部分が、脂質ナノ粒子、リポソーム、エクソソーム、抗体若しくはその断片、抗原結合ドメイン若しくはその断片、ペプチド、細胞透過性ペプチド、コンジュゲート基、又はそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 22 に記載の化合物。

【請求項 24】

標的化部分が、コンジュゲート基を含み、前記コンジュゲート基が、1 つ以上の炭水化物を含む、請求項 22 又は 23 に記載の化合物。

【請求項 25】

少なくとも 1 つのヌクレオシドが、修飾糖を含む、いずれかの先行請求項に記載の核酸分子又は化合物。

【請求項 26】

少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合が、修飾されたヌクレオシド間結合である、いずれかの先行請求項に記載の核酸分子又は化合物。

【請求項 27】

いずれかの先行請求項に記載の一本鎖核酸分子若しくは化合物又はその塩と、薬学的に許容される担体又は希釈剤のうちの少なくとも 1 つと、を含む、組成物。

【請求項 28】

10

20

30

40

50

前記核酸分子が、配列番号 89 (GNAQ c. 548 G>A __ p. R183 Q)、配列番号 91 (GNAQ c. 547 C>G __ p. R183 G)、配列番号 93 (GNAQ c. 548 G>T __ p. R183 L)、配列番号 95 (GNAQ c. 547 C>T __ p. R183 *)、配列番号 99 (GNA11 c. 547 C>T __ p. R183 C)、配列番号 101 (GNA11 c. 546 __ 547 del ins TT __ p. R183 C)、及び配列番号 103 (GNA11 c. 548 G>A __ p. R183 H) からなるリストから選択される DNA 配列を特異的に標的化する、いずれかの先行請求項に記載の核酸分子、化合物、又は組成物。

【請求項 29】

GNAQ 又は GNA11 の過剰発現に関連するか又はそれによって駆動される疾患又は障害を有する患者を治療する方法における使用のための、いずれかの先行請求項に記載の核酸分子、化合物、又は組成物。

【請求項 30】

スタージ・ウェーバー症候群 (SWS)、色素血管母斑症 (PPV)、又は広範囲皮膚黒色症 (EDM) を有する患者を治療する方法における使用のための、請求項 1~27 のいずれか一項に記載の核酸分子、化合物、又は組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がん、スタージ・ウェーバー症候群 (SWS)、色素血管母斑症 (PPV)、広範囲皮膚黒色症 (EDM)、及び先天性血管腫 (急速退縮性先天性血管腫 (RICH)、部分退縮性先天性血管腫 (PICH)、及び非退縮性先天性血管腫 (NICH) を含む) を含む、GNAQ 及び GNA11 体細胞変異から生じる臨床状態を治療する新規組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

スタージ・ウェーバー症候群 (SWS)、色素血管母斑症 (PPV)、及び非定型及び／又は広範囲皮膚黒色症 (EDM) は、血管及び／又は色素形成のまれな先天性障害のスペクトルを形成する。SWS は、古典的には、ポートワイン染み母斑 (port-wine stain birthmark)、軟膜血管腫症、及び緑内障を示す、純粋な血管性である。PPV (皮膚黒色症を有するタイプ [1、2]) は、これらの同じ血管的特徴を有するが、眼及び／又は皮膚黒色症 (重度の「蒙古」青斑) 及び過剰なリスクの黒色腫も有する。EDM は、この血管色素性疾患スペクトルの純粋な色素性末端を表す。SWS 及び PPV の神経血管異常は、神経発達障害、発作、頭痛、脳卒中様エピソードを引き起こす可能性がある [3]。生後 1 年で症状が悪化することが多く、大脳灌流欠損並びに発作関連損傷に関連していると考えられている。そのような頻繁な生後の進行は、療法を標的化する期間を示唆している。

【0003】

過去 10 年間にわたり、SWS、PPV、及び EDM は、ほとんどの場合、遺伝子 GNAQ 又は相同遺伝子 GNA11 のいずれかの接合後モザイクバリエントによって引き起こされることが発見された [4、5、6、7]。病原性バリエントは、罹患細胞においてヘテロ接合性であり、優性の疾患メカニズムを示す。GNAQ バリエントは、SWS 及び EDM において優性であるが、GNAQ 及び GNA11 は、PPV においてより均等に表される。バリエントは、ほぼ普遍的に、各遺伝子のコドン 183 に影響を及ぼすが、コドン 209 に影響を及ぼすバリエントも記載されている。GNAQ のバリエントは、SWS 患者からの内皮細胞で豊富に見出されており [8]、これは、胚性血管パターン化によって臨床的に示唆されているように、血管表現型が血管前駆細胞の障害である可能性が高いことを支持している [9]。しかしながら、PPV 及び EDM は、異なる胚性前駆細胞に生じる同じ遺伝的バリエントに由来する可能性が高い。主にコドン 209 に影響を及ぼす GNA11 におけるバリエントは、先天性血管腫、出生後に自発的に退縮するか又は退縮し

10

20

30

40

50

ないこともある良性血管腫瘍（R I C H、P I C H、及びN I C Hバリエーション、急速退縮性、非退縮性、及び部分退縮性）[10]並びに他の血管系の腫瘍[11]でも記載されている。

【0004】

体細胞G N A Q及びG N A 1 1の変異は、良性腫瘍及び悪性腫瘍の両方を包含する、多種多様な非先天性腫瘍、特に、ブドウ膜、軟髄膜、及び肝臓腫瘍でも記載されている[12、13]。体細胞とは対照的に、183及び209以外のコドンに影響を及ぼすG N A 1 1における生殖系列変異は、家族性低カルシウム血症及び高カルシウム血症のタイプで記載されている[14]。最後に、遺伝子G N A 1 1の遺伝的バリエーションは、細胞内カルシウムシグナル伝達に影響を与えることによって家族性の低カルシウム血症及び高カルシウム血症を引き起こすことが知られている[15、16]が、これは、副甲状腺におけるカルシウム感受受容体（C a S R）に結合するという明確かつ特異的な文脈にある。

10

【0005】

遺伝的病因は理解されているにもかかわらず、スペクトルの分子病因、特にモザイク変異についての研究は比較的少ない。コドン183及び209に影響を及ぼす疾患バリエーションのインビトロ研究では、それらがM A P Kシグナル伝達経路の基底活性化を誘導することが実証されているが、しかしながら、これらの研究は、183又は209バリエーションを有する初代ヒト内皮及びメラニン細胞におけるM A P Kの活性化を実証したものの、主に、胚性腎臓由来系統であるH E K細胞におけるモデリング[4、5]に限定されている[11]。ヒト臍帯静脈（H U V E C）内皮細胞における最近の研究では、M A P K活性化が確認されなかった[17]。これまでに（ゼブラフィッシュで）発表されたこれらのバリエーションの唯一の動物モデリングは、血管表現型のモデリングなしで、メラノサイト特異的プロモーターの下で色素表現型を再現した[5]。生殖系列G N A 1 1変異の動物モデルでは、常染色体優性の低カルシウム血症表現型が再現されている[18]。

20

【0006】

特定の仮説の原理に拘束されることなく、本発明者らは、S W S及びP P Vにおける神経血管疾患の病因及び／又は進行が、内皮バリエーション細胞における異常な細胞内カルシウムシグナル伝達によって引き起こされる局所性又は全身性のカルシウム恒常性の障害に関連している可能性があると考えた。この仮説は、いくつかの観察に基づいていた。まず、神経血管壁石灰化は時間の経過とともに進行し、単純頭蓋X線撮影で最初に記載された古典的な血管の「トラムライン」の兆候につながる[19]。第二に、G N A Q及びG N A 1 1遺伝子（それぞれ、Gサブユニット α q及び11）によってコードされるタンパク質は、細胞内カルシウムシグナル伝達の既知の調節因子である。生理学的条件でのGタンパク質共役型受容体（G P C R）の下流のGタンパク質の活性化は、イノシトール三リン酸（I P 3）の生成及び小胞体（E R）の細胞内I P 3依存性カルシウムチャネルの開口をもたらす[20、21]。次いで、E R排出は、カルシウム放出活性化チャネル（C R A C）の活性化及び細胞外カルシウムの細胞内流入を介してカルシウム貯蔵の補充を誘発する。また、最近では、G α q及びG α 1 1と相互作用するGタンパク質の α サブユニットをコードする遺伝子G N B 2における原因と考えられるバリエーションが、G N A Q及びG N A 1 1上に変異を有しない単一のS W S患者において報告されており[17]、これらの疾患の病因におけるGタンパク質経路の変化の重要性を更に強調している。しかしながら、この経路は、これらの遺伝的バリエーションの文脈で以前に研究されていない。

30

40

【0007】

したがって、本発明者らは、疾患の生物学を探究することによって、患者の治療選択肢の不足の問題に対処しようとした。本発明者らは、患者のカルシウム代謝プロファイリングと細胞モデルにおけるカルシウムシグナル伝達のインビトロ生化学的特徴付けを組み合わせることによって、カルシウム恒常性に対する病原性S W S及びP P Vバリエーションの効果を調べた。次いで、本発明者らは、これらの疾患、並びにG N A Q若しくはG N A 1 1生殖系列、モザイク、又は体細胞遺伝的バリエーションによって引き起こされる、及び／又はそれによって駆動される、及び／又はそれに依存する、他の全ての疾患に対する新規の治

50

療を提供する、変異依存性シグナル伝達欠陥を修正するための新しいアプローチを評価した。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、10～50個の連結されたヌクレオシドの第1の鎖を含む核酸分子を提供し、第1の鎖が、GNAQ又はGNA11をコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む。

【0009】

いくつかの実施形態では、第1の鎖は、GNAQ又はGNA11の機能獲得バリエーションをコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、GNAQをコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、GNAQの機能獲得バリエーションをコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、GNA11をコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、GNA11の機能獲得バリエーションをコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、第1の鎖は、10～40個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、10～30個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、15～30個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、15～25個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、15～20個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、10～20個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、20～30個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、20～25個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、21個の連結されたヌクレオシドからなる。

【0011】

いくつかの実施形態では、第1の鎖は、バリエーションGNAQ p.(R183Q)、p.(R183G)、p.(R183L)、又はp.(R183*)をコードするmRNAの等長部分と少なくとも95%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、バリエーションGNAQ p.(R183Q)、p.(R183G)、p.(R183L)、又はp.(R183*)をコードするmRNAの等長部分と100%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸分子は、インビトロでのバリエーションGNAQ p.(R183Q/G/L/*)の発現を少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%阻害することができる。いくつかの実施形態では、核酸分子は、インビトロでの野生型GNAQの発現の阻害と比較して、インビトロでのバリエーションGNAQ p.(R183Q/G/L/*)の発現をより大きな程度で阻害する。いくつかの実施形態では、核酸分子は、バリエーションGNAQ p.(R183Q/G/L/*)を発現する細胞における異常な細胞分化シグナル伝達を、部分的又は完全に救済することができる。

【0012】

いくつかの実施形態では、バリエーションGNAQ p.(R183Q)は、GNAQゲノム配列におけるc.G548A変異によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号13～18からなる群から選択される配列と少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号13～18からなる群から選択される配列を含む。

かの実施形態では、第1の鎖は、配列番号13～18からなる群から選択される配列からなる。

【0013】

いくつかの実施形態では、バリエントGNAQ p. (R183G)は、GNAQゲノム配列におけるc. C547G変異によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号33～38からなる群から選択される配列と少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号33～38からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号33～38からなる群から選択される配列からなる。

10

【0014】

いくつかの実施形態では、バリエントGNAQ p. (R183L)は、GNAQゲノム配列におけるc. G548T変異によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号45～50からなる群から選択される配列と少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号45～50からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号45～50からなる群から選択される配列からなる。

【0015】

いくつかの実施形態では、バリエントGNAQ p. (R183*)は、GNAQゲノム配列におけるc. C547T変異によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号57～62からなる群から選択される配列と少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号57～62からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号57～62からなる群から選択される配列からなる。

20

【0016】

いくつかの実施形態では、第1の鎖は、バリエントGNA11 p. (R183C)又はp. (R183H)をコードするmRNAの等長部分と少なくとも95%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、バリエントGNA11 p. (R183C)又はp. (R183H)をコードするmRNAの等長部分と100%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸分子は、インビトロでのバリエントGNA11 p. (R183C/H)の発現を少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%阻害することができる。いくつかの実施形態では、核酸分子は、インビトロでの野生型GNA11の発現の阻害と比較して、インビトロでのバリエントGNA11 p. (R183C/H)の発現をより大きな程度で阻害する。いくつかの実施形態では、核酸分子は、バリエントGNA11 p. (R183C/H)を発現する細胞における異常な細胞分化シグナル伝達を、部分的又は完全に救済することができる。

30

40

【0017】

いくつかの実施形態では、バリエントGNA11 p. (R183C)は、GNA11ゲノム配列におけるc. C547T変異によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号19～24からなる群から選択される配列と少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号19～24からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号19～24からなる群から選択される配列からなる。

【0018】

いくつかの実施形態では、バリエントGNA11 p. (R183C)は、GNA11

50

ゲノム配列における c . 5 4 6 _ 5 4 7 d e l i n s T T 変異によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、第 1 の鎖は、配列番号 6 9 ~ 7 4 からなる群から選択される配列と少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の鎖は、配列番号 6 9 ~ 7 4 からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の鎖は、配列番号 6 9 ~ 7 4 からなる群から選択される配列からなる。

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態では、バリエント G N A 1 1 p . (R 1 8 3 H) は、G N A 1 1 ゲノム配列における c . G 5 4 8 A 変異によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、第 1 の鎖は、配列番号 8 1 ~ 8 6 からなる群から選択される配列と少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、又は少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の鎖は、配列番号 8 1 ~ 8 6 からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の鎖は、配列番号 8 1 ~ 8 6 からなる群から選択される配列からなる。

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、一本鎖核酸分子である。いくつかの実施形態では、核酸分子は、二本鎖核酸分子である。

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態では、二本鎖核酸分子は、1 0 ~ 5 0 個の連結されたヌクレオシドの第 2 の鎖を含み、第 2 の鎖が、第 1 の鎖に少なくとも部分的に相補的である。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、第 1 の鎖と少なくとも 8 0 % 相補的である。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、第 1 の鎖と少なくとも 9 0 % 相補的である。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、第 1 の鎖と少なくとも 9 5 % 相補的である。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、第 1 の鎖に完全に相補的である。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、1 0 ~ 4 0 個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、1 0 ~ 3 0 個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、1 5 ~ 3 0 個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、1 5 ~ 2 5 個の連結されたヌクレオシドからなる。

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、1 5 ~ 2 0 個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、1 0 ~ 2 0 個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、2 0 ~ 3 0 個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、2 0 ~ 2 5 個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、2 1 個の連結されたヌクレオシドからなる。

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態では、第 1 の鎖は、第 2 の鎖よりも長い。いくつかの実施形態では、核酸は、1、2、3、4、5 個以上のヌクレオシドの第 1 の鎖の 3 ' 末端にオーバーハングを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、2 つのヌクレオシドの第 1 の鎖の 3 ' 末端にオーバーハングを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、1、2、3、4、5 個以上のヌクレオシドの第 1 の鎖の 5 ' 末端にオーバーハングを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、2 つのヌクレオシドの第 1 の鎖の 5 ' 末端にオーバーハングを含む。

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態では、第 2 の鎖は、第 1 の鎖よりも長い。いくつかの実施形態では、核酸は、1、2、3、4、5 個以上のヌクレオシドの第 2 の鎖の 3 ' 末端にオーバーハングを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、2 つのヌクレオシドの第 2 の鎖の 3 ' 末端にオーバーハングを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、1、2、3、4、5 個以上のヌクレオシドの第 2 の鎖の 5 ' 末端にオーバーハングを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、2 つのヌクレオシドの第 2 の鎖の 5 ' 末端にオーバーハングを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、1、2、3、4、5 個以上のヌクレオシドの第 1 の鎖の 5 '

末端及び 3' 末端の両方にオーバーハングを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、2 つのヌクレオシドの第 1 の鎖の 5' 末端及び 3' 末端の両方にオーバーハングを含む。いくつかの実施形態では、オーバーハングは、2 つのチミンヌクレオチド (TT) を含む。いくつかの実施形態では、オーバーハングは、2 つのチミンヌクレオチド (TT) からなる。

【0025】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列を含む第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 1 及び配列番号 13、配列番号 2 及び配列番号 14、配列番号 3 及び配列番号 15、配列番号 4 及び配列番号 16、配列番号 5 及び配列番号 17、並びに配列番号 6 及び配列番号 18。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 1 及び配列番号 13、配列番号 2 及び配列番号 14、配列番号 3 及び配列番号 15、配列番号 4 及び配列番号 16、配列番号 5 及び配列番号 17、並びに配列番号 6 及び配列番号 18。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖からなる：配列番号 1 及び配列番号 13、配列番号 2 及び配列番号 14、配列番号 3 及び配列番号 15、配列番号 4 及び配列番号 16、配列番号 5 及び配列番号 17、並びに配列番号 6 及び配列番号 18。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列を含む第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 7 及び配列番号 19、配列番号 8 及び配列番号 20、配列番号 9 及び配列番号 21、配列番号 10 及び配列番号 22、配列番号 11 及び配列番号 23、並びに配列番号 12 及び配列番号 24。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 7 及び配列番号 19、配列番号 8 及び配列番号 20、配列番号 9 及び配列番号 21、配列番号 10 及び配列番号 22、配列番号 11 及び配列番号 23、並びに配列番号 12 及び配列番号 24。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖からなる：配列番号 7 及び配列番号 19、配列番号 8 及び配列番号 20、配列番号 9 及び配列番号 21、配列番号 10 及び配列番号 22、配列番号 11 及び配列番号 23、並びに配列番号 12 及び配列番号 24。

20

30

【0027】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列を含む第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 27 及び配列番号 33、配列番号 28 及び配列番号 34、配列番号 29 及び配列番号 35、配列番号 30 及び配列番号 36、配列番号 31 及び配列番号 37、並びに配列番号 32 及び配列番号 38。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 27 及び配列番号 33、配列番号 28 及び配列番号 34、配列番号 29 及び配列番号 35、配列番号 30 及び配列番号 36、配列番号 31 及び配列番号 37、並びに配列番号 32 及び配列番号 38。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖からなる：配列番号 27 及び配列番号 33、配列番号 28 及び配列番号 34、配列番号 29 及び配列番号 35、配列番号 30 及び配列番号 36、配列番号 31 及び配列番号 37、並びに配列番号 32 及び配列番号 38。

40

【0028】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列を含む第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 39 及び配列番号 45、配列番号 40 及び配列番号 46、配列番号 41 及び配列番号 47、配列番号 42 及び配列番号 48、配列番号 43 及び配列番号 49、並びに配列番号 44 及び配列番号 50。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 39 及び配列番号 45、配列番号 40 及び配列番号 46、配列番号

50

号 4 1 及び配列番号 4 7、配列番号 4 2 及び配列番号 4 8、配列番号 4 3 及び配列番号 4 9、並びに配列番号 4 4 及び配列番号 5 0。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖からなる：配列番号 3 9 及び配列番号 4 5、配列番号 4 0 及び配列番号 4 6、配列番号 4 1 及び配列番号 4 7、配列番号 4 2 及び配列番号 4 8、配列番号 4 3 及び配列番号 4 9、並びに配列番号 4 4 及び配列番号 5 0。

【0029】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列を含む第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 5 1 及び配列番号 5 7、配列番号 5 2 及び配列番号 5 8、配列番号 5 3 及び配列番号 5 9、配列番号 5 4 及び配列番号 6 0、配列番号 5 5 及び配列番号 6 1、並びに配列番号 5 6 及び配列番号 6 2。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 5 1 及び配列番号 5 7、配列番号 5 2 及び配列番号 5 8、配列番号 5 3 及び配列番号 5 9、配列番号 5 4 及び配列番号 6 0、配列番号 5 5 及び配列番号 6 1、並びに配列番号 5 6 及び配列番号 6 2。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖からなる：配列番号 5 1 及び配列番号 5 7、配列番号 5 2 及び配列番号 5 8、配列番号 5 3 及び配列番号 5 9、配列番号 5 4 及び配列番号 6 0、配列番号 5 5 及び配列番号 6 1、並びに配列番号 5 6 及び配列番号 6 2。

【0030】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列を含む第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 6 3 及び配列番号 6 9、配列番号 6 4 及び配列番号 7 0、配列番号 6 5 及び配列番号 7 1、配列番号 6 6 及び配列番号 7 2、配列番号 6 7 及び配列番号 7 3、並びに配列番号 6 8 及び配列番号 7 4。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 6 3 及び配列番号 6 9、配列番号 6 4 及び配列番号 7 0、配列番号 6 5 及び配列番号 7 1、配列番号 6 6 及び配列番号 7 2、配列番号 6 7 及び配列番号 7 3、並びに配列番号 6 8 及び配列番号 7 4。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖からなる：配列番号 6 3 及び配列番号 6 9、配列番号 6 4 及び配列番号 7 0、配列番号 6 5 及び配列番号 7 1、配列番号 6 6 及び配列番号 7 2、配列番号 6 7 及び配列番号 7 3、並びに配列番号 6 8 及び配列番号 7 4。

【0031】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列を含む第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 7 5 及び配列番号 8 1、配列番号 7 6 及び配列番号 8 2、配列番号 7 7 及び配列番号 8 3、配列番号 7 8 及び配列番号 8 4、配列番号 7 9 及び配列番号 8 5、並びに配列番号 8 0 及び配列番号 8 6。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む：配列番号 7 5 及び配列番号 8 1、配列番号 7 6 及び配列番号 8 2、配列番号 7 7 及び配列番号 8 3、配列番号 7 8 及び配列番号 8 4、配列番号 7 9 及び配列番号 8 5、並びに配列番号 8 0 及び配列番号 8 6。いくつかの実施形態では、核酸分子は、以下からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖からなる：配列番号 7 5 及び配列番号 8 1、配列番号 7 6 及び配列番号 8 2、配列番号 7 7 及び配列番号 8 3、配列番号 7 8 及び配列番号 8 4、配列番号 7 9 及び配列番号 8 5、並びに配列番号 8 0 及び配列番号 8 6。

【0032】

本発明はまた、本発明による核酸分子及び標的化部分を含む化合物を提供する。いくつかの実施形態では、標的化部分は、脂質ナノ粒子、リポソーム、エクソソーム、抗体若しくはその断片、抗原結合ドメイン若しくはその断片、ペプチド、細胞透過性ペプチド、コンジュゲート基、又はそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、標的

10

20

30

40

50

化部分は、コンジュゲート基を含み、コンジュゲート基は、1つ以上の炭水化物を含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲート基は、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、多糖、修飾多糖、マンノース、ガラクトース、マンノース誘導体、ガラクトース誘導体、D-マンノピラノース、L-マンノピラノース、D-アラビノース、L-ガラクトース、D-キシロフラノース、L-キシロフラノース、D-グルコース、L-グルコース、D-ガラクトース、L-ガラクトース、 α -D-マンノフラノース、 β -D-マンノフラノース、 α -D-マンノピラノース、 β -D-マンノピラノース、 α -D-グルコピラノース、 β -D-グルコピラノース、 α -D-グルコフラノース、 β -D-グルコフラノース、 α -D-フルクトフラノース、 α -D-フルクトピラノース、 α -D-ガラクトピラノース、 β -D-ガラクトピラノース、 α -D-ガラクトフラノース、 β -D-ガラクトフラノース、グルコサミン、シアル酸、 α -D-ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、2-アミノ-3-O-[(R)-1-カルボキシエチル]-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース、2-デオキシ-2-メチルアミノ-L-グルコピラノース、4,6-ジデオキシ-4-ホルムアミド-2,3-ジ-O-メチル-D-マンノピラノース、2-デオキシ-2-スルホアミノ-D-グルコピラノース、N-グリコイル- α -ノイラミン酸、5-チオ- β -D-グルコピラノース、メチル2,3,4-トリ-O-アセチル-1-チオ-6-O-トリチル- α -D-グルコピラノシド、4-チオ- β -D-ガラクトピラノース、エチル3,4,6,7-テトラ-O-アセチル-2-デオキシ-1,5-ジチオ- α -D-グルコ-ヘプトピラノシド、2,5-アンヒドロ-D-アロノニトリル、リボース、D-リボース、D-4-チオリボース、L-リボース、又はL-4-チオリボースを含む。

10

20

【0033】

いくつかの実施形態では、標的化部分は、第2の鎖の3'末端に連結される。いくつかの実施形態では、標的化部分は、第2の鎖の5'末端に連結される。いくつかの実施形態では、標的化部分は、第1の鎖の5'末端に連結される。いくつかの実施形態では、標的化部分は、第1の鎖の3'末端に連結される。

【0034】

いくつかの実施形態では、核酸の少なくとも1つのヌクレオシドは、修飾糖を含む。いくつかの実施形態では、核酸の少なくとも1つのヌクレオシド間結合は、修飾されたヌクレオシド間結合である。いくつかの実施形態では、修飾されたヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合である。いくつかの実施形態では、核酸は、1~40個のホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、1~30個のホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、1~20個のホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、1~10個のホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合を含む。

30

【0035】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号89 (GNAQ c. 548G>A__p. R183Q)、配列番号91 (GNAQ c. 547C>G__p. R183G)、配列番号93 (GNAQ c. 548G>T__p. R183L)、配列番号95 (GNAQ c. 547C>T__p. R183*)、配列番号99 (GNA11 c. 547C>T__p. R183C)、配列番号101 (GNA11 c. 546__547delinsTT__p. R183C)、及び配列番号103 (GNA11 c. 548G>A__p. R183H) からなるリストから選択されるDNA配列を特異的に標的化する。

40

【0036】

本発明はまた、本発明による一本鎖核酸分子若しくは化合物又はその塩と、薬学的に許容される担体又は希釈剤のうちの少なくとも1つと、を含む、組成物を提供する。本発明はまた、本発明の核酸分子又は化合物を含む、プロドラッグを提供する。

【0037】

50

本発明はまた、C R I S P RガイドRNA (g R N A) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子も提供し、g R N A が、細胞における標的配列とハイブリダイズし、標的配列が、G N A Q 又は G N A 1 1 のバリエントアレルをコードする。

【0038】

本発明はまた、C R I S P Rヌクレアーゼシステムを提供し、システムが、

(a) C R I S P RガイドRNA (g R N A) をコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターであって、g R N A が、対象の細胞における標的DNA配列とハイブリダイズし、標的配列が、G N A Q 又は G N A 1 1 のバリエントアレルをコードする、プロモーターと、

(b) ヌクレアーゼ (例えば、C a s ヌクレアーゼ) をコードするヌクレオチド配列であって、成分 (a) 及び (b) が、システムの同一又は異なるベクター上に位置する、ヌクレオチド配列と、を含む1つ以上のベクターを含み、

g R N A が、標的DNA配列を標的化し、標的DNA配列とハイブリダイズし、ヌクレアーゼが、標的配列を切断して、G N A Q 又は G N A 1 1 のバリエントアレルの発現を変化させる。

【0039】

いくつかの実施形態では、C R I S P Rヌクレアーゼシステムは、単一のアデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子にパッケージングされる。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼは、細胞における発現のためにコドン最適化される。

【0040】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のg R N A に作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、g R N A は、バリエントG N A Q p . (R 1 8 3 Q) 、 p . (R 1 8 3 G) 、 p . (R 1 8 3 L) 、 又は p . (R 1 8 3 *) をコードするDNA配列を標的化する。いくつかの実施形態では、g R N A は、バリエントG N A 1 1 p . (R 1 8 3 C) 又は p . (R 1 8 3 H) をコードするDNA配列を標的化する。

【0041】

本発明はまた、G N A Q 及び／又はG N A 1 1 のバリエントに関連する又はそれによって引き起こされる疾患又は障害を有する患者を治療する方法を提供し、本方法は、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はC R I S P Rヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む。本発明はまた、スタージ・ウェーバー症候群 (S W S) 、色素血管母斑症 (P P V) 、又は広範囲皮膚黒色症 (E D M) を有する患者を治療する方法を提供し、本方法は、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はC R I S P Rヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む。本発明はまた、先天性血管腫を有する患者を治療する方法を提供し、本方法は、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はC R I S P Rヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む。いくつかの実施形態では、先天性血管腫は、急速退縮性先天性血管腫 (R I C H) 、部分退縮性先天性血管腫 (P I C H) 、又は非退縮性先天性血管腫 (N I C H) である。

【0042】

本発明はまた、がんを有する患者を治療する方法を提供し、本方法は、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はC R I S P Rヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む。いくつかの実施形態では、がんは、以下からなるリストから選択される：副腎がん、自律神経節がん、胆道がん、骨がん、乳がん、中枢神経系がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、眼がん、卵管がん、女性性器がん、胃腸管がん、生殖器がん、造血がん、リンパ系がん、腎臓がん、大腸がん、肝臓がん、肺がん、髄膜がん、N S がん、食道がん、卵巣がん、脾臓がん、副甲状腺がん、陰茎がん、会陰がん、腹膜がん、下垂体がん、胎盤がん、胸膜がん、前立腺がん、唾液腺がん、皮膚がん、小腸がん、軟部組織がん、胃がん、精巣がん、胸腺がん、甲状腺がん、上気道消化管がん、尿路がん、子宮付属器がん、膣がん、及び外陰がん。

【0043】

本発明はまた、黒色腫を有する患者を治療する方法を提供し、本方法は、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む。本発明はまた、医薬として使用するための本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムを提供する。

【0044】

本発明はまた、スタージ・ウェーバー症候群（SWS）、色素血管母斑症（PPV）、又は広範囲皮膚黒色症（EDM）の治療を必要とする患者におけるスタージ・ウェーバー症候群（SWS）、色素血管母斑症（PPV）、又は広範囲皮膚黒色症（EDM）を治療する方法で使用するための、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムを提供し、本方法は、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む。

10

【0045】

本発明はまた、先天性血管腫を有する患者を治療する方法で使用するための、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムを提供し、本方法は、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む。いくつかの実施形態では、先天性血管腫は、急速退縮性先天性血管腫（RICH）、部分退縮性先天性血管腫（PICH）、又は非退縮性先天性血管腫（NICH）である。

20

【0046】

本発明はまた、がんの治療を必要とする患者におけるがんを治療する方法で使用するための、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムを提供し、本方法は、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む。

【0047】

本発明はまた、黒色腫の治療を必要とする患者における黒色腫を治療する方法で使用するための、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムを提供し、本方法は、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む。

30

【0048】

本発明はまた、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムをコードする核酸分子を含む発現構築物を提供する。本発明はまた、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムをコードする単離された核酸分子を提供する。本発明はまた、本発明の単離された核酸分子を含むベクターを提供する。いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、発現カセット、又はプラスミドである。いくつかの実施形態では、ベクターは、RNAポリメラーゼIII又はRNAポリメラーゼIIプロモーターを更に含む。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼIIIプロモーターは、U6又はH1プロモーターである。

40

【0049】

本発明はまた、本発明による核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム、本発明による単離された核酸分子、又は本発明によるベクターを含む宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物宿主細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ヒト宿主細胞である。

【0050】

いくつかの実施形態では、核酸分子、化合物、組成物、又はプロドラッグは、脂質ベースのナノ粒子、リボソーム、エクソソーム、高分子ナノ粒子、無機ナノ粒子、又はルキソリチニブとサリドマイドとの同時送達高分子電解質ナノ複合体（RTNP）による送達の

50

ために製剤化される。いくつかの実施形態では、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムは、送達（ジムノティック送達）のためにパッケージングされない。いくつかの実施形態では、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムは、注射によって投与される。いくつかの実施形態では、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムは、マイクロニードルを使用して注射される。いくつかの実施形態では、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムは、局所投与される。

【0051】

いくつかの実施形態では、投与は、エレクトロポレーション又は超音波を更に含む。

10

【0052】

いくつかの実施形態では、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムは、ドコサン酸（DCA）にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムは、送達（ジムノティック送達）のためにパッケージングされない。いくつかの実施形態では、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムは、注射によって投与される。いくつかの実施形態では、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムは、マイクロニードルを使用して注射される。いくつかの実施形態では、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムは、脂質ベースのナノ粒子による送達のために製剤化され、マイクロニードルを使用して注射される。いくつかの実施形態では、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムは、ドコサン酸（DCA）にコンジュゲートされ、マイクロニードルを使用して注射される。

20

【0053】

本発明は、15～30個の連結されたヌクレオシドからなるセンス鎖と、15～30個の連結されたヌクレオシドからなるアンチセンス鎖と、を含む、二本鎖リボ核酸分子であって、アンチセンス鎖が、GNAQの機能獲得バリエーション又はGNA11の機能獲得バリエーションをコードするプレゲノムRNA及び／又はmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含み、センス鎖が、アンチセンス鎖に少なくとも部分的に相補的である、二本鎖リボ核酸分子を提供する。

30

【0054】

本発明は、15～30個の連結されたヌクレオシドからなるセンス鎖と、15～30個の連結されたヌクレオシドからなるアンチセンス鎖と、を含む、二本鎖リボ核酸分子であって、アンチセンス鎖が、バリエーションGNAQ又はバリエーションGNA11をコードするプレゲノムRNA及び／又はmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含み、センス鎖が、アンチセンス鎖に少なくとも部分的に相補的である、二本鎖リボ核酸分子を提供する。

【0055】

本発明は、15～30個の連結されたヌクレオシドからなるセンス鎖と、15～30個の連結されたヌクレオシドからなるアンチセンス鎖と、を含む、二本鎖リボ核酸分子であって、アンチセンス鎖が、バリエーションGNAQ p. (R183Q)又はバリエーションGNA11 p. (R183C)をコードするプレゲノムRNA及び／又はmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含み、センス鎖が、アンチセンス鎖に少なくとも部分的に相補的である、二本鎖リボ核酸分子を提供する。

40

【0056】

本発明は、15～30個の連結されたヌクレオシドからなるセンス鎖と、15～30個の連結されたヌクレオシドからなるアンチセンス鎖と、を含む、二本鎖リボ核酸分子であって、アンチセンス鎖が、バリエーションGNAQ p. (R183Q)をコードするプレゲノムRNA及び／又はmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完

50

全に相補的である配列を含み、センス鎖が、アンチセンス鎖に少なくとも部分的に相補的である、二本鎖リボ核酸分子を提供する。

【0057】

本発明は、15～30個の連結されたヌクレオシドからなるセンス鎖と、15～30個の連結されたヌクレオシドからなるアンチセンス鎖と、を含む、二本鎖リボ核酸分子であって、アンチセンス鎖が、バリエーション GNA11 p. (R183C) をコードするプレゲノム RNA 及び／又は mRNA の等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含み、センス鎖が、アンチセンス鎖に少なくとも部分的に相補的である、二本鎖リボ核酸分子を提供する。

【0058】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、15～20個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、15～25個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、20～30個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、20～25個の連結されたヌクレオシドからなる。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、19個の連結されたヌクレオシドからなる。

【0059】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、バリエーション GNAQ p. (R183Q) 又は GNA11 p. (R183C) をコードするプレゲノム RNA 及び／又は mRNA の等長部分と少なくとも95%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、バリエーション GNAQ p. (R183Q) 又は GNA11 p. (R183C) をコードするプレゲノム RNA 及び／又は mRNA の等長部分と100%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖に少なくとも80%相補的である。いくつかの実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖に少なくとも90%相補的である。いくつかの実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖に少なくとも95%相補的である。いくつかの実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖に完全に相補的である。

【0061】

いくつかの実施形態では、二本鎖リボ核酸分子又は化合物は、インビトロでのバリエーション GNAQ p. (R183Q) 又は GNA11 p. (R183C) の発現を少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は好ましくは少なくとも90%阻害することができる。いくつかの実施形態では、化合物は、バリエーション GNAQ p. (R183Q) 又は GNA11 p. (R183C) を発現する細胞における異常なカルシウムシグナル伝達を部分的に又は完全に救済することができる。いくつかの実施形態では、GNAQ R183Q バリエーションは、GNAQ ゲノム配列における c. G548A 変異によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、c. G548A 変異に完全に相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、GNA11 R183C バリエーションは、GNA11 ゲノム配列における c. C547T 変異によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、c. C547T 変異に完全に相補的である配列を含む。

【0062】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、センス鎖よりも長い。いくつかの実施形態では、二本鎖リボ核酸分子は、1、2、3、4、5個以上のヌクレオシドのアンチセンス鎖の3'末端にオーバーハングを有する。いくつかの実施形態では、二本鎖リボ核酸分子は、2つのヌクレオシドのアンチセンス鎖の3'末端にオーバーハングを有する。いくつかの実施形態では、二本鎖リボ核酸分子は、1、2、3、4、5個以上のヌクレオシドのアンチセンス鎖の5'末端にオーバーハングを有する。いくつかの実施形態では、二本鎖リボ核酸分子は、2つのヌクレオシドのアンチセンス鎖の5'末端にオーバーハングを有する。

10

20

30

40

50

【0063】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、アンチセンス鎖よりも長い。いくつかの実施形態では、二本鎖リボ核酸分子は、1、2、3、4、5個以上のヌクレオシドのセンス鎖の3'末端にオーバーハングを有する。いくつかの実施形態では、二本鎖リボ核酸分子は、2つのヌクレオチドのセンス鎖の3'末端にオーバーハングを有する。いくつかの実施形態では、二本鎖リボ核酸分子は、1、2、3、4、5個以上のヌクレオシドのセンス鎖の5'末端にオーバーハングを有する。いくつかの実施形態では、二本鎖リボ核酸分子は、2つのヌクレオチドのセンス鎖の5'末端にオーバーハングを有する。

【0064】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、配列番号1 (UGCUUAGAGUUCAAGUCCC)、配列番号2 (GCUUAGAGUUCAAGUCCCC)、配列番号3 (CUUAGAGUUCAAGUCCCCA)、配列番号4 (UUAGAGUUCAAGUCCCCAC)、配列番号5 (UAGAGUUCAAGUCCCCACC)、配列番号6 (AGAGUUCAAGUCCCCACCA)、配列番号7 (GUGCUGCGGGUCUGCGUGC)、配列番号8 (UGCUGCGGGUCUGCGUGCC)、配列番号9 (GCGCGGGUCUGCGUGCCC)、配列番号10 (CUGCGGGUCUGCGUGCCA)、配列番号11 (UGCGGGUCUGCGUGCCCCAC)、又は配列番号12 (CGGGUCUGCGUGCCCCACCA)のうちのいずれか1つを含む核酸塩基配列を含む。

【0065】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、配列番号1 (UGCUUAGAGUUCAAGUCCC)又は配列番号3 (CUUAGAGUUCAAGUCCCCA)のうちのいずれか1つを含む核酸塩基配列を含む。

【0066】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、配列番号10 (CUGCGGGUCUGCGUGCCA)を含む核酸塩基配列を含む。

【0067】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、配列番号1 (UGCUUAGAGUUCAAGUCCC)、配列番号2 (GCUUAGAGUUCAAGUCCCC)、配列番号3 (CUUAGAGUUCAAGUCCCCA)、配列番号4 (UUAGAGUUCAAGUCCCCAC)、配列番号5 (UAGAGUUCAAGUCCCCACC)、配列番号6 (AGAGUUCAAGUCCCCACCA)、配列番号7 (GUGCUGCGGGUCUGCGUGC)、配列番号8 (UGCUGCGGGUCUGCGUGCC)、配列番号9 (GCGCGGGUCUGCGUGCCC)、配列番号10 (CUGCGGGUCUGCGUGCCA)、配列番号11 (UGCGGGUCUGCGUGCCCCAC)、又は配列番号12 (CGGGUCUGCGUGCCCCACCA)のうちのいずれか1つを含む核酸塩基配列からなる。

【0068】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、配列番号1 (UGCUUAGAGUUCAAGUCCC)又は配列番号3 (CUUAGAGUUCAAGUCCCCA)のうちのいずれか1つを有する核酸塩基配列からなる。

【0069】

いくつかの実施形態では、センス鎖は、配列番号10 (CUGCGGGUCUGCGUGCCA)を有する核酸塩基配列からなる。

【0070】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、配列番号13 (GGGACUUGAACUCUAAGCA)、配列番号14 (GGGGACUUGAACUCUAAGC)、配列番号15 (UGGGGACUUGAACUCUAAG)、配列番号16 (GUGGGGACUUGAACUCUAA)、配列番号17 (GGUGGGGACUUGAACUCUA)、配列番号18 (UGGUGGGGACUUGAACUCU)、配列番号19 (GCA

10

20

30

40

50

C G C A G A C C C G C A G C A C)、配列番号 20 (G G C A C G C A G A C C C G C A G C A)、配列番号 21 (G G G C A C G C A G A C C C G C A G C)、配列番号 22 (U G G G C A C G C A G A C C C G C A G)、配列番号 23 (G U G G G C A C G C A G A C C C G C A)、配列番号 24 (U G G U G G G C A C G C A G A C C C G) のうちのいずれか 1 つを含む核酸塩基配列を含む。

【0071】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、配列番号 13 (G G G A C U U G A A C U C U A A G C A) 又は配列番号 15 (U G G G G A C U U G A A C U C U A A G) のうちのいずれか 1 つを含む核酸塩基配列を含む。

【0072】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、配列番号 22 (U G G G C A C G C A G A C C C G C A G) を含む核酸塩基配列を含む。

【0073】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、配列番号 13 (G G G A C U U G A A C U C U A A G C A)、配列番号 14 (G G G G A C U U G A A C U C U A A G C)、配列番号 15 (U G G G G A C U U G A A C U C U A A G)、配列番号 16 (G U G G G G A C U U G A A C U C U A A)、配列番号 17 (G G U G G G G A C U U G A A C U C U A)、配列番号 18 (U G G U G G G G A C U U G A A C U C U)、配列番号 19 (G C A C G C A G A C C C G C A G C A C)、配列番号 20 (G G C A C G C A G A C C C G C A G C A)、配列番号 21 (G G G C A C G C A G A C C C G C A G C)、配列番号 22 (U G G G C A C G C A G A C C C G C A G)、配列番号 23 (G U G G G C A C G C A G A C C C G C A)、配列番号 24 (U G G U G G G C A C G C A G A C C C G) のうちのいずれか 1 つを有する核酸塩基配列からなる。

【0074】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、配列番号 13 (G G G A C U U G A A C U C U A A G C A) 又は配列番号 15 (U G G G G A C U U G A A C U C U A A G) のうちのいずれか 1 つを有する核酸塩基配列からなる。

【0075】

いくつかの実施形態では、アンチセンス鎖は、配列番号 22 (U G G G C A C G C A G A C C C G C A G) を有する核酸塩基配列からなる。

【0076】

いくつかの実施形態では、センス鎖が、配列番号 1 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 13 を含む核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 2 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 14 を含む核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 3 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 15 を含む核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 4 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 16 を含む核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 5 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 17 を含む核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 6 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 18 を含む核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 7 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 19 を含む核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 8 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 20 を含む核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 9 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 21 を含む核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 10 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 22 を含む核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 11 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 23 を含む核酸塩基配列を含むか、又はセンス鎖が、配列番号 12 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 24 を含む核酸塩基配列を含む。

【0077】

いくつかの実施形態では、センス鎖が、配列番号 1 を含む核酸塩基配列を含み、アンチ

10

20

30

40

50

センス鎖が、配列番号 13 を含む核酸塩基配列を含むか、又はセンス鎖が、配列番号 3 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 15 を含む核酸塩基配列を含む。

【0078】

いくつかの実施形態では、センス鎖が、配列番号 10 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 22 を含む核酸塩基配列を含む。

【0079】

いくつかの実施形態では、センス鎖が、配列番号 1 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 13 からなる核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 2 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 14 からなる核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 3 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 15 からなる核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 4 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 16 からなる核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 5 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 17 からなる核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 6 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 18 からなる核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 7 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 19 からなる核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 8 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 20 からなる核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 9 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 21 からなる核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 10 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 22 からなる核酸塩基配列を含むか、センス鎖が、配列番号 11 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 23 からなる核酸塩基配列を含むか、又はセンス鎖が、配列番号 12 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 24 からなる核酸塩基配列を含む。

10

20

【0080】

いくつかの実施形態では、センス鎖が、配列番号 1 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 13 からなる核酸塩基配列を含むか、又はセンス鎖が、配列番号 3 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 15 からなる核酸塩基配列を含む。

【0081】

いくつかの実施形態では、センス鎖が、配列番号 10 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 22 からなる核酸塩基配列を含む。

30

【0082】

本発明は、いずれかの先行請求項に記載の二本鎖リボ核酸分子と、コンジュゲート基とを含む、化合物を提供する。いくつかの実施形態では、コンジュゲート基は、1つ以上の炭水化物を含む。

【0083】

いくつかの実施形態では、コンジュゲート基は、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、多糖、修飾多糖、マンノース、ガラクトース、マンノース誘導体、ガラクトース誘導体、D-マンノピラノース、L-マンノピラノース、D-アラビノース、L-ガラクトース、D-キシロフラノース、L-キシロフラノース、D-グルコース、L-グルコース、D-ガラクトース、L-ガラクトース、 α -D-マンノフラノース、 β -D-マンノフラノース、 α -D-マンノピラノース、 β -D-マンノピラノース、 α -D-グルコピラノース、 β -D-グルコピラノース、 α -D-グルコフラノース、 β -D-グルコフラノース、 α -D-フルクトフラノース、 α -D-フルクトピラノース、 α -D-ガラクトピラノース、 β -D-ガラクトピラノース、 α -D-ガラクトフラノース、 β -D-ガラクトフラノース、グルコサミン、シアル酸、 α -D-ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、2-アミノ-3-O-[(R)-1-カルボキシエチル]-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース、2-デオキシ-2-メチルアミノ-L-グルコピラノース、4,6-ジデオキシ-4-ホルムアミド-2,3-ジ-O-メチル-D-マンノピラノース、2-デオキシ-2-スルホアミノ-D-グルコピラノース、N-グリコイル- α -ノイラミ

40

50

ン酸、5-チオ-β-D-グルコピラノース、メチル2,3,4-トリ-O-アセチル-1-チオ-6-O-トリチル-α-D-グルコピラノシド、4-チオ-β-D-ガラクトピラノース、エチル3,4,6,7-テトラ-O-アセチル-2-デオキシ-1,5-ジチオ-a-D-グルコヘプトピラノシド、2,5-アンヒドロ-D-アロノニトリル、リボース、D-リボース、D-4-チオリボース、L-リボース、又はL-4-チオリボースを含む。

【0084】

いくつかの実施形態では、コンジュゲート基は、センス鎖の3'末端に連結される。いくつかの実施形態では、コンジュゲート基は、センス鎖の5'末端に連結される。いくつかの実施形態では、コンジュゲート基は、アンチセンス鎖の5'末端に連結される。いくつかの実施形態では、コンジュゲート基は、アンチセンス鎖の3'末端に連結される。

10

【0085】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのヌクレオシドは、修飾糖を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのヌクレオシド間結合は、修飾されたヌクレオシド間結合である。いくつかの実施形態では、修飾されたヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合である。いくつかの実施形態では、二本鎖リボ核酸分子又は化合物は、1~15個のホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合を含む。

【0086】

本発明は、いずれかの先行請求項に記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物又はその塩と、薬学的に許容される担体又は希釈剤のうちの少なくとも1つと、を含む、組成物を提供する。

20

【0087】

本発明は、本発明の二本鎖リボ核酸分子又は化合物を含むプロドラッグを提供する。

【0088】

本発明は、GNAQ及び／又はGNA11におけるバリエーションに関連する又はそれによって駆動される疾患又は障害を有する患者を治療する方法を提供し、本方法は、バリエーションGNAQ及び／又はGNA11アレルを特異的に標的化する化合物又は組成物を患者に投与することを含む。

【0089】

本発明は、GNAQ及び／又はGNA11のバリエーションに関連する又はそれによって引き起こされる疾患又は障害を有する患者を治療する方法を提供し、本方法は、本発明による二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、本発明による組成物、又は本発明によるプロドラッグを患者に投与することを含む。

30

【0090】

本発明は、スタージ・ウェーバー症候群(SWS)、色素血管母斑症(PPV)、又は広範囲皮膚黒色症(EDM)を有する患者を治療する方法を提供し、本方法は、本発明による二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、本発明による組成物、又は本発明によるプロドラッグを患者に投与することを含む。

【0091】

本発明は、がんを有する患者を治療する方法を提供し、本方法は、本発明による二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、本発明による組成物、又は本発明によるプロドラッグを患者に投与することを含む。

40

【0092】

本発明は、黒色腫を有する患者を治療する方法を提供し、本方法は、本発明による二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、本発明による組成物、又は本発明によるプロドラッグを患者に投与することを含む。

【0093】

本発明は、医薬として使用するための、本発明による二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、本発明による組成物、又は本発明によるプロドラッグを提供する。

50

【0094】

本発明は、スタージ・ウェーバー症候群（SWS）、色素性白血病（PPV）、又は広範囲皮膚黒色症（EDM）の治療を必要とする患者におけるスタージ・ウェーバー症候群（SWS）、色素性白血病（PPV）、又は広範囲皮膚黒色症（EDM）を治療する方法で使用するための、本発明による二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、本発明による組成物、又は本発明によるプロドラッグを提供し、本方法は、本発明による二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、本発明による組成物、又は本発明によるプロドラッグを患者に投与することを含む。

【0095】

本発明は、がんの治療を必要とする患者におけるがんを治療する方法で使用するための、本発明による二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、本発明による組成物、又は本発明によるプロドラッグを提供し、本方法は、本発明による二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、本発明による組成物、又は本発明によるプロドラッグを患者に投与することを含む。

10

【0096】

本発明は、黒色腫の治療を必要とする患者における黒色腫を治療する方法で使用するための、本発明による二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、本発明による組成物、又は本発明によるプロドラッグを提供し、本方法は、本発明による二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、本発明による組成物、又は本発明によるプロドラッグを患者に投与することを含む。

【0097】

本発明は、スタージ・ウェーバー症候群（SWS）、色素血管母斑症（PPV）、又は広範囲皮膚黒色症（EDM）を有する患者を治療する方法であって、GNAQ及び／又はGNA11のバリエーションを特異的に標的化する化合物又は組成物を患者に投与することを含む、方法を提供する。

20

【0098】

本発明は、がんを有する患者を治療する方法であって、GNAQ及び／又はGNA11のバリエーションを特異的に標的化する化合物又は組成物を患者に投与することを含む、方法を提供する。

【0099】

本発明は、黒色腫を有する患者を治療する方法であって、GNAQ及び／又はGNA11のバリエーションを特異的に標的化する化合物又は組成物を患者に投与することを含む、方法を提供する。

30

【0100】

いくつかの実施形態では、GNAQのバリエーションは、R183Q置換を引き起こす変異を含む。いくつかの実施形態では、GNA11のバリエーションは、R183C置換を引き起こす変異を含む。いくつかの実施形態では、GNAQ及び／又はGNA11のバリエーションを特異的に標的化する化合物又は組成物は、インビトロでのバリエーションGNAQ又はバリエーションGNA11の発現を少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は好ましくは少なくとも90%阻害することができる。いくつかの実施形態では、GNAQ及び／又はGNA11のバリエーションを特異的に標的化する化合物又は組成物は、バリエーションGNAQ又はバリエーションGNA11を発現する細胞における異常なカルシウムシグナル伝達を部分的又は完全に救済することができる。

40

【0101】

本発明は、本発明による二本鎖リボ核酸分子又は化合物をコードする核酸分子を含む発現構築物を提供する。本発明は、本発明による二本鎖リボ核酸分子又は化合物をコードする単離された核酸分子を提供する。本発明は、本発明の単離された核酸分子を含むベクターを提供する。いくつかの実施形態では、ベクターは、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、発現カセット、又はプラスミドである。いくつかの実施形態では、ベクターは、RNAポリメラーゼIII又はRNAポリメラーゼIIIプロモーターを更に含む。い

50

くつかの実施形態では、RNAポリメラーゼIIIプロモーターは、U6又はH1プロモーターである。

【0102】

本発明は、本発明による二本鎖リボ核酸分子又は化合物、本発明による単離された核酸分子、又は本発明によるベクターを含む宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物宿主細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ヒト宿主細胞である。

【0103】

一態様では、RNAi剤が上記のような干渉リボ核酸（例えば、siRNA又はshRNA）である代わりに、RNAi剤は、上記のような干渉リボ核酸（例えば、shRNA）をコードしてもよい。言い換えれば、RNAi剤は、干渉リボ核酸の転写鋳型であり得る。したがって、本発明のRNAi剤はまた、ショートヘアピンRNA（shRNA）、及びshRNAを発現するように操作された発現構築物を含み得る。発現時に、shRNAは、3' UUオーバーハングを有するステムループ構造に折り畳まれると考えられ、その後、これらのshRNAの末端がプロセッシングされ、shRNAがsiRNA様分子に変換される。

【0104】

マイクロニードル又はマイクロニードルパッチ又はマイクロアレイパッチは、治療剤を投与するために使用されるミクロンスケールの医療デバイスである。マイクロニードルは、経皮薬物送達用途、並びに薬物の眼内、腔内、経腸、心臓、血管、胃腸、及び蝸牛内送達にも使用することができる。マイクロニードルは、通常、フォトリソグラフィプロセス又はマイクロモールディングを含む様々な方法によって構築される。これらの方法は、マイクロニードルを鑄造するために、微細構造を樹脂又はシリコンにエッチングすることを伴う。マイクロニードルは、シリコン、チタン、ステンレス鋼、及びポリマーにわたる様々な材料から作られている。いくつかのマイクロニードルは、身体に送達される薬物で作られているが、それらが皮膚に浸透するように針の形をしている。マイクロニードルは、サイズ、形状、及び機能が様々であるが、全て、従来の皮下針又は他の注射装置のような他の送達方法の代替として使用される。

【0105】

マイクロニードルは、通常、単一のニードル又は小さいアレイを介して適用される。使用されるアレイは、わずか数本のマイクロニードルから数百本のマイクロニードルまでのマイクロニードルの集合であり、アプリケータ、時には、パッチ又は他の固体スタンピングデバイスに取り付けられている。アレイは、患者の皮膚に適用され、薬物の効果的な投与を可能にするために時間が与えられる。個々のマイクロニードルのサイズは、マイクロニードルの所望のサイズに応じて、例えば、マイクロニードルの標的化深度、特定の組織タイプでの破損を回避するための針の強度要件などに応じて最適化され得る。

【0106】

固体マイクロニードルは、2部システムとして設計されており、最初に、マイクロニードルアレイを皮膚に適用して、皮膚の最外層を貫通するのにちょうど十分な深さの微細なウェルを作成し、次いで、経皮パッチを介して薬物が適用される。固体マイクロニードルは、コラーゲン誘導療法において皮膚科医によって既に使用されており、これは、マイクロニードルによる皮膚の繰り返し穿刺を使用して、皮膚のタンパク質であるコラーゲン及びエラスチンの発現及び沈着を誘導する方法である。

【0107】

中空のマイクロニードルは、材料が固体のマイクロニードルと同様である。これらには、薬物を部位に直接送達するリザーバが含まれている。薬物の送達は、マイクロニードルの流量に依存するため、このタイプのアレイは、過度の膨張又は設計の欠陥によって詰まる可能性がある。

【0108】

コーティングされたマイクロニードルは、通常、ポリマー又は金属から設計されている

。この方法では、薬物は、他のパッチ又はアプリケータを介して適用されるのではなく、マイクロニードルアレイに直接適用される。コーティングされたマイクロニードルは、薬物が適切に送達されることを保証するために、多くの場合、他の界面活性剤又は増粘剤で覆われている。

【0109】

溶解性マイクロニードルは、皮膚に入ると溶解する非毒性ポリマーに薬物を封入する。このポリマーにより、薬物が皮膚に送達されることが可能になり、体内に入ると分解され得る。絹ベースのタンパク質であるフィブロインなどのポリマーは、マイクロニードルのような構造に成形され、体内に入ると溶解され得る。

【0110】

ヒドロゲル形成マイクロニードルは、ポリマーに封入された薬剤を有する。マイクロニードルは、角質層を貫通し、間質液を吸って、ポリマーの腫脹をもたらす得る。薬物は、膨張したマトリックスから皮膚に入る。

【0111】

脂質封入RNAナノ粒子の異なる製造方法は、当業者に既知である。小胞形成後に治療用分子と組み合わせられる乱流環境を提供するスタティックミキサーを用いたエタノール注射型プロセスを使用して、脂質封入RNAナノ粒子を調製するための技術が知られている。非乱流混合及び一連の連続的な段階的希釈を使用して、脂質封入RNAナノ粒子を形成するための他の技術も知られている。粒子はまた、有機溶液パイプ中の脂質をオリフィスを通して、オリフィスを流れる水溶液中の核酸に噴霧することによって形成することもできる。脂質封入RNAナノ粒子を生成するためのパラメータは、所望の特性に応じて変更することができる。

【0112】

ルキソリチニブとサリドマイドとの共送達高分子電解質ナノ複合体(RTNP)などのナノ送達系は、非ウイルス粒子の安全性を維持しながらウイルスを模倣するように操作することができる。1つのアプローチは、細胞表面受容体又は目的の細胞型に特異的な他のタンパク質に親和性を有する粒子にペプチドを組み込むことによって、特定の細胞型への送達を促進することである。非常に多くの場合、特定の細胞型を標的化するペプチドはまだ知られておらず、実験(例えば、ファージディスプレイライブラリバイオパニング)を使用して、目的の特定の細胞型に対して親和性を有する新規のアミノ酸配列を特定することができる。

【0113】

この目的のための最適な脂質の選択と一緒に、目的の細胞型に最良のカーゴを送達するそれらの属性を特定するために、仮説を検証するためのモジュール式アプローチがある[22]。最近の研究では、既存の文献を使用して、皮膚の特定の細胞型(線維芽細胞、メラノサイト、及びケラチノサイト)上の受容体を標的化するペプチドを設計した[23]。しかしながら、本発明者らは、ファージディスプレイライブラリを用いて新規の細胞標的ペプチドを特定するための偏りのないアプローチにより、この目的に最も効果的なペプチドが明らかになると予想する。更に、目的の細胞は、多くの場合、病的であり、かつ／又は健康なヒトにおける最も近い同等の細胞とは異なっている。したがって、ナノ送達システムを最も効果的に標的化するために、これらの細胞に対して特に研究を実施することが重要である。

【0114】

いくつかの実施形態では、再構成されたウイルスエンベロープは、siRNAをカプセル化し、送達するために使用される。再構成された膜小胞は、ウイルススパイクタンパク質及び追加的に添加された陽イオン性脂質を含み得る。siRNAが装填された小胞は、受容体媒介性エンドサイトーシスによって取り込まれ、エンドソーム膜との融合によってエンドソーム分解を回避することができる。機能的なsiRNA送達は、インビトロ及びインビボで実証されている。いくつかのウイルスアプローチと同様に、システムの欠点は、反復投与が困難であること、及び形質導入された細胞型に対する制御が限られているこ

とである。

【0115】

いくつかの実施形態では、*s i R N A*をコードする*D N A*は、インビボでの遺伝子サイレンシングのためにウイルスによって送達され得る。特異性を改善するために、特定の細胞型に対するウイルスの天然のトロピズムを使用してもよい。いくつかの実施形態では、ウイルスの天然のトロピズムを、標的細胞の表面上の治療上有用な受容体に向けることが可能であり得る。例としては、マウスコロナウイルスをヒト上皮増殖因子受容体に再標的化すること、神経膠腫への送達のために、アデノウイルスを線維芽細胞増殖因子リガンドを介してその関連受容体（*F G F R 1*）に向けて指示すること、又はアデノウイルスを*R G D*-ペプチド結合アルファ*v*-インテグリンを介して血管新生内皮に送達することが挙げられる。ウイルス送達アプローチの1つの特定の利点は、細胞の効率的な形質導入である。

10

【0116】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物は、非ウイルス送達を介して送達され得る。ウイルスベクターは、効率的な核酸送達のための所望の特徴の多くを提供するが、非ウイルスベクターは、他の利点を提供する。合成ベクターシステムの重要な利点は、安全性（それらの免疫原性の欠如及び組み込み頻度の低さに関連する）及び大規模生産の容易さである。加えて、それらは、多種多様な核酸サイズに対応することができ、容易な修飾を可能にする。

【0117】

非ウイルス送達システムは、官能基を本発明の化合物に組み込むことを必要とする場合がある。カチオン性官能基は、通常、核酸を結合及び凝縮するために必要とされ、それによって、核酸をヌクレアーゼに対して保護し、（*s i R N A*にとって重要なことに）腎クリアランスのカットオフを上回る見かけの分子量を増加させる。

20

【0118】

ドコサン酸（*D C A*）への*s i R N A*のコンジュゲーションは、単回用量の注射で、注射部位に局所的な全ての主要な皮膚細胞型への生産的な送達を可能にする。*I F N - γ*シグナル伝達のエキスピボモデルでは、*D C A - s i R N A*は、注射部位からの皮膚生検において、*I F N - γ*誘導性ケモカインである*C X C L 9*及び*C X C L 1 0*の誘導を効率的に阻害する。*D C A - s i R N A*は、皮膚における機能的な遺伝子サイレンシングのために操作することができ、自己免疫性皮膚疾患の*s i R N A*治療に向けた道筋を確立することができることが実証されている〔24〕。

30

【0119】

スタージ・ウェーバー症候群（*S W S*）及び色素血管母斑症（*P P V*）は、皮膚、*C N S*、及び眼の血管奇形を特徴とする重篤な治療不能な希少疾患のスペクトルを形成する。これらは、細胞内シグナル伝達経路に不可欠な*G α q / 1 1*タンパク質サブユニットをコードする、*G N A Q / G N A 1 1*におけるモザイクバリエーションによって引き起こされる。病原性バリエーションが血管内皮にどのように影響を及ぼすかは不明である。進行性の神経血管石灰化の古典的な発見は、カルシウム処理の混乱が疾患の病因に関与している可能性があり、療法に適しているという仮説に至った。

40

【0120】

全身カルシウム代謝プロファイリングのために、35人の患者を募集した。カルシウムシグナル伝達を、*G N A Q*（*c . 5 4 8 G > A*、*p . (R 1 8 3 Q)*）及び*G N A 1 1*（*c . 5 4 7 C > T*、*p . (R 1 8 3 C)*）を発現する2つの細胞モデルで評価した。*s i R N A*は、バリエーションを特異的にノックダウンするように設計された。

【0121】

ベースライン時の患者の60%が、カルシウム代謝の少なくとも1つの異常な測定値を有した。最も一般的な所見は、43%における血清イオン化カルシウムの低下であり、年齢が上がるにつれて著しく増加した。*G N A Q / 1 1*バリエーションは、*E R K*を活性化させることなく、顕著な構成的カルシウムシグナル伝達を内皮細胞に付与した。*G N A Q*バリエーションは、*E R K*を活性化させることなく、顕著な構成的カルシウムシグナル伝達を内皮細胞に付与した。

50

アント細胞は、トロンビンによるGタンパク質共役受容体の活性化に対する細胞内カルシウム応答の増幅を更に示した。これにより、細胞外空間からのカルシウム流入が増加し、細胞内貯蔵が補充された。これらの欠陥は、s i R N A及びC R A Cチャネル阻害によって救済され、遺伝的原因及び関与する生物学的経路が確認された。

【0122】

かなりの割合の患者における全身カルシウム恒常性の破壊は、他の実証可能な原因を有しておらず、年齢が上がるにつれて著しく増加し、これは、モザイク身体領域における慢性G N A Q / 1 1 駆動過活性化に起因することを示唆している。これらのデータは、これらの疾患の生物学的基盤を示唆し、神経学的表現型と闘うための新しい治療戦略を特定する。

【図面の簡単な説明】

【0123】

【図1】S W S及びP P V患者は破壊された全身カルシウム恒常性を有する。A．右眼の緑内障を伴う、重篤な額領域を含む頭部の毛細血管奇形を有するスタージ・ウェーバー症候群患者の臨床的特徴。この患者は、二次性副甲状腺機能亢進症と一致して、低レベルのイオン化カルシウム及び総カルシウム（それぞれ、 1.15 mmol/L 及び 2.08 mmol/L ）及びP T Hの増加（ 7.4 pmol/L ）を伴う低カルシウム血症を有していた。年齢調整イオン化カルシウム基準範囲： $1.22\sim1.31\text{ mmol/L}$ 、総カルシウム基準範囲： $2.19\sim2.66\text{ mmol/L}$ 、P T H基準範囲： $0.7\sim5.6\text{ pmol/L}$ 。B～C．スタージ・ウェーバー症候群の患者の造影F L A I R及びT 1強調M R画像は、左前頭部、頭頂部、及び後頭部の軟膜血管腫症（矢印）を示す。D．磁化率強調画像（S W I）、及びE．血管石灰化を示すS W I位相マップ（矢印）。この患者は、低レベルのイオン化カルシウム（ 1.17 mmol/L ）、及び正常範囲内の総カルシウム及びP T Hを伴う低カルシウム血症を有した。イオン化カルシウム基準範囲： $1.22\sim1.31\text{ mmol/L}$ 。F．患者のコホートからの年齢とアルブミンに対して補正された血清カルシウムとの間の相関。線形回帰分析は、統計的に著しい負の相関を示した（ $p<0.001$ ）。G．患者のコホートからの年齢と尿中カルシウム／クレアチニン比との間の相関。線形回帰分析は、統計学的に著しい負の相関を示した（ $p=0.019$ ）。

【図2】G N A Q / G N A 1 1 バリエントは、構成的な活性化を引き起こし、内皮細胞におけるトロンビン誘導細胞内カルシウムシグナル伝達を増幅する。A．T I M E組換え細胞株を、完全培地及び飢餓条件下でのI P 1の濃度についてアッセイした。グラフは、2つの独立した実験の平均を表す。条件間の統計的比較は、両側対応のないt検定によった（**** $p<0.0001$ ）。B．完全培地での、又は1時間の急性飢餓後の、T I M E組換え細胞株に対する3つ又は4つの独立したウエスタンブロット実験で行われた濃度測定分析。両側対応のないt検定は、いずれの条件においても、G N A Q又はG N A 1 1 W Tとバリエント細胞株との間の統計的に著しい差を明らかにしなかった。C．H E K D K O G α q / 1 1、C a S R、N F A T - L u c細胞を、G N A Q^{W T}、G N A Q^{R 1 8 3 Q}、G N A 1 1^{W T}、又はG N A 1 1^{R 1 8 3 C}構築物でトランスフェクトし、ビヒクル又は3つの濃度の細胞外カルシウムで処理して、C a S Rの活性化及び下流のGタンパク質シグナル伝達を刺激した。ルシフェラーゼ活性は、刺激の4時間後に測定した。グラフは、3つの独立した実験の平均を表す。異なる条件間の統計学的比較は、両側対応のあるt検定（* $p<0.05$ ）によって行われた。D．T I M E - G N A Q^{W T}又はG N A Q^{R 1 8 3 Q}に、細胞内カルシウムプローブF l u o - 8を充填し、H B S S標準緩衝液（黄色及び青色の線）中で、又はH B S Sカルシウム不含緩衝液（黒色及び赤色の線）への100秒間の長時間の曝露後に、トロンビン（ 1 U/mL ）で刺激した。経時的に蛍光の変化を記録し、最大応答及び最小応答に対して正規化して、細胞質[Ca²⁺]を計算した。このグラフは、6つの技術的反復を用いて行われた3つの独立した実験の平均を表す。二元配置A N O V Aによって行われた統計学的検定（**** $p<0.0001$ ）。

【図3】C R A Cチャネル阻害及びバリエント特異的s i R N Aは、バリエント細胞における異常なカルシウムシグナル伝達を救済する。A～B．T I M E - G N A Q^{W T}（A）

又は $\text{GNAQ}^{\text{R183Q}}$ (B) に、細胞内カルシウムプローブ Fluo-8 を充填し、ビヒクル又は $1 \mu\text{M}$ の CX4620 で 20 分間処理した。処理後、細胞を、 $1 \mu\text{M}$ の Fluo-8 で刺激し、蛍光を 300 秒間記録した。これらのグラフは、4 つの技術的反復で行われた 3 つの独立した実験の平均を表す。C. 図 1A ~ B に要約されている 3 つの実験から計算された曲線下面積の平均 $\pm$ SD 偏差。統計的比較は、両側対応のある t 検定によって行った ($n.s$ = 統計的に著しくはない、 $*p = 0.0284$)。D. $\text{TIME-GNAQ}^{\text{R183Q}}$ 又は $\text{GNA11}^{\text{R183C}}$ は、トランスフェクトされなかったか、又はバリエーションの特異的サイレンシングのための 10 nM 非標的 siRNA (siSCRA) 若しくは 10 nM siRNA (GNAQ バリエーションの特異的サイレンシングには siGNAQmut1 及び siGNAQmut3 、並びに GNA11 バリエーションの特異的サイレンシングには siGNA11mut4) でトランスフェクトされた。トランスフェクションの 48 時間後に IP1 濃度を測定し、3 つの独立した実験の平均 $\pm$ SD として示した。統計的比較は、両側対応のない t 検定によって行った ($**p < 0.005$)。E. $\text{GNAQ}^{\text{R183Q}}$ 変異を有する TIME 細胞を、 NFAT-Luc システムでトランスフェクトし、抗生物質選択後に安定したクローンを得た。 $\text{TIME-GNAQp. (R183Q)}$; NFAT-Luc を、非標的 siRNA (siSCRA) 又はバリエーション GNAQ アレルの特異的サイレンシングのための 2 つの siRNA (siGNAQmut1 及び 3) でトランスフェクトし、 NFAT-Luc 活性を、完全培地でのトランスフェクションの 48 時間後又は 4 時間の飢餓後に測定し、3 つの独立した実験でのモックでトランスフェクトされた細胞の % 変化の平均 $\pm$ SD として示す。統計学的比較は、両側対応のない t 検定によって行った ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$)。F. $\text{GNAQ}^{\text{R183Q}}$ を有する TIME 細胞を、非標的 siRNA (siSCRA) 又はバリエーション GNAQ アレルの特異的サイレンシングのための 2 つの siRNA でトランスフェクトした。トランスフェクションの 48 時間後、1 秒間隔で蛍光シグナルを最大 300 秒間記録している間、それらに Fluo-8 細胞内カルシウム色素を充填し、 $1 \mu\text{M}$ の Fluo-8 によって刺激した。グラフは、3 つの独立した実験の平均を表す。二元配置 ANOVA によって行った統計学的検定 ($***p < 0.001$; $****p < 0.0001$)。G. $\text{GNAQ}^{\text{R183Q}}$ を有する UPPM-1 ブドウ膜黒色腫細胞株を、 25 nM の非標的 siRNA (siSCRA) 又はバリエーション GNAQ アレルの特異的サイレンシングのための 2 つの siRNA (siGNAQmut1 及び siGNAQmut6) でトランスフェクトした。トランスフェクションの 48 時間後に IP1 濃度を測定し、3 つの独立した実験の平均 $\pm$ SD として示した。統計的比較は、両側対応のない t 検定によって行った。

【図 4】 GNAQ^{WT} 、 $\text{GNAQ}^{\text{R183Q}}$ 、 GNA11^{WT} 、又は $\text{GNA11}^{\text{R183C}}$ アレルを安定的に発現する TIME トランスジェニック細胞株の生成及び検証。A. TIME 細胞株を感染させ、安定した組換え誘導体を生成するために使用したレンチウイルス発現ベクターの概略図。B. GNAQ 又は GNA11 遺伝子のエクソン 4 にアニーリングするプライマーを使用して、 TIME 組換えモデルに対してサンガー配列決定を行った。変異を確認するための GNAQ 及び GNA11 コドン 183 のクロマトグラム。C. TIME 親細胞及び TIME 非形質導入細胞又は GNAQ^{WT} 、 $\text{GNAQ}^{\text{R183Q}}$ 、 GNA11^{WT} 、若しくは $\text{GNA11}^{\text{R183C}}$ レンチウイルスによる形質導入細胞のウェスタンブロット分析。細胞溶解物を、示された抗体でプローブした。D. 非トランスフェクト、又は GNAQ^{WT} 、 $\text{GNAQ}^{\text{R183Q}}$ 、 GNA11^{WT} 、若しくは $\text{GNA11}^{\text{R183C}}$ pCDNA3.1 (+) - NFAT-Luc プラスミドでトランスフェクトした HEK293T 、 CaSR 、 NFAT-Luc 細胞のウェスタンブロット分析。細胞溶解物を、示された抗体でプローブして、導入遺伝子の同等の発現が示された。

【図 5】 GNAQ c. 548 G > A, p. (R183Q) に特異的な siRNA の設計及び試験。A. GNAQ c. 548 G > A アレルを特異的に標的化するように設計された 6 つの siRNA の概略図。B. 野生型又は p. R183Q HA タグ付き $\text{G}\alpha\text{q}$ のいずれかを安定して発現する TIME 細胞を、 GNAQ c. 548 G > A を標的化する 5

0 nMのs i R N A . (R 1 8 3 Q) アレルによってトランスフェクトし、トランスフェクションの24時間後にウエスタンブロットによって分析した。溶解物を、示された抗体でプローブした。s i R N A s i G N A Q m u t # 1 及び3 (四角) は、野生型の対応物を上回るバリエーションタンパク質の特異的なノックダウンを示した。C . 図5 A に示されるものと同様のウエスタンブロット実験からのバンドの濃度測定定量。(3つの実験の平均、* p < 0 . 0 5) 。 D . G N A 1 1 c . 5 4 7 C > T p . (R 1 8 3 C) を特異的に標的化するように設計された6つのs i R N A の概略図。E . 野生型又はp . R 1 8 3 C H A タグ付きG α 1 1 のいずれかを安定して発現するT I M E 細胞を、G N A 1 1 c . 5 4 7 C > T , p . (R 1 8 3 C) アレルを標的化する25 nMのs i R N A によってトランスフェクトし、トランスフェクションの24時間後にウエスタンブロットによって分析した。溶解物を、示された抗体でプローブした。s i R N A s s i G N A 1 1 m u t # 4 (四角) は、野生型の対応物を上回るバリエーションタンパク質の特異的なノックダウンを示した。F . 図5 C に示されるものと同様のウエスタンブロット実験からのバンドの濃度測定定量。(3つの実験の平均、* p < 0 . 0 5) 。

【図6】SWS (患者1 ~ 2 8) 及びPPV (患者2 9 ~ 3 5) における患者のディープ表現型決定及び血清カルシウム代謝プロファイル * は、[7] で以前に報告された患者を示す。略語：MRI：磁気共鳴画像法、F：女性、M：男性、ADHD：注意欠陥多動性障害、IOP：眼圧、DVA：静脈奇形、DMV：深髄質静脈、PTH：副甲状腺ホルモン イオン化カルシウムのレベルをpHに対して補正した。イオン化カルシウムの小児範囲基準：1 . 1 5 ~ 1 . 4 1 m m o l / L (< 2 歳) 、 1 . 1 9 ~ 1 . 3 7 m m o l / L (2 ~ 5 歳) 、 1 . 2 2 ~ 1 . 3 1 m m o l / L (5 ~ 1 5 歳) 。 P T H 基準範囲：0 . 7 ~ 5 . 6 p m o l / L 。 * 公開されているガイドライン [9] に従って、本発明者らは、現在、頷領域の血管病変及び神経学的症状がない場合、MRI / MRAは行わない。

【図7】皮膚黒色症を伴うSWS及びPPVタイプを有する患者における全身性カルシウム代謝プロファイリング。略語：WT：野生型。総カルシウム値はアルブミンに対して補正し、イオン化カルシウムはpHに対して補正した。年齢調整イオン化カルシウム基準範囲：1 . 1 5 ~ 1 . 4 1 m m o l / L (< 2 歳) 、 1 . 1 9 ~ 1 . 3 7 m m o l / L (2 ~ 5 歳) 、 1 . 2 2 ~ 1 . 3 1 m m o l / L (5 ~ 1 5 歳) 。 年齢調整総カルシウム基準範囲：1 . 9 6 ~ 2 . 6 6 m m o l / L (0 ~ 5 日齢) 、 2 . 1 7 ~ 2 . 4 4 m m o l / L (5 日齢 ~ 3 歳) 、 2 . 2 2 ~ 2 . 5 1 m m o l / L (3 ~ 1 0 歳) 、 2 . 1 9 ~ 2 . 6 6 m m o l / L (1 0 ~ 1 5 歳) 、 2 . 1 0 ~ 2 . 5 5 m m o l / L (> 1 5 歳) 。 年齢調整リン酸塩基準範囲：1 . 5 ~ 2 . 6 m m o l / L (0 ~ 5 日齢) 、 1 . 2 ~ 2 . 1 m m o l / L (5 日齢 ~ 3 歳) 、 1 . 2 ~ 1 . 8 m m o l / L (3 ~ 1 0 歳) 、 1 . 1 ~ 1 . 7 5 m m o l / L (1 0 ~ 1 5 歳) 、 0 . 8 ~ 1 . 4 5 m m o l / L (> 1 5 歳) 。 総ビタミンD基準範囲：不十分 (2 5 ~ 5 0 n m o l / L) 、 欠乏 (< 2 5 n m o l / L) 。 P T H 基準範囲：0 . 7 ~ 5 . 6 p m o l / L 。 年齢性別調整ALP基準範囲：女性 - 6 5 ~ 2 7 0 U / L (1 ~ 7 日齢) 、 6 5 ~ 3 6 5 U / L (7 日齢 ~ 1 カ月) 、 8 0 ~ 4 2 5 U / L (1 ~ 3 カ月) 、 8 0 ~ 3 4 5 U / L (3 ~ 6 カ月) 、 6 0 ~ 3 3 0 U / L (6 ~ 1 2 カ月) 、 1 4 5 ~ 3 2 0 U / L (1 ~ 3 歳) 、 1 5 0 ~ 3 8 0 U / L (3 ~ 6 歳) 、 1 7 5 ~ 4 2 0 U / L (6 ~ 9 歳) 、 1 3 0 ~ 5 6 0 U / L (9 ~ 1 1 歳) 、 1 0 5 ~ 4 2 0 U / L (1 1 ~ 1 3 歳) 、 7 0 ~ 2 3 0 U / L (1 3 ~ 1 5 歳) 、 3 0 ~ 1 2 6 U / L (> 1 5 歳) 。 男性 - 6 5 ~ 2 7 0 U / L (1 ~ 7 日齢) 、 6 5 ~ 3 6 5 U / L (7 日齢 ~ 1 カ月) 、 8 0 ~ 4 2 5 U / L (1 ~ 3 カ月) 、 8 0 ~ 3 4 5 U / L (3 ~ 6 カ月) 、 6 0 ~ 3 3 0 U / L (6 ~ 1 2 カ月) 、 1 4 5 ~ 3 2 0 U / L (1 ~ 3 歳) 、 1 5 0 ~ 3 8 0 U / L (3 ~ 6 歳) 、 1 7 5 ~ 4 2 0 U / L (6 ~ 9 歳) 、 1 3 5 ~ 5 3 0 U / L (9 ~ 1 1 歳) 、 2 0 0 ~ 4 9 5 U / L (1 1 ~ 1 3 歳) 、 1 3 0 ~ 5 2 5 U / L (1 3 ~ 1 5 歳) 、 3 0 ~ 1 2 6 U / L (> 1 5 歳) 。

【図8】インビトロ血管新生は、変異体GNAQによって破壊され、CRACチャネル阻害によって救済される。(A) GNAQ WT又はGNAQ R183Qのいずれかを安定して発現するTIME細胞のインビトロでの内皮細胞管形成中のカルセインAM染色後

の、EVOS Fluidイメージングシステムで捕捉された代表的な画像。(B)(A)に示される血管新生アッセイの定量化(3つのうちの1つの代表的な実験、平均+/-SD)は、セグメント、分岐、及び単離されたエレメントの組み合わせられた長さとして定義されるネットワークの全長におけるWTと変異細胞との間の著しい差を実証する。3つの独立した実験での両側対応のないt検定を使用して計算された統計的有意性(**** $p < 0.0001$)。(C)血管新生アッセイの定量化(セグメント、分岐、及び単離されたエレメントの組み合わせられた長さとして定義されるネットワークの全長、4つの実験)は、ビヒクルとトロンビン(0.3 U/mL)処理TIME GNAQR183Qとの間の著しい差を示すが、TIME GNAQwtについて統計的に著しい差はない。4つの独立した実験の各々について、3つの技術的反復の平均として示される結果。4つの独立した実験(n.s.=統計的に著しくはない、* $p = 0.0125$)で両側対応のあるt検定によって行なった統計解析。(D)トロンビン0.3 U/mLの存在下で行った血管新生アッセイの定量化(セグメント、分岐、及び単離されたエレメントの組み合わせられた長さとして定義されるネットワークの全長、3つの実験)は、ビヒクルとCM4620(1 μ M)処理TIME GNAQR183Qとの間の著しい差を示すが、TIME GNAQwtについて統計的に著しい差はない。3つの独立した実験の平均+/-SD、及び両側対応のあるt検定によって行なった統計解析として示される結果(n.s.=統計的に著しくはない、* $p = 0.04$)。

【図9】GNAQ/GNA11モザイクを有する患者におけるミネラル(カルシウム)沈着及びカルシウム恒常性の破壊の血管内、血管周囲、及び実質の局所的なパターン。(A)広範囲の石灰化の病巣を有する皮質の画像。(B)壁の顆粒状の石灰化を伴う小さい皮質血管(毛細血管である可能性が高い)。(C)ミネラル及び線維化に囲まれた白質血管。(D)血管周囲沈着物及び顆粒状の実質ミネラル沈着を有する白質血管。各画像において、矢印は、ミネラル沈着の例を示す。スケールバー：A=500マイクロメートル B、C、及びD=50マイクロメートル。(E)2つの異なる時点での患者のコホートにおけるカルシウムプロファイリング調査における異常な結果のグラフ表示、モザイク病に典型的な患者内及び患者間の変動を示す。(F)患者のコホートからの、発作の発生と、pHに対して補正された血清イオン化カルシウムとの間の相関。散布図は、2つの群の平均を示し、赤いドットは、正常範囲を下回るイオン化カルシウム測定値に対応する。線形回帰分析は、統計的に著しい相関を示した($p = 0.05$)。(G)患者のコホートにおける、癲癇重積と、pHに対して補正された血清イオン化カルシウムとの間の相関。散布図は、2つの群の平均を示し、赤いドットは、正常範囲を下回るイオン化カルシウム測定値に対応する。線形回帰分析は、統計的に著しい相関を示した($p = 0.01$)。

【図10】ブドウ膜黒色腫細胞におけるGNAQ及びCRAC阻害。A.GNAQR183Q変異体アレルをサイレンシングする2つのsiRNAによるトランスフェクションにより、UPMM1 UM細胞株における変異体アレルの発現が低下した。UPMM1細胞を、トランスフェクトしないか、又は非標的対照siRNA(siscra)若しくは2つの異なるGNAQR183Q変異体特異的siRNA(signamut3及びsignamut6)でトランスフェクトし、変異体アレルの発現を、以前に検証したGNAQR183Q変異体特異的プライマー(フォワードプライマー：CAACAAGATGTGCTTAGAGTTCA(配列番号25)、リバースプライマー：CCCTACATCGACCATTCCTGAAA(配列番号26))を使用することによって測定した。B.GNAQ変異体アレルをサイレンシングするsiRNAによるトランスフェクションは、GPCRリガンド誘導カルシウム細胞内蓄積を減少させた。Fluo-8カルシウムマーカーを充填した細胞を、GPCRリガンドのロイコトリエンD4(LTD4)によって刺激し、経時的に蛍光を記録した。C.CRACチャネル阻害剤であるCM4620による処理は、UPMM1における細胞内カルシウムのGPCRリガンド誘導蓄積を減少させた。Fluo-8カルシウムプローブを充填した細胞を、1、3、又は10 μ MのCM4620によって処理し、GPCRリガンドのロイコトリエンD4(LTD4)によって刺激し、経時的に蛍光を記録した。

【図 1 1】 SWS / P P V 患者における様々な化合物の血清レベルとインタクトの F G F 2 3 又は C 末端 F G F 2 3 との相関

【図 1 2】 SWS / P P V 患者におけるカルシウム代謝機能を示す相関

【発明を実施するための形態】

【 0 1 2 4 】

一般的な遺伝的原因の発見により、皮膚黒色症及び E D M を有する G N A Q / 1 1 モザイク、SWS、及び P P V タイプは、現在、皮膚、脳、及び眼に影響を及ぼす血管及び／又は色素異常のスペクトルである同じ疾患の症状であり、他の臓器が潜在的に関与していると理解されている。SWS 及び P P V の血管疾患スペクトルは、多くの場合、重度かつ進行性の神経学的表現型を有し、本研究では発作の発症の平均値及び中央値がそれぞれ 1 . 0 5 歳及び 0 . 7 1 歳 (0 . 0 8 ~ 5 . 9 歳の範囲) であることが確認され、予防的アスピリン及び／又は抗癲癇薬を使用して悪化を軽減しようとする試みにつながっている [2 5] 。異常な神経血管系内及びその周囲のカルシウム沈着は、この疾患プロセスの特徴であることが長い間知られている。5 0 年前からの超微細構造研究は、組成物がカルシウムアパタイトのリン酸塩であることを示唆しており [2 6] 、結晶の成長パターンから、著者らは、このプロセスが血管系に由来するという仮説を立てた [2 7] 。それ以来、石灰化の発症はまだ十分に説明されていないが、異常な脳血管系の根底にある慢性無酸素症の問題の一因である可能性が高いことは明らかである。実際、放射線学的研究における頭蓋内石灰化の程度と静脈低灌流の程度との両方が、神経学的症状と相関している [2 8 、 2 9 、 3 0] 。更に、石灰化が時間の経過とともに発症するというここでの連続脳イメージングに関する明確な文書は、このプロセス及び関連する神経学的悪化を予防するための重要な潜在的なウィンドウを提供する。したがって、この古典的な病理学的所見の根底にある生物学的メカニズムを理解することは非常に望ましく、本発明者らは新しい治療的角度につながる可能性があると考えた。

【 0 1 2 5 】

本発明者らは、SWS / P P V が、バリエーション細胞における細胞内カルシウムシグナル伝達の異常及びそれらの細胞膜にわたる局所的な代償メカニズムによるカルシウム恒常性の障害に関連している可能性があるとして仮定した。時間が経つにつれて、このプロセスは、バリエーション組織内又は周囲に慢性的なカルシウム沈着をもたらし、潜在的には全身カルシウム恒常性の障害にもつながる可能性がある。本発明者らは、ここで、p H の値を適切に補正し、年齢調整された正常値を使用し、必要に応じて血清ビタミン D レベルを補正した後、SWS / P P V を有する患者のこのコホートの 4 3 % が、血清イオン化カルシウムが低いことを報告する。加えて、3 人の患者は、血清総カルシウム値が高く、P T H 、リン酸塩及び尿中カルシウム排泄に様々な異常が認められた。これらの観察は、この疾患表現型において、これまで報告されていなかった。これらの所見は、疾患プロセスの理解に大きく寄与するだけでなく、臨床管理にも関連する可能性がある。カルシウムは、興奮性膜の安定剤として知られており、血清カルシウムのレベルは、健康な個体において症状を引き起こすと予想されるほど異常ではなかったが、発作障害の文脈では、それらが重要な寄与因子である可能性がある。更に、体内の細胞の一部のみが変異の影響を受けるモザイク病の文脈では、カルシウムに対する測定可能な全身的影響は、例えば、罹患した神経血管系の周囲の局所的なカルシウム不均衡がはるかに極端であり得ることを強く示唆している。カルシウム代謝プロファイルの変動性は、患者がバリエーション細胞の数及び場所の両方で固有なモザイク病と完全に一致するであろう。全身性内分泌／代謝プロファイリングにおける同様の変動性は、先天性色素性母斑症候群 (N R A S モザイク) における G P C R 共役型下垂体前葉経路について以前に報告されており [3 1] 、マッキューン・オルブライト症候群 (G N A S モザイク) でよく知られている。

【 0 1 2 6 】

古典的には血管内及び周囲で「トラムライン」を生成するが、脳実質内でもカルシウム沈着が記載されており [2 7] 、ここでも確認された。これが、例えば、M R I の解像度では見えないであろう微小血管系の石灰化を表すような、血管石灰化をもたらすのと同じ

プロセスに起因するか、又はそれが別個の病因を有するかどうかは現在明らかではない。潜在的に関連しているのは、実質内石灰化と他の原因による全身性低カルシウム血症との間の十分に立証された関連性であり（〔32〕で概説）、SWS／PPVにおけるこの所見が代謝性カルシウム不均衡のより非特異的な合併症である可能性がある。

【0127】

本発明者らは、次いで、細胞レベルでのカルシウム恒常性に対するGNAQ及びGNA11変異の影響をモデル化することによって、この現象の根底にある分子メカニズムの調査に着手した。本発明者らは、変異により、微小血管内皮細胞における細胞内カルシウムシグナル伝達の基底活性化が増加し、リガンド刺激後の細胞内カルシウム蓄積が増加及び延長することを見出した。更に、後者は、細胞外カルシウム流入に依存する。変異特異的sRNAは、細胞モデルにおけるカルシウムシグナル伝達異常の両方の側面を救済し、遺伝子異常を機能的欠陥に結びつける。細胞外カルシウム流入は、特定のCRACチャネル阻害剤CM4620による処理がバリエーション細胞応答を阻害するため、細胞膜のストア感受性CRACカルシウムチャネルを介して媒介されることが強く示唆される。最後に、本発明者らは、これらのバリエーションが内皮細胞におけるMAPK経路を構成的に活性化しないことを確認する。

【0128】

細胞膜を横切るカルシウムの流入の変化は、患者において観察されるカルシウム恒常性の破壊についての広範なメカニズムの説明の始まりを提供する可能性がある。この仮説を裏付けるように、低イオン化低カルシウム血症の最も一般的な所見は、本発明者らのコホートにおける高齢者と統計的に相関しており、細胞レベルでの慢性的な異常が最終的には測定可能な全身的な変化を引き起こす可能性があることを示唆している。しかしながら、これがどのように起こるかは、バリエーション細胞についての詳細な多臓器評価、及びバリエーションGαq／Gα11の発現とカルシウム感知受容体（CaSRによってコードされる）との間の相互作用の徹底的な調査が必要になる。CaSRは体内で広く発現していることが知られており、他の文脈では血管疾患の病因に関与している。この研究では血圧は普遍的に正常であったが、少数の患者は高血圧につながる腎血管異常を有しており〔6、7〕、その解剖学的領域における潜在的な疾患病理を示す。PPVにおける色素細胞並びに血管細胞の関与はまた、元の単一細胞変異が純粋に血管発生学的分化の前に起こり得る可能性を開き、そのため、PPVを有する人はより広範な内部疾患を有する可能性がある。

【0129】

究極のメカニズムが何であれ、血清カルシウムの治療的矯正のためのカルシウム補給は適切ではない可能性が高く、潜在的に細胞外カルシウムに対するバリエーション細胞の需要に「火に油を注ぐ」可能性がある。代わりに、CRACチャネルの遮断がより適切であり得る。CM4620は既に、局所カルシウム恒常性及びCRACチャネル活性の乱れに関連する別の疾患である膵炎の治療のための第II相臨床試験（試験NCT04195347）に入っている〔33〕。

【0130】

結論として、疾患関連インビトロモデルを使用して、本発明者らは、GNAQ／11バリエーション内皮細胞における主要な生物学的異常は細胞内カルシウムシグナル伝達の過剰な活性化であり、これが異常な細胞外カルシウム流入を引き起こすという仮説を確認した。かなりの割合の患者における全身カルシウム恒常性の破壊は、他の実証可能な原因を有しておらず、年齢が上がるにつれて著しく増加し、これは、モザイク身体領域における慢性的に異常なカルシウム流入に起因することを示唆している。これらの所見は、神経血管石灰化の分子枠組みを提供し、皮膚黒色症を伴うSWS及びPPVにおける経時的な神経学的進行の潜在的な理由を提供する。最後に、本発明者らの結果は、カルシウムシグナル伝達及びCRACチャネルを標的化する新しい潜在的な治療選択肢への道を開く。

【0131】

定義

以下に、本明細書で使用される用語、技術的手段、及び実施形態の特定の定義を提供す

る。

【0132】

本明細書で使用される場合、「モザイク」又は「遺伝的モザイク」という用語は、胚又は胎児の発生中の単一細胞への遺伝子変異の結果として、単一の生物が複数の遺伝系統を有する多細胞生物における状態を指す。その細胞の子孫は、全て同じ変異を含み、それらの細胞でのみ存在するであろう。最近のコンセンサスの定義は、出生時までに単一の接合体に由来する個体における複数の遺伝子型の共存であり、疾患表現型〔34〕を生成することである（これは、出生後のいずれかの時点まで現れない可能性がある）。遺伝的モザイクは、多くの異なるメカニズムから生じる可能性があり、異なる遺伝的レベルでのモザイクにつながり、例えば、モザイクは、単一の点変異又は染色体全体の異数性に関連する可能性がある。モザイク変異は、2つの条件が満たされている場合、生殖系列のヘテロ接合性変異として将来の世代に受け継がれる可能性がある—1つ目は、それが生殖細胞に影響を与えること（通常は確認できない）、2つ目は、その変異が生殖系列の生命と適合性である場合（多くの場合であるが、疫学的研究から常に知られているわけではない）〔34、35〕。

10

20

30

【0133】

本明細書で使用される場合、「GNAQ」という用語は、CMC1、G-ALPHA-q、GAQ、SWS、及びGタンパク質サブユニットアルファqとしても知られているGNAQ遺伝子を指す（これは、例示的なRefSeqヒトタンパク質配列：NP_002063及び／又はNP_002063、2、RefSeqマウスタンパク質配列：NP_032165、RefSeqヒトmRNA配列：NP_032165、RefSeqマウスmRNA配列：NM_008139からなるか又はそれを含み得る）。グアニンヌクレオチド結合タンパク質は、細胞表面7回膜貫通ドメイン受容体を細胞内シグナル伝達経路と共役するヘテロ三量体タンパク質のファミリーである。受容体の活性化は、不活性型Gタンパク質アルファサブユニットに結合したGDPのGTPとの交換を触媒し、複合体のコンフォメーション変化及び解離をもたらす。Gタンパク質アルファ及びベータガンマサブユニットは、様々な細胞エフェクターを調節することができる。活性化は、G-アルファサブユニットに固有のGTPaseによって終結する。G-アルファ-qは、ホスホリパーゼC-ベータの刺激を媒介するヘテロ三量体GTP結合タンパク質のうちの1つのアルファサブユニットである。

40

50

【0134】

本明細書で使用される場合、「GNA11」という用語は、FBH、FBH2、FHH2、GNA-11、HHC2、HYPOC2、Gタンパク質サブユニットアルファ11、及びHG1Kとしても知られているGNA11遺伝子を指す（これは、例示的なRefSeqヒトタンパク質配列：NP_002058、RefSeqマウスタンパク質配列：NP_034431、RefSeqヒトmRNA配列：NP_034431、RefSeqマウスmRNA配列：NP_034431からなるか又はそれらを含み得る）。

【0135】

本明細書で使用される「機能獲得バリエーション」という用語は、当該遺伝子によってコードされるタンパク質（すなわち、バリエーションタンパク質）が、その固有の機能、又はそれ自体がタンパク質の固有の活性の変化を介して若しくは他の分子との相互作用の変化を介して作用し得る相互作用分子若しくは分子相互作用のカスケードに対するその効果のいずれかに関して、タンパク質に新しい機能又は強化された機能を付与する変異を有する遺伝子における任意の変異を指す。機能獲得変異は、コードされたタンパク質の機能の変化を引き起こす遺伝子における1つ又は複数のヌクレオチドの欠失、付加、又は置換であり得る。一実施形態では、機能獲得変異は、バリエーションタンパク質の機能を変化させるか、又は他のタンパク質との相互作用を引き起こす。別の実施形態では、機能獲得変異は、例えば、改変されたバリエーションタンパク質と当該正常な野生型タンパク質との相互作用によって、正常な野生型タンパク質の減少又は除去を引き起こす。別の実施形態では、機能獲得バリエーションは、タンパク質の正常な機能の増加又は減少を引き起こし、その活性又はその

下流効果の一部又は全てが、構成的に、及び／又は関連する生理学的刺激の下で増加若しくは誇張若しくは強調される。

【0136】

「バリエーション」という用語は、遺伝子変異を引き起こす疾患と、遺伝子の機能に影響を及ぼさない良性変異との両方を包含し得る。そのタンパク質の変化を生成する全てのタイプのDNA変化、例えば、コードされたタンパク質のアミノ酸配列の変化を引き起こす遺伝子における1つ又は複数のヌクレオチドの欠失、付加、又は置換などが含まれる。

【0137】

「発現構築物」は、例えば、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、発現カセット、又はプラスミドであり得る。発現構築物はまた、H1プロモーターのU6 snRNAプロモーターなどのRNAポリメラーゼIIプロモーター配列又はRNAポリメラーゼIIプロモーター配列を有し得る。本発明の発現構築物は、適切な発現系での使用に好適な任意の構築物を含み、当該技術分野で既知であるレトロウイルスベクター、線状発現カセット、プラスミド、及びウイルス又はウイルス由来のベクターを含むが、これらに限定されない。かかる発現構築物は、1つ以上の誘導性プロモーター、RNA Pol IIプロモーター系（例えば、U6 snRNAプロモーター若しくはHI RNAポリメラーゼIIプロモーター）又は当該技術分野で既知の他のプロモーターを含み得る。構築物は、siRNAの一方又は両方の鎖を含み得る。両方の鎖を発現する発現構築物はまた、両方の鎖を連結するループ構造を含んでもよく、又は各鎖は、同じ構築物内の別個のプロモーターから別個に転写されてもよい。各鎖は、別個の発現構築物から転写され得る。

10

20

【0138】

本明細書で使用される場合、「およそ」又は「約」という用語は、1つ以上の目的の値に適用される場合、記載される参照値に類似する値を指す。いくつかの実施形態では、「およそ」又は「約」という用語は、別途記載されない限り、又は文脈から明らかでない限り、記載された参照値のいずれかの方向（より大きい、より小さい）で25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%又はそれ未満内に収まる値の範囲を指す（そのような数値が可能な値の100%を超える場合を除く）。

【0139】

本明細書で使用される場合、「改善」という用語は、状態の予防、低減、若しくは緩和、あるいは対象の状態の改善又は重症度若しくは転帰の疾患バイオマーカーにおける改善を意味する。改善には、疾患状態の完全な回復又は完全な予防が含まれるが、必須ではない。

30

【0140】

本明細書で使用される場合、「比較可能な」という用語は、科学的に正当な比較を可能にするために、試験システム、条件のセット、効果、又は結果に十分に類似しているシステム、条件のセット、効果、又は結果を指す。当業者は、どのシステム、条件のセット、効果、又は結果が、本明細書に記載される任意の特定の試験システム、条件のセット、効果、又は結果と「比較可能」であるのに十分に類似しているかを認識し、理解するのであ

40

【0141】

「相関する」という用語は、本明細書で使用される場合、「との相関を示す」というその通常の意味を有する。当業者は、2つの特徴、項目、又は値が、それらが一緒に出現及び／又は変化する傾向を示す場合、一方と他方との相関を示すことを理解するのであろう。いくつかの実施形態では、相関は、そのp値が0.05未満である場合に統計的に著しく、いくつかの実施形態では、相関は、そのp値が0.01未満である場合に統計的に著しい。いくつかの実施形態では、相関は、回帰分析によって評価される。いくつかの実施形態では、相関は、相関係数である。

【0142】

50

本明細書で使用される場合、「改善する」、「増加する」、若しくは「低減する」という用語、又は文法的同義語は、本明細書に記載される治療の開始前の同じ個体における測定値（例えば、比較可能な条件下で取得された測定値）、又は本明細書に記載される治療の不在下での対照個体（又は複数の対照個体）における測定値などの、参照（ベースライン）測定値に対する値を示す。

【0143】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」は、一般に、ペプチド結合によって互いに結合された少なくとも2つのアミノ酸の鎖である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、少なくとも1つのペプチド結合によって他のアミノ酸に結合されている、少なくとも3～5つのアミノ酸を含み得る。当業者は、ポリペプチドが、場合によっては、「非天然」アミノ酸、又はそれにもかかわらず、任意選択的にポリペプチド鎖に組み込まれ得る他の実体を含むことを理解するであろう。

【0144】

本明細書で使用される場合、「タンパク質」という用語は、ポリペプチド（すなわち、ペプチド結合によって互いに連結された少なくとも2つのアミノ酸の鎖）を指す。タンパク質は、アミノ酸以外の部分（例えば、糖タンパク質、プロテオグリカンなどであり得る）を含み得、かつ／又はさもなければ処理若しくは修飾され得る。当業者は、「タンパク質」が、細胞によって産生される（シグナル配列の有無にかかわらず）完全なポリペプチド鎖であり得るか、又はその特徴的な部分であり得ることを理解するであろう。当業者は、タンパク質が、時折、例えば、1つ以上のジスルフィド結合によって連結されるか、又は他の手段によって会合した、2つ以上のポリペプチド鎖を含み得ることを理解するであろう。ポリペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸、又はその両方を含有し得、当該技術分野において既知の様々なアミノ酸修飾又は類似体のうちのいずれかを含有し得る。有用な修飾としては、例えば、末端アセチル化、アミド化、メチル化などが挙げられる。いくつかの実施形態では、タンパク質は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、合成アミノ酸、及びそれらの組み合わせを含み得る。「ペプチド」という用語は、一般に、約100アミノ酸未満、約50アミノ酸未満、20アミノ酸未満、又は10アミノ酸未満の長さを有するポリペプチドを指すために使用される。

【0145】

本明細書で使用される場合、「対象」、「個体」、又は「患者」という用語は、例えば、実験的、診断的、予防的、及び／又は治療的な目的のために、本発明の実施形態が使用又は投与され得る任意の生物を指す。典型的な対象としては、動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、及びヒトなどの哺乳類、昆虫、寄生虫など）が挙げられる。本発明の好ましい実施形態では、対象は、ヒトである。

【0146】

本明細書で使用される場合、「標的細胞」又は「標的組織」という用語は、任意の細胞、細胞型、組織、又は生物を指す。好ましい実施形態では、標的細胞又は標的組織は、血管細胞、メラノサイト細胞、及び／又は変異を含む任意の他の細胞型である。

【0147】

本明細書で使用される場合、「治療レジメン」という用語は、特定の疾患、障害、及び／又は状態の1つ以上の症状又は特徴の部分的な又は完全な軽減、寛解、緩和、阻害、防止、発症の遅延、重症度の低減、及び／又は発生率の低減に使用される任意の方法を指す。それは、任意選択的に規則的又は異なる時間間隔によって離間した1回以上の用量の投与を含み得る。いくつかの実施形態では、治療レジメンは、その性能が、（例えば、関連する細胞、組織、又は生物の集団にわたって）特定の効果（例えば、有害な状態又は疾患の減少又は排除）を達成するように設計されているもの及び／又はその達成と相関しているものである。いくつかの実施形態では、治療は、1つ以上の治療剤を同時に、連続的に、又は異なる時間に、同じ又は異なる時間投与することを含む。いくつかの実施形態では、「治療レジメン」は、遺伝子療法、遺伝子破壊、又は発現を誘導若しくは低減することが知られている他の方法（例えば、一次転写産物若しくはmRNAなどの特定の遺伝子産

物の転写、プロセッシング、及び／又は翻訳）などの遺伝的方法を含む。

【0148】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、任意の医学的治療に適用可能な妥当な利益／リスク比で治療される対象に治療効果を与える治療剤の量を指す。そのような治療効果は、客観的であり得る（すなわち、何らかの試験若しくはマーカーによって測定可能である）か、又は主観的であり得る（すなわち、対象が効果の指標を与えるか若しくは効果を感じる）。いくつかの実施形態では、「治療有効量」とは、疾患と関連する症状を改善すること、疾患の発症を予防又は遅延させること、及び／又は疾患の症状の重症度若しくは頻度を減少させることなどによって、特定の疾患若しくは状態を治療、改善、若しくは予防するのに有効であるか、又は検出可能な治療効果若しくは予防効果を示すのに有効である治療剤又は組成物の量を指す。治療有効量は、通常、複数の単位用量を含み得る投与レジメンで投与することができる。任意の特定の治療剤について、治療有効量（及び／又は有効な投与レジメン内の適切な単位用量）は、例えば、投与経路又は他の薬剤との組み合わせに依存して変動し得る。代替的又は追加的に、任意の特定の患者に対する特定の治療有効量（及び／又は単位用量）は、用いられる特定の治療剤の活性；用いられる特定の組成物；患者の年齢、体重、一般的な健康、性別及び食事；用いられる特定の治療剤の投与時間、投与経路、及び／又は排泄若しくは代謝速度；治療期間；並びに医学分野で周知の同様の要因を含む、様々な要因に依存し得る。

10

【0149】

本明細書で使用される場合、「治療」（また、「治療する」又は「治療すること」と）という用語は、特定の疾患、障害、及び／又は状態の1つ以上の症状又は特徴を部分的に又は完全に緩和、改善、軽減、阻害、それらの発症の遅延、それらの重症度の低減、及び／又はそれらの発生を低減する点で、所望の効果を達成する治療レジメンによる治療剤の任意の投与を指す。いくつかの実施形態では、治療レジメンによる治療剤の投与は、所望の効果の達成と関連する。そのような治療は、関連する疾患、障害、及び／若しくは状態の兆候を示していない対象、並びに／又は疾患、障害、及び／若しくは状態の早期兆候のみを示している対象の治療であり得る。代替的又は追加的に、そのような治療は、関連する疾患、障害及び／又は状態の1つ以上の確立された兆候を示す対象の治療であり得る。いくつかの実施形態では、治療は、関連する疾患、障害、及び／又は状態を患っていると診断されている対象の治療であり得る。いくつかの実施形態では、治療は、関連する疾患、障害、及び／又は状態の発症のリスクの増加と統計的に関連する、1つ以上の感受性因子を有することが分かっている対象の治療であり得る。

20

30

【0150】

本明細書で使用される場合、「アンチセンス化合物」とは、水素結合を介して標的核酸とハイブリダイズすることができるオリゴマー化合物を意味する。アンチセンス化合物の例としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA*、*shRNA*、*ssRNA*、及び占有ベースの化合物などの、一本鎖及び二本鎖化合物が挙げられる。

【0151】

本明細書で使用される場合、「アンチセンス阻害」とは、アンチセンス化合物の不在下での標的核酸レベルと比較した、標的核酸と相補的なアンチセンス化合物の存在下での標的核酸レベルの低減を意味する。

40

【0152】

本明細書で使用される場合、「アンチセンスメカニズム」とは、標的核酸を有する化合物のハイブリダイゼーションを含む全てのそれらのメカニズムであり、ハイブリダイゼーションの結果又は効果は、例えば、転写又はスプライシングを含む細胞機構の同時失速を伴う、標的の分解又は標的の占有のいずれかである。「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、標的核酸の対応する領域又はセグメントへのハイブリダイゼーションを可能にする核酸塩基配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドを意味する。

【0153】

本明細書で使用される場合、「部分」とは、核酸の連続した（すなわち、結合された）

50

核酸塩基の定義された数を意味する。いくつかの実施形態では、部分は、標的核酸の連続した核酸塩基の定義された数である。いくつかの実施形態では、部分は、アンチセンス化合物の連続した核酸塩基の定義された数である。

【0154】

本明細書で使用される場合、「予防する」とは、数分から無期限の期間の、疾患、障害、又は状態の発症、発達、又は進行を遅延又は阻止することを指す。また、「予防する」とは、疾患、障害、又は状態を発症するリスクを低減することを意味する。

【0155】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオシド」とは、核酸塩基部分及び糖部分を含む化合物を意味する。ヌクレオシドとしては、天然に存在するヌクレオシド（DNA及びRNAに見出される）及び修飾ヌクレオシドが挙げられるが、これらに限定されない。ヌクレオシドは、リン酸塩部分に連結され得る。

10

【0156】

本明細書で使用される場合、「化学修飾」又は「化学修飾された」とは、天然に存在する対応物と比較した場合の化合物の化学的差異を意味する。オリゴヌクレオチドの化学修飾には、ヌクレオシド修飾（糖部分の修飾及び核酸塩基の修飾を含む）及びヌクレオシド間結合の修飾が含まれる。オリゴヌクレオチドに関して、化学修飾には、核酸塩基配列のみの違いは含まれない。

【0157】

本明細書で使用される場合、「フラノシル」とは、4個の炭素原子及び1個の酸素原子を含む5員環を含む構造を意味する。

20

【0158】

本明細書で使用される場合、「天然に存在する糖部分」とは、天然に存在するRNAに見出されるリボフラノシル又は天然に存在するDNAに見出されるデオキシリボフラノシルを意味する。本明細書で言及される「天然に存在する糖部分」は、「非修飾糖部分」とも称される。特に、本明細書で言及されるそのような「天然に存在する糖部分」又は「非修飾糖部分」は、糖部分の2'位に-H（DNA糖部分）又は-OH（RNA糖部分）を有し、特に、糖部分の2'位に-H（DNA糖部分）を有する。

【0159】

本明細書で使用される場合、「糖部分」とは、ヌクレオシドの天然に存在する糖部分又は修飾糖部分を意味する。本明細書で使用される場合、「修飾糖部分」とは、置換糖部分又は糖代替物を意味する。

30

【0160】

本明細書で使用される場合、「置換糖部分」とは、置換されているフラノシルを意味する。置換糖部分には、2'位、3'位、5'位、及び／又は4'位に置換基を含むフラノシルが含まれるが、これらに限定されない。特定の置換糖部分は、二環式糖部分である。

【0161】

本明細書で使用される場合、「2'-置換糖部分」とは、H又はOH以外の2'位に置換基を含むフラノシルを意味する。特に明記しない限り、2'-置換糖部分は、二環式糖部分ではない（すなわち、2'-置換糖部分の2'-置換基は、フラノシル環の別の原子への架橋を形成しない）。

40

【0162】

本明細書で使用される場合、「MOE」とは、-OCH₂CH₂OCH₃を意味する。

【0163】

本明細書で使用される場合、「2'-Fヌクレオシド」とは、2'位にフッ素を含む糖を含むヌクレオシドを指す。特に明記しない限り、2'-Fヌクレオシドにおけるフッ素は、リボ位置にある（天然リボースのOHを置き換える）。RNA鎖にハイブリダイズした均一に修飾された2'-フッ素化（リボ）オリゴヌクレオチドの二重鎖は、RNAse H基質ではないが、ara類似体がRNAse H活性を保持する。

【0164】

50

本明細書で使用される場合、「糖代替物」という用語は、フラノシルを含まず、得られるヌクレオシドサブユニットが、一緒に連結され、かつ／又は他のヌクレオシドに連結されて、相補的なオリゴマー化合物にハイブリダイズすることができるオリゴマー化合物を形成することができるように、ヌクレオシドの天然に存在する糖部分を置き換えることができる構造を意味する。そのような構造は、フラノシルとは異なる数の原子を含む環（例えば、4、6、若しくは7員環）、フラノシルの酸素の非酸素原子（例えば、炭素、硫黄、若しくは窒素）による置換、又は原子数の変化と酸素の置換との両方を含む。そのような構造はまた、置換糖部分（例えば、任意選択的に追加の置換基を含む6員炭素環式二環式糖代替物）について記載されているものに対応する置換を含み得る。糖代替物はまた、より複雑な糖置換（例えば、ペプチド核酸の非環系）を含む。糖代替物には、限定されないが、モルホリノ、シクロヘキセニル、及びシクロヘキシトールが含まれる。

10

【0165】

本明細書で使用される場合、「二環式糖部分」とは、二環式構造をもたらす第2の環を形成するために、4～7員環の2つの原子を連結する架橋を含む4～7員環（フラノシルを含むが、これらに限定されない）を含む修飾糖部分を意味する。いくつかの実施形態では、4～7員環は、糖環である。いくつかの実施形態では、4～7員環は、フラノシルである。特定のかかる実施形態では、架橋は、フラノシルの2'-炭素と4'-炭素とを接続する。

【0166】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」とは、リン酸連結基を更に含むヌクレオシドを意味する。本明細書で使用される場合、「連結されたヌクレオシド」は、リン酸結合によって連結されていてもされていなくてもよく、したがって、「連結されたヌクレオチド」を含むが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、「連結されたヌクレオシド」とは、連続した配列中で接続される（すなわち、連結されたヌクレオシド間に更なるヌクレオシドが存在しない）ヌクレオシドである。

20

【0167】

本明細書で使用される場合、「核酸塩基」とは、糖部分に連結されてオリゴヌクレオチドに組み込まれ得るヌクレオシドを生成することができる原子団を意味し、原子団は、別のオリゴヌクレオチド又は核酸の相補的な天然に存在する核酸塩基と結合することができる。核酸塩基は、天然に存在し得るか、又は修飾され得る。

30

【0168】

本明細書で使用される場合、「非修飾核酸塩基」又は「天然に存在する核酸塩基」という用語は、RNA又はDNAの天然に存在する複素環式核酸塩基、すなわち、プリン塩基のアデニン（A）及びグアニン（G）、並びにピリミジン塩基のチミン（T）、シトシン（C）（5-メチルCを含む）、及びウラシル（U）を意味する。

【0169】

本明細書で使用される場合、「修飾核酸塩基」とは、天然に存在する核酸塩基ではない任意の核酸塩基を意味する。本明細書で使用される場合、「修飾ヌクレオシド」とは、天然に存在するRNA又はDNAヌクレオシドと比較して、少なくとも1つの化学修飾を含むヌクレオシドを意味する。修飾ヌクレオシドは、修飾糖部分及び／又は修飾核酸塩基を含み得る。

40

【0170】

本明細書で使用される場合、「二環式ヌクレオシド」又は「BNA」とは、二環式糖部分を含むヌクレオシドを意味する。本明細書で使用される場合、「ロックド核酸ヌクレオシド」又は「LNA」とは、4'-CH₂-O-2'架橋を含む二環式糖部分を含むヌクレオシドを意味する。本明細書で使用される場合、「2'-置換ヌクレオシド」とは、H又はOH以外の糖部分の2'位に置換基を含むヌクレオシドを意味する。特に明記しない限り、2'-置換ヌクレオシドは、二環式ヌクレオシドではない。

【0171】

本明細書で使用される場合、「デオキシヌクレオシド」とは、天然に存在するデオキシ

50

リボヌクレオシド（DNA）に見出される2'-Hフラノシル糖部分を含むヌクレオシドを意味する。いくつかの実施形態では、2'-デオキシヌクレオシドは、修飾核酸塩基を含むことができるか、又はRNA核酸塩基（ウラシル）を含むことができる。

【0172】

本明細書で使用される場合、「オリゴヌクレオチド」とは、複数の連結されたヌクレオシドを含む化合物を意味する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の非修飾リボヌクレオシド（RNA）及び／又は非修飾デオキシリボヌクレオシド（DNA）及び／又は1つ以上の修飾ヌクレオシドを含む。

【0173】

本明細書で使用される場合、「修飾オリゴヌクレオチド」とは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド及び／又は少なくとも1つの修飾されたヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドを意味する。

10

【0174】

本明細書で使用される場合、「連結」又は「連結基」とは、2つ以上の他の原子団と一緒に連結する原子団を意味する。

【0175】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオシド間結合」とは、オリゴヌクレオチド中の隣接するヌクレオシド間の共有結合を意味する。

【0176】

本明細書で使用される場合、「天然に存在するヌクレオシド間結合」とは、3'～5'のホスホジエステル結合を意味する。本明細書で使用される場合、「修飾されたヌクレオシド間結合」とは、天然に存在するヌクレオシド間結合以外の任意のヌクレオシド間結合を意味する。特に、本明細書で言及される「修飾されたヌクレオシド間結合」は、ホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合などの修飾垂リン酸結合基を含み得る。

20

【0177】

本明細書で使用される場合、「末端ヌクレオシド間結合」とは、オリゴヌクレオチド又はその定義された領域の最後の2つのヌクレオシド間の結合を意味する。

【0178】

本明細書で使用される場合、「リン連結基」とは、リン原子を含む連結基を意味し、天然に存在するRNA又はDNAに存在する天然に存在するリン連結基（例えば、ホスホジエステル連結基）、又は天然に存在するRNA又はDNAには一般に存在しない修飾されたリン連結基（例えば、ホスホロチオエート又はホスホロジチオエート連結基）を含み得る。したがって、リン連結基には、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホネート、ホスホロアミデート、ホスホロチオアミデート、チオノアルキルホスホネート、ホスホトリエステル、チオノアルキルホスホトリエステル、及びボラノホスフェートが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0179】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオシド間リン連結基」とは、2つのヌクレオシドを直接連結するリン連結基を意味する。

40

【0180】

本明細書で使用される場合、「オリゴマー化合物」とは、2つ以上の部分構造を含むポリマー構造を意味する。いくつかの実施形態では、オリゴマー化合物は、修飾オリゴヌクレオチドなどのオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴマー化合物は、1つ以上のコンジュゲート基及び／又は末端基及び／又はリガンドを更に含む。いくつかの実施形態では、オリゴマー化合物は、オリゴヌクレオチドからなる。いくつかの実施形態では、オリゴマー化合物は、1つ以上の連結されたモノマー糖部分の骨格を含み、各連結されたモノマー糖部分は、複素環式塩基部分に直接的又は間接的に結合される。いくつかの実施形態では、オリゴマー化合物は、複素環式塩基部分に連結されておらず、それによって、脱塩基部位を提供するモノマー糖部分を含んでいてもよい。

50

【0181】

本明細書で使用される場合、「末端基」とは、オリゴヌクレオチドの3'末端若しくは5'末端のいずれか、又は両方に結合された1つ以上の原子を意味する。いくつかの実施形態では、末端基は、1つ以上の末端基ヌクレオシドを含む。

【0182】

本明細書で使用される場合、「コンジュゲート」又は「コンジュゲート基」とは、オリゴヌクレオチド又はオリゴマー化合物に結合した原子又は原子団を意味する。いくつかの実施形態では、コンジュゲート基は、リガンドを修飾オリゴヌクレオチド又はオリゴマー化合物に連結する。一般に、コンジュゲート基は、それらが結合する化合物の1つ以上の特性を改変することができ、特性としては、薬力学的特性、薬物動態学的特性、結合特性、吸収特性、細胞内分布特性、細胞取り込み特性、電荷特性、及び／又はクリアランス特性が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0183】

本明細書で使用される場合、コンジュゲート基の文脈における「コンジュゲートリンカー」又は「リンカー」とは、任意の原子又は原子団を含み、オリゴヌクレオチドをコンジュゲート基の別の部分に共有結合するコンジュゲート基の一部を意味する。いくつかの実施形態では、オリゴマー化合物上の結合点は、オリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオシドの3'-ヒドロキシル基の3'-酸素原子である。いくつかの実施形態では、オリゴマー化合物上の結合点は、オリゴヌクレオチドの5'末端ヌクレオシドの5'-ヒドロキシル基の5'-酸素原子である。いくつかの実施形態では、オリゴマー化合物への結合を形成するための結合は、切断可能な結合である。特定のかかる実施形態では、かかる切断可能な結合は、切断可能な部分の全部又は一部を構成する。

20

【0184】

いくつかの実施形態では、コンジュゲート基は、切断可能な部分（例えば、切断可能な結合又は切断可能なヌクレオシド）と、1つ以上のリガンドを含み得るリガンド部分、例えば、炭水化物のクラスター部分（例えば、N-アセチル-ガラクトサミン（「GalNAc」とも称される）のクラスター部分）と、を含む。いくつかの実施形態では、炭水化物のクラスター部分は、リガンドの数及び同一性によって特定される。例えば、いくつかの実施形態では、炭水化物のクラスター部分は、2個のGalNAc基を含む。例えば、いくつかの実施形態では、炭水化物のクラスター部分は、3つのGalNAc基を含み、これは特に好ましい。いくつかの実施形態では、炭水化物のクラスター部分は、4つのGalNAc基を含む。そのようなリガンド部分は、切断可能な部分（例えば、切断可能な結合又は切断可能なヌクレオシド）を介してオリゴマー化合物に結合される。リガンドは、二分岐構成又は三分岐構成などの直鎖又は分岐鎖構成で配置され得る。

30

【0185】

本明細書で使用される場合、「切断可能な部分」とは、生理学的条件下で切断され得る結合又は基を意味する。いくつかの実施形態では、切断可能な部分は、エンドソーム又はリソソームなどの細胞又は細胞内コンパートメントの内部で切断される。いくつかの実施形態では、切断可能な部分は、ヌクレアーゼなどの内因性酵素によって切断される。いくつかの実施形態では、切断可能な部分は、1、2、3、4、又は5つ以上の切断可能な結合を有する原子団を含む。いくつかの実施形態では、切断可能な部分は、ホスホジエステル結合である。

40

【0186】

本明細書で使用される場合、「切断可能な結合」とは、切断され得る任意の化学結合を意味する。本明細書で使用される場合、「炭水化物クラスター」とは、リンカー基に結合された1つ以上の炭水化物残基を有する化合物を意味する。

【0187】

本明細書で使用される場合、「修飾炭水化物」とは、天然に存在する炭水化物に対して1つ以上の化学修飾を有する任意の炭水化物を意味する。本明細書で使用される場合、「炭水化物誘導体」とは、出発物質又は中間体として炭水化物を使用して合成され得る任意

50

の化合物を意味する。

【0188】

本明細書で使用される場合、「炭水化物」とは、天然に存在する炭水化物、修飾炭水化物、又は炭水化物誘導体を意味する。炭水化物は、炭素（C）、水素（H）、及び酸素（O）原子を含む生体分子である。炭水化物は、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、又は多糖、例えば、1つ以上のガラクトース部分、1つ以上のラクトース部分、1つ以上のN-アセチル-ガラクトサミン部分、及び／又は1つ以上のマンノース部分を含み得る。特に好ましい炭水化物は、N-アセチル-ガラクトサミン部分である。

【0189】

本明細書で使用される場合、「鎖」とは、連結されたヌクレオシドを含むオリゴマー化合物を意味する。本明細書で使用される場合、「一本鎖（single strand）」又は「一本鎖（single-stranded）」とは、それらの間で切断することなく連続した配列で接続されている連結されたヌクレオシドを含むオリゴマー化合物を意味する。そのような一本鎖は、ヘアピン構造において安定した自己二重鎖を形成することができるように、十分な自己相補性の領域を含み得る。

10

【0190】

本明細書で使用される場合、「ヘアピン」とは、自己相補的で方向性が反対の鎖における配列間の塩基対合によって形成された二重鎖を含む一本鎖オリゴマー化合物を意味する。本明細書で使用される場合、「ヘアピンループ」とは、自己相補配列のハイブリダイゼーションの結果として生成される、ヘアピンにおける連結されたヌクレオシドの非対合ループを意味する。得られる構造は、ループ又はU字型のように見える。

20

【0191】

本明細書で使用される場合、「方向性」とは、糖部分における炭素原子の番号付けの化学的慣例に基づくオリゴヌクレオチドの末端から末端への化学的配向を意味し、糖部分の5'炭素によって定義される5'末端、及び糖部分の3'炭素によって定義される3'末端が存在するであろうことを意味する。二重鎖又は二本鎖オリゴヌクレオチドにおいて、それぞれの鎖は、それらの間の塩基対合を可能にするために、反対の5'から3'方向に走る。

【0192】

本明細書で使用される場合、「二重鎖」とは、それらの間の非共有結合性の配列特異的相互作用によって一緒にハイブリダイズした1つ又は複数のオリゴヌクレオチドの2つ以上の相補鎖領域又は鎖を意味する。最も一般的には、二重鎖におけるハイブリダイゼーションは、核酸塩基のアデニン（A）とチミン（T）、及び／又は（A）アデニンとウラシル（U）、及び／又はグアニン（G）とシトシン（C）との間であるであろう。二重鎖は、一本鎖構造の一部であってもよく、自己相補性がハイブリダイゼーションをもたらすか、又は二本鎖構築物におけるそれぞれの鎖間のハイブリダイゼーションの結果であってもよい。

30

【0193】

本明細書で使用される場合、「二重鎖（double strand）」又は「二本鎖（double stranded）」とは、互いにハイブリダイズした一対のオリゴマー化合物を意味する。いくつかの実施形態では、二本鎖オリゴマー化合物は、第1のオリゴマー化合物及び第2のオリゴマー化合物を含む。

40

【0194】

本明細書で使用される場合、「発現」とは、遺伝子が最終的にタンパク質をもたらすプロセスを意味する。発現には、転写、転写後修飾（例えば、スプライシング、ポリアデニ化、5'-キャップの付加）、及び翻訳が含まれるが、これらに限定されない。

【0195】

本明細書で使用される場合、「転写」又は「転写された」とは、DNAの標的配列が酵素のRNAポリメラーゼによってRNA（特に、mRNA）に複製される、DNAベースの遺伝子発現のいくつかのステップの最初のステップを指す。転写中、DNA配列はRNAポリメラーゼによって読み取られ、これは、一次転写産物と呼ばれる相補的な逆平行R

50

N A 配列を生成する。

【0196】

本明細書で使用される場合、「標的配列」とは、オリゴマー化合物がハイブリダイズして、目的の疾患又は遺伝子機能に関して所望の活性をもたらすことが意図されるヌクレオシド配列を意味する。オリゴヌクレオチドは、生理学的条件下でのハイブリダイゼーションを可能にするために、その標的配列に十分な相補性を有する。

【0197】

本明細書で使用される場合、「核酸塩基相補性」又は「相補性」とは、核酸塩基に関して、別の核酸塩基と塩基対合することができる核酸塩基を意味する。例えば、DNAでは、アデニン（A）は、チミン（T）に相補的である。例えば、RNAでは、アデニン（A）は、ウラシル（U）に相補的である。DNA及びRNAの両方で、グアニン（G）は、シトシン（C）に相補的である。いくつかの実施形態では、相補的核酸塩基は、その標的配列の核酸塩基と塩基対合することができるオリゴマー化合物の核酸塩基を意味する。例えば、オリゴマー化合物の特定の位置の核酸塩基が、標的配列の特定の位置の核酸塩基と水素結合することができる場合、オリゴマー化合物と標的配列との間の水素結合の位置は、その核酸塩基対で相補的であるとみなされる。特定の修飾を含む核酸塩基は、対応する核酸塩基と対合する能力を維持することができ、したがって、核酸塩基の相補性が依然として可能である。

10

【0198】

本明細書で使用される場合、「非相補的」とは、互いに水素結合を形成しない一対の核酸塩基を意味する。本明細書で使用される場合、オリゴマー化合物（例えば、連結されたヌクレオシド、オリゴヌクレオチド）に関して「相補的」とは、核酸塩基の相補性を介して、そのようなオリゴマー化合物又はその領域が標的配列又はオリゴマー化合物自体の領域にハイブリダイズする能力を意味する。

20

【0199】

相補的なオリゴマー化合物は、各ヌクレオシドで相補的な核酸塩基を有する必要はない。むしろ、いくつかのミスマッチが許容される。いくつかの実施形態では、相補的なオリゴマー化合物又は領域は、核酸塩基の70%で相補的（70%相補的）である。いくつかの実施形態では、相補的なオリゴマー化合物又は領域は、少なくとも80%相補的である。いくつかの実施形態では、相補的なオリゴマー化合物又は領域は、少なくとも90%相補的である。いくつかの実施形態では、相補的なオリゴマー化合物又は領域は、少なくとも95%相補的である。いくつかの実施形態では、相補的なオリゴマー化合物又は領域は、少なくとも100%相補的である。

30

【0200】

本明細書で使用される場合、オリゴマー化合物に関して「自己相補性」とは、それ自体を折り返し、内部相補的鎖領域の核酸塩基ハイブリダイゼーションの結果として二重鎖を生成し得る化合物を意味する。鎖領域がどの程度一緒に接近しているか、及び／又は長さに応じて、化合物がヘアピンループ、接合部、バルジ、又は内部ループを形成する可能性がある。

【0201】

本明細書で使用される場合、「ミスマッチ」とは、オリゴマー化合物が自己相補性の結果としてハイブリダイズする場合、オリゴマー化合物と標的配列及び／又はオリゴマー化合物の自己相補領域とがアライメントされる場合、標的配列の対応する位置又はオリゴマー化合物自体の対応する位置で、核酸塩基と対合することができないオリゴマー化合物の核酸塩基を意味する。

40

【0202】

本明細書で使用される場合、「ハイブリダイゼーション」とは、相補的なオリゴマー化合物（例えば、オリゴマー化合物及びその標的配列）の対合を意味する。特定のメカニズムに限定されるものではないが、対合の最も一般的なメカニズムは水素結合を伴い、これは、相補的な核酸塩基間でのワトソン・クリック型、フーグスティーン型、又は逆フーグ

50

スティーン型水素結合であり得る。

【0203】

本明細書で使用される場合、「特異的にハイブリダイズする」とは、オリゴマー化合物が、別の核酸部位にハイブリダイズするよりも高い親和性で、ある核酸部位にハイブリダイズする能力を意味する。

【0204】

本明細書で使用される場合、オリゴマー化合物又はその領域に関して「完全に相補的」とは、オリゴマー化合物又はその領域の各核酸塩基が、相補的な核酸標的配列の核酸塩基又はオリゴマー化合物の自己相補領域と対合することができることを意味する。したがって、完全に相補的なオリゴマー化合物又はその領域は、その標的配列又はオリゴマー化合物の自己相補領域に関してミスマッチの又はハイブリダイズしない核酸塩基を含まない。

10

【0205】

本明細書で使用される場合、「パーセント相補性」とは、標的核酸の等長部分と相補的であるオリゴマー化合物の核酸塩基の割合(%)を意味する。パーセント相補性は、標的核酸における対応する位置の核酸塩基に相補的であるオリゴマー化合物の核酸塩基の数をオリゴマー化合物の全長で割ることによって計算される。

【0206】

本明細書で使用される場合、「パーセント同一性」とは、第2の核酸における対応する位置の核酸塩基と同じタイプ(化学修飾とは無関係)である第1の核酸における核酸塩基の数を、第1の核酸における核酸塩基の総数で割ったものを意味する。

20

【0207】

本明細書で使用される場合、「調節」とは、調節前の分子、機能、又は活性の量又は質と比較した場合の分子、機能、又は活性の量又は質の変化を意味する。例えば、調節は、遺伝子発現の増加(刺激又は誘導)又は減少(阻害又は低減)のいずれかの変化を含む。

【0208】

本明細書で使用される場合、ヌクレオシド又はヌクレオシドの「タイプ」に関する「修飾のタイプ」とは、ヌクレオシドの化学修飾を意味し、修飾及び非修飾ヌクレオシドを含む。したがって、特に明記しない限り、「第1のタイプの修飾を有するヌクレオシド」は、非修飾ヌクレオシドであり得る。

【0209】

本明細書で使用される場合、「差次的に修飾された」とは、修飾の不在を含む、互いに異なる化学修飾又は化学置換基を意味する。したがって、例えば、MOEヌクレオシド及び非修飾の天然に存在するRNAヌクレオシドは、天然に存在するヌクレオシドが非修飾であっても、「差次的に修飾され」ている。同様に、DNA及びRNAオリゴヌクレオチドは、両方とも天然に存在する非修飾ヌクレオシドであっても、「差次的に修飾され」ている。同じであるが、異なる核酸塩基を含むヌクレオシドは、差次的に修飾されていない。例えば、2'-OMe修飾糖部分及び非修飾アデニン核酸塩基を含むヌクレオシド、並びに2'-OMe修飾糖部分及び非修飾チミン核酸塩基を含むヌクレオシドは、差次的に修飾されていない。

30

【0210】

本明細書で使用される場合、「同じタイプの修飾」とは、修飾の不在を含む、互いに同じである修飾を指す。したがって、例えば、2つの非修飾RNAヌクレオシドは、RNAヌクレオシドが非修飾であっても、「同じタイプの修飾」を有する。同じタイプの修飾を有するかかるヌクレオシドは、異なる核酸塩基を含み得る。

40

【0211】

本明細書で使用される場合、「領域(region)」若しくは「領域(regions)」、又は「部分(portion)」若しくは「部分(portions)」は、特に本明細書で提供される特許請求の範囲及び定義を参照して、本明細書で定義される機能又は特徴を有する複数の連結されたヌクレオシドを意味する。典型的には、そのような領域又は部分は、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、又は少なくと

50

も 13 個の連結されたヌクレオシドを含む。例えば、そのような領域は、13～20 個の連結されたヌクレオシド、例えば、13～16 個又は 18～20 個の連結されたヌクレオシドを含み得る。典型的には、本明細書で定義される第 1 の領域は、本質的に 18～20 個のヌクレオシドからなり、本明細書で定義される第 2 の領域は、本質的に 13～16 個の連結されたヌクレオシドからなる。

【0212】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体又は希釈剤」とは、動物への投与に使用するのに好適な任意の物質を意味する。いくつかの実施形態では、薬学的に許容される担体又は希釈剤は、滅菌生理食塩水である。いくつかの実施形態では、そのような滅菌食塩水は、医薬品グレードの生理食塩水である。

10

【0213】

本明細書で使用される場合、「置換基 (substituent)」及び「置換基 (substituent group)」とは、命名された親化合物の原子又は基を置き換える原子又は基を意味する。例えば、修飾ヌクレオシドの置換基は、天然に存在するヌクレオシドに見出される原子又は基とは異なる任意の原子又は基である (例えば、修飾 2'-置換基は、H 又は OH 以外のヌクレオシドの 2' 位にある任意の原子又は基である)。置換基は、保護されてもよく、又は保護されなくてもよい。いくつかの実施形態では、本開示の化合物は、親化合物の 1 つ以上の位置に置換基を有する。置換基はまた、他の置換基で更に置換されてもよく、酸素、アルキル、又はヒドロカルビル基などの連結基に直接又はそれを介して親化合物に結合されてもよい。

20

【0214】

そのような置換基は、糖部分の修飾として、特に糖部分の 2' 位に存在する置換基として存在してもよい。特に明記しない限り、置換基として使用に適した基としては、ハロ、ヒドロキシル、アルキル、アルケニル、アルキニル、アシル、カルボキシル、アルコキシ、アルコキシアルキレン、及びアミノ置換基のうちの 1 つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載される特定の置換基は、糖部分の環に直接結合された修飾 (糖環に直接結合されたハロなど、フルオロなど)、又はそれ自体が糖部分に直接連結された酸素結合原子 (例えば、酸素原子に連結されたアルコキシアルキレン (例えば、メトキシメチレン) など、全体として糖部分の 2' 位に結合された本明細書に記載される MOE 置換基を提供する) によって糖部分の環に間接的に連結された修飾を表す場合がある。

30

【0215】

本明細書で使用される場合、「アルキル」とは、本明細書で使用される場合、飽和直鎖又は分岐鎖一価 C₁ - 6 炭化水素ラジカルを意味し、メチルは、糖部分の 2' 位の置換基として最も好ましいアルキルである。アルキル基は、典型的には、糖の 2' 位の酸素結合原子に結合し、したがって、全体として、本発明によるオリゴマー化合物の糖部分上の -OCH₃ 置換基などの -Oアルキル置換基を提供する。これは、当業者にはよく理解されるであろう。

【0216】

本明細書で使用される場合、「アルキレン」とは、一般式 -C_nH_{2n}- (式中、n は、1～6 である) の飽和直鎖又は分岐鎖二価炭化水素ラジカルを意味する。メチレン又はエチレンは、好ましいアルキレンである。

40

【0217】

本明細書で使用される場合、「アルケニル」とは、直鎖又は分岐鎖の不飽和一価 C₂ - 6 炭化水素ラジカルを意味し、エテニル又はプロペニルは、糖部分の 2' 位の置換基として最も好ましいアルケニルである。当該技術分野で十分に理解されるように、アルケニルラジカルに存在する不飽和度は、少なくとも 1 つの炭素-炭素二重結合の存在である。アルケニル基は、典型的には、糖の 2' 位の酸素結合原子に結合し、したがって、全体的として、本発明によるオリゴマー化合物の糖部分上の -OCH₂CH=CH₂ 置換基などの -Oアルケニル置換基を提供する。これは、当業者にはよく理解されるであろう。

【0218】

50

本明細書で使用される場合、「アルキニル」とは、直鎖又は分岐鎖の不飽和C2-6炭化水素ラジカルを意味し、エチニルは、糖部分の2'位の置換基として最も好ましいアルキニルである。当該技術分野で十分に理解されるように、アルキニルラジカルに存在する不飽和度は、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合の存在である。アルキニル基は、典型的には、糖の2'位の酸素結合原子に結合し、したがって、全体として、本発明によるオリゴマー化合物の糖部分上に-Oアルキニル置換基を提供する。これは、当業者にはよく理解されるであろう。

【0219】

本明細書で使用される場合、「カルボキシル」は、一般式-CO₂Hを有するラジカルである。

【0220】

本明細書で使用される場合、「アシル」は、本明細書で定義されるカルボキシルラジカルからヒドロキシル基を除去することによって形成され、一般式-C(O)-X（式中、Xは典型的にはC1-6アルキルである）を有するラジカルを意味する。

【0221】

本明細書で使用される場合、「アルコキシ」とは、C1-6アルキル基などのアルキル基と酸素原子との間に形成されるラジカルを意味し、酸素原子は、アルコキシ基を親分子（例えば、糖部分の2'位の）、又は本明細書で定義されるアルキレン基などの別の基に結合するために使用される。アルコキシ基の例としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、sec-ブトキシ、及びtert-ブトキシが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用されるアルコキシ基は、任意選択的に、更なる置換基を含み得る。

【0222】

本明細書で使用される場合、アルコキシアルキレンとは、本明細書で定義されるアルキレン基に結合した本明細書で定義されるアルコキシ基を意味し、アルコキシ基の酸素原子がアルキレン基に結合し、アルキレンが親分子に結合する。アルキレン基は、典型的には、糖の2'位で酸素結合原子に結合し、したがって、全体的として、本発明によるオリゴマー化合物の糖部分上の-OCH₂CH₂OCH₃置換基などの-Oアルキレンアルコキシ置換基を提供する。これは、当業者によってよく理解され、一般に、本明細書で定義され、かつ当該技術分野で既知のMOE置換基と称される。

【0223】

本明細書で使用される場合、「アミノ」は、一級、二級、及び三級アミノ基を含む。本明細書で使用される場合、「ハロ」及び「ハロゲン」は、フッ素、塩素、臭素、及びヨウ素から選択される原子を意味する。

【0224】

また、本明細書に記載される核酸分子又は化合物は、生理学的に関連する条件下でハイブリダイゼーションを維持するのに十分な相補性がある場合、一方又は両方の鎖の一方又は両方の末端に1つ以上の非ハイブリダイズヌクレオシド（オーバーハング）及び／又は1つ以上の内部非ハイブリダイズヌクレオシド（ミスマッチ）を有し得ることが理解されるであろう。代替的に、本明細書に記載されるオリゴマー化合物は、少なくとも一方の末端が平滑末端であってもよい。

【0225】

本明細書で使用される「含む（comprising）」という用語は、特定された方法のステップ又は要素を含むことを意味するが、そのようなステップ又は要素は、排他的なリストを含まず、したがって、追加のステップ又は要素が存在する場合があることを意味する。

【0226】

更に、「含む（includes）」という用語が詳細な説明又は特許請求の範囲のいずれかで使用される限り、そのような用語は、「含む（comprising）」という用語が特許請求の範囲における移行語として用いられる場合に解釈されるように、「含む

10

20

30

40

50

(comprising)」という用語と同様の様式で包含的であることが意図される。

【0227】

薬剤の薬学的組成物

本明細書で使用される場合、「薬学的組成物」とは、個体に投与するのに好適な物質の混合物を意味する。例えば、薬学的組成物は、1つ以上の活性薬剤及び滅菌水溶液を含み得る。

【0228】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される塩」とは、アンチセンス化合物の生理学的及び薬学的に許容される塩、すなわち、親オリゴヌクレオチドの所望の生物学的活性を保持し、それに対して望ましくない毒物学的影響を与えない塩を意味する。

10

【0229】

本発明の他の態様はまた、本発明による組成物又は本発明による核酸と、該当する場合、好適な賦形剤及び添加剤（例えば、生理食塩水、安定剤、又はプロテアーゼ阻害剤）とを含む、医薬品又は診断補助剤に関する。

【0230】

アンチセンスメカニズム

いくつかの実施形態では、アンチセンス化合物は、アンチセンス化合物に、阻害活性の増強、標的核酸に対する結合親和性の増加、又はインビボヌクレアーゼによる分解に対する耐性などの特性を付与するために、パターン又はモチーフで配置された化学修飾サブユニットを有する。

20

【0231】

キメラアンチセンス化合物は、典型的には、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の増加、細胞取り込みの増加、標的核酸に対する結合親和性の増加、及び／又は阻害活性の増加を付与するように修飾された少なくとも1つの領域を含む。キメラアンチセンス化合物の第2の領域は、例えば、RNA：DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼRNase Hの基質として機能する別の所望の特性を付与し得る。

【0232】

アンチセンス活性は、アンチセンス化合物（例えば、オリゴヌクレオチド）の標的核酸とのハイブリダイゼーションを含む任意のメカニズムから生じ得、ハイブリダイゼーションにより、最終的に生物学的効果がもたらされる。いくつかの実施形態では、標的核酸の量及び／又は活性が調節される。いくつかの実施形態では、標的核酸の量及び／又は活性が減少する。いくつかの実施形態では、標的核酸へのアンチセンス化合物のハイブリダイゼーションは、最終的に標的核酸分解をもたらす。いくつかの実施形態では、アンチセンス化合物の標的核酸へのハイブリダイゼーションは、標的核酸分解をもたらさない。特定のかかる実施形態では、標的核酸とハイブリダイゼーションしたアンチセンス化合物が存在（占有）により、アンチセンス活性の調節がもたらされる。いくつかの実施形態では、化学修飾の特定の化学モチーフ又はパターンを有するアンチセンス化合物は、1つ以上のメカニズムを利用するのに特に好適である。いくつかの実施形態では、アンチセンス化合物は、2つ以上のメカニズムを通して、及び／又は解明されていないメカニズムを通して機能する。したがって、本明細書に記載されるアンチセンス化合物は、特定のメカニズムによって限定されない。

30

40

【0233】

アンチセンスのメカニズムには、限定されないが、RNase H媒介アンチセンス、RNAiのメカニズム（RISC経路を利用し、限定されないが、siRNA、ssRNA、及びマイクロRNAのメカニズムを含む）、並びに占有ベースのメカニズムが含まれる。特定のアンチセンス化合物は、2つ以上のそのようなメカニズム及び／又は追加のメカニズムを介して作用し得る。

【0234】

RNase H媒介アンチセンス。いくつかの実施形態では、アンチセンス活性は、少なくとも部分的には、RNase Hによる標的RNAの分解から生じる。RNase Hは、

50

RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼである。「DNA様」である一本鎖アンチセンス化合物が、哺乳動物細胞においてRNaseH活性を誘発することが当該技術分野で既知である。したがって、DNA又はDNA様ヌクレオシドの少なくとも一部分を含むアンチセンス化合物は、RNaseHを活性化することができ、その結果、標的核酸の切断がもたらされる。いくつかの実施形態では、RNaseHを利用するアンチセンス化合物は、1つ以上の修飾ヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、そのようなアンチセンス化合物は、1～8個の修飾ヌクレオシドの少なくとも1つのブロックを含む。特定のかかる実施形態では、修飾ヌクレオシドは、RNaseH活性を支持しない。いくつかの実施形態では、そのようなアンチセンス化合物は、本明細書に記載されるギャップマーである。

10

【0235】

RNAi化合物。いくつかの実施形態では、アンチセンス化合物は、干渉RNA化合物(RNAi)であり、これには、二本鎖RNA化合物(短鎖干渉RNA又はsiRNAとしても称される)及び一本鎖RNAi化合物(又はssRNA)が含まれる。そのような化合物は、少なくとも部分的にRISC経路を通して作用し、標的核酸を分解及び／又は隔離する(したがって、マイクロRNA／マイクロRNA模倣化合物を含む)。いくつかの実施形態では、アンチセンス化合物は、それらをそのようなメカニズムに特に好適なものにする修飾を含む。

【0236】

コンジュゲート

いくつかの実施形態では、本開示は、コンジュゲートアンチセンス化合物を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、核酸転写産物に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むコンジュゲートアンチセンス化合物を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、細胞を、核酸転写産物に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを含むコンジュゲートアンチセンス化合物と接触させることを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、細胞を、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含むコンジュゲートアンチセンス化合物と接触させることと、細胞において核酸転写産物の量又は活性を低減させることと、を含む方法を提供する。

20

【0237】

アシアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)は、以前に記載されている。例えば、Park et al., PNAS vol. 102, No. 47, pp 17125-17129 (2005)を参照されたい。そのような受容体は、肝臓細胞(特に肝細胞)上で発現される。更に、3つのN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)リガンドのクラスターを含む化合物は、ASGPRに結合することができ、その結果、化合物が細胞に取り込まれることが示されている。例えば、Khorev et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry, 16, 9, pp 5216-5231 (May 2008)を参照されたい。

30

【0238】

したがって、かかるGalNAcクラスターを含むコンジュゲートは、特定の化合物の肝臓細胞(特に肝細胞)への取り込みを促進するために使用されている。例えば、特定のGalNAc含有コンジュゲートが、インビボで肝臓細胞における二重鎖siRNA化合物の活性を増加させることが示されている。そのような場合、GalNAc含有コンジュゲートは、典型的には、siRNA二重鎖のセンス鎖に結合する。センス鎖は、アンチセンス鎖が最終的に標的核酸とハイブリダイズする前に破棄されるため、コンジュゲートが活性を妨げることはほとんど懸念されない。コンジュゲートを欠く同じアンチセンス化合物と比較して、インビボで肝臓細胞で改善された効力を有するコンジュゲート一本鎖アンチセンス化合物が、本明細書に開示される。

40

【0239】

いくつかの実施形態では、本明細書のコンジュゲート基は、切断可能な部分を含む。前述したように、メカニズムに拘束されることを望むものではないが、コンジュゲートが、

50

取り込みの増強を提供するのに十分長く化合物上に留まる必要があることは論理的であるが、その後、コンジュゲートのいくつかの部分、又は理想的には全てが切断され、親化合物（例えば、アンチセンス化合物）が最も活性な形態で放出されることが望ましい。いくつかの実施形態では、切断可能な部分は、切断可能なヌクレオシドである。そのような実施形態は、ホスホジエステル結合のものなどの1つ以上の切断可能な結合を介して、ヌクレオシドを介してコンジュゲート（クラスター）の残りをアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合することによって、細胞における内因性ヌクレアーゼを利用する。いくつかの実施形態では、クラスターは、ホスホジエステル結合を介して切断可能なヌクレオシドに結合される。いくつかの実施形態では、切断可能なヌクレオシドは、ホスホジエステル結合によってアンチセンスオリゴヌクレオチド（アンチセンス化合物）に結合される。いくつかの実施形態では、コンジュゲート基は、2つ又は3つの切断可能なヌクレオシドを含み得る。そのような実施形態では、そのような切断可能なヌクレオシドは、切断可能な結合（例えば、ホスホジエステル結合のもの）を介して、アンチセンス化合物及び／又はクラスターに互いに連結される。本明細書における特定のコンジュゲートは、切断可能なヌクレオシドを含まず、代わりに、切断可能な結合を含む。オリゴヌクレオチドからの複合体の十分な切断は、細胞における切断に対して脆弱な少なくとも1つの結合（切断可能な結合）によって提供されることが示されている。

10

【0240】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートアンチセンス化合物は、プロドラッグである。そのようなプロドラッグは、動物に投与され、最終的により活性な形態に代謝される。例えば、コンジュゲートアンチセンス化合物を切断して、コンジュゲートの全部又は一部を除去し、コンジュゲートの全部又は一部を欠くアンチセンス化合物の活性な（又はより活性な）形態がもたらされる。

20

【0241】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、オリゴヌクレオチドの5'末端に結合される。特定のそのような5'コンジュゲートは、3'末端に結合された同様のコンジュゲート基を有する対応物よりも効率的に切断される。いくつかの実施形態では、改善された活性は、改善された切断と相関し得る。いくつかの実施形態では、5'末端にコンジュゲートを含むオリゴヌクレオチドは、3'末端にコンジュゲートを含むオリゴヌクレオチドよりも高い有効性を有する。いくつかの実施形態では、3'末端にコンジュゲートを含むオリゴヌクレオチドは、5'末端にコンジュゲートを含むオリゴヌクレオチドよりも高い有効性を有する。5'結合により、オリゴヌクレオチドの合成がより簡単になる。

30

【0242】

典型的には、オリゴヌクレオチドは、3'から5'方向に固体支持体上で合成される。3'コンジュゲートオリゴヌクレオチドを作製するために、典型的には、事前にコンジュゲートされた3'ヌクレオシドを固体支持体に結合させ、次いで、通常どおりオリゴヌクレオチドを構築する。しかしながら、そのコンジュゲートヌクレオシドを固体支持体に結合させることで、合成が複雑になる。更に、そのアプローチを使用して、コンジュゲートは、次いで、オリゴヌクレオチドの合成全体を通して存在し、その後のステップ中に分解され得るか、又は使用することができる反応及び試薬の種類が制限され得る。5'コンジュゲートオリゴヌクレオチドについて本明細書に記載される構造及び技術を使用して、標準的な自動化技術を使用してオリゴヌクレオチドを合成し、最後の（最も5'の）ヌクレオシドとともに又はオリゴヌクレオチドが固体支持体から切断された後に、コンジュゲートを導入することができる。

40

【0243】

当該技術分野及び本開示を考慮して、当業者は、本明細書のコンジュゲート及びコンジュゲートオリゴヌクレオチドのうちのいずれかを容易に作製することができる。更に、本明細書に開示される特定のそのようなコンジュゲート及びコンジュゲートオリゴヌクレオチドの合成は、より容易であり、かつ／又は必要なステップが少なく、したがって、以前に開示されているコンジュゲートの合成よりも安価であり、製造における利点を提供する

50

。例えば、特定のコンジュゲート基の合成は、前述のコンジュゲート基と比較して、より少ない合成ステップからなり、その結果、収率が増加する。

【0244】

コンジュゲートリンカー

いくつかの実施形態では、コンジュゲート基は、リンカーを含む。特定のかかる実施形態では、リンカーは、切断可能な部分に共有結合している。特定のかかる実施形態では、リンカーは、アンチセンスオリゴヌクレオチドに共有結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、細胞標的化部分に共有結合している。いくつかの実施形態では、リンカーは、固体支持体への共有結合を更に含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、タンパク質結合部分への共有結合を更に含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、固体支持体への共有結合を更に含む、タンパク質結合部分への共有結合を更に含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、連結されたリガンドの結合のための複数の位置を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、テザリガンドの結合のための複数の位置を含み、分岐基に結合されていない。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上の切断可能な結合を更に含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲート基は、リンカーを含まない。

10

【0245】

いくつかの実施形態では、リンカーは、少なくとも直鎖基を含み、アルキル、アミド、ジスルフィド、ポリエチレングリコール、エーテル、チオエーテル（-S-）、及びヒドロキシルアミノ（-O-N(H)-）基から選択される基を含む。いくつかの実施形態では、直鎖基は、アルキル、アミド、及びエーテル基から選択される基を含む。いくつかの実施形態では、直鎖基は、アルキル及びエーテル基から選択される基を含む。いくつかの実施形態では、直鎖基は、少なくとも1つのリン連結基を含む。いくつかの実施形態では、直鎖基は、少なくとも1つのホスホジエステル基を含む。いくつかの実施形態では、直鎖基は、少なくとも1つの中性連結基を含む。いくつかの実施形態では、直鎖基は、細胞標的化部分及び切断可能な部分に共有結合している。いくつかの実施形態では、直鎖基は、細胞標的化部分及びアンチセンスオリゴヌクレオチドに共有結合している。いくつかの実施形態では、直鎖基は、細胞標的化部分、切断可能な部分、及び固体支持体に共有結合している。いくつかの実施形態では、直鎖基は、細胞標的化部分、切断可能な部分、固体支持体、及びタンパク質結合部分に共有結合している。いくつかの実施形態では、直鎖基は、1つ以上の切断可能な結合を含む。

20

30

【0246】

いくつかの実施形態では、リンカーは、足場基に共有結合した直鎖基を含む。いくつかの実施形態では、足場は、分岐鎖脂肪族基を含み、アルキル、アミド、ジスルフィド、ポリエチレングリコール、エーテル、チオエーテル、及びヒドロキシルアミノ基から選択される基を含む。いくつかの実施形態では、足場は、分岐脂肪族基を含み、アルキル、アミド、及びエーテル基から選択される基を含む。いくつかの実施形態では、足場は、少なくとも1つの単環式又は多環式環系を含む。いくつかの実施形態では、足場は、少なくとも2つの単環式又は多環式環系を含む。いくつかの実施形態では、直鎖基は、足場基に共有結合し、足場基は、切断可能な部分及びリンカーに共有結合している。いくつかの実施形態では、直鎖基は、足場基に共有結合し、足場基は、切断可能な部分、リンカー、及び固体支持体に共有結合している。いくつかの実施形態では、直鎖基は、足場基に共有結合し、足場基は、切断可能な部分、リンカー、及びタンパク質結合部分に共有結合している。いくつかの実施形態では、直鎖基は、足場基に共有結合し、足場基は、切断可能な部分、リンカー、タンパク質結合部分、及び固体支持体に共有結合している。いくつかの実施形態では、足場基は、1つ以上の切断可能な結合を含む。

40

【0247】

いくつかの実施形態では、リンカーは、タンパク質結合部分を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質結合部分は、脂質であり、例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-0（ヘキサデ

50

シル)グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、03-(オレオイル)リトコール酸、03-(オレオイル)コレン酸、ジメトキシトリチル、又はフェノキサジン)、ビタミン(例えば、葉酸塩、ビタミンA、ビタミンE、ビオチン、ピリドキサル)、ペプチド、炭水化物(例えば、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、多糖)、エンドソーム分解成分、ステロイド(例えば、ウバオール、ヘシゲニン、ジオスゲニン)、テルペン(例えば、トリテルペン、例えば、サルササポゲニン、フリーデリン、エピフリーデラノール誘導体化リトコール酸)、又はカチオン性脂質が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、タンパク質結合部分は、C₁₆~C₂₂長鎖飽和又は不飽和脂肪酸、コレステロール、コール酸、ビタミンE、アダマンタン、又は1-ペンタフルオロプロピルである。

10

【0248】

併用療法

いくつかの実施形態では、本発明は、二本鎖リボ核酸分子又は二本鎖リボ核酸分子を含む化合物若しくは組成物と、本発明によるコンジュゲートと、第2の治療薬と、を含む、組成物(例えば、1つ以上の組成物、製剤、又は投薬製剤)又は薬学的組み合わせを特徴とする。いくつかの実施形態では、本発明は、本発明による治療剤と、第2の治療剤と、を含む、組成物(例えば、1つ以上の組成物、製剤、又は投薬製剤)又は薬学的組み合わせを特徴とする。

【0249】

いくつかの実施形態では、組成物は、薬学的に許容される担体又は希釈剤を含む。いくつかの実施形態では、二本鎖リボ核酸分子又は二本鎖リボ核酸分子を含む化合物、及びコンジュゲート、及び第2の薬剤は、単一の組成物中に、又は2つ以上の異なる組成物として存在し得る。二本鎖リボ核酸分子又は二本鎖リボ核酸分子を含む化合物、及びコンジュゲート、及び第2の薬剤は、同じ投与経路又は異なる投与経路を介して投与することができる。二本鎖リボ核酸分子又は二本鎖リボ核酸分子を含む化合物、及びコンジュゲート、及び第2の薬剤は、同時に又は連続して投与することができる。いくつかの実施形態では、薬学的組み合わせは、二本鎖リボ核酸分子又は二本鎖リボ核酸分子を含む化合物、及びコンジュゲート、及び第2の薬剤を、別々に又は一緒に含む。

20

【0250】

投与経路

薬剤又は薬学的組成物は、経口、非経口、舌下、皮内、経皮、直腸、経粘膜、局所、吸入を介して、頬側投与を介して、胸膜内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻腔内、髄腔内、及び／若しくは関節内、又はこれらの組み合わせを含む、異なる経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、薬剤又は薬学的組成物は、経口投与される。いくつかの実施形態では、薬剤又は薬学的組成物は、静脈内投与される。いくつかの実施形態では、薬剤又は薬学的組成物は、マイクロニードル注射を介して投与される。いくつかの実施形態では、薬剤又は薬学的組成物は、真皮にマイクロニードル注射を介して投与される。いくつかの実施形態では、薬剤又は薬学的組成物は、脂質ナノ粒子中に製剤化され、マイクロニードル注射を介して投与され得る。

30

40

【0251】

本発明は、以下の実施例において更に例解される。これらの実施例は、本発明の実施形態を示すが、例解としてのみ提供されることを理解されたい。上記の考察及びこれらの実施例から、当業者は、本発明の本質的な特徴を確認することができ、その趣旨及び範囲から逸脱することなく、様々な用途及び条件に適応するために本発明の様々な変更及び修正を行うことができる。よって、本明細書に示され、記載されるものに加えて、本発明の様々な修正が、前述の記載から当業者に明らかとなるであろう。そのような修正はまた、添付の特許請求の範囲の範囲内に収まることが意図される。

【実施例】

【0252】

50

材料及び方法

患者コホート

SWS又はPPVの臨床診断を有する36人の患者は、両親又は保護者による書面によるインフォームドコンセントを得て、地域の研究倫理委員会の承認の下、単一の施設から前向きに募集された。皮膚、神経、及び眼の症状の臨床的及び放射線学的表現型決定、並びに血液及び尿におけるカルシウム代謝プロファイル解析を行った。

【0253】

記録された皮膚の特徴は、毛細血管奇形（貧血性母斑の有無にかかわらずポートワイン母斑）、皮膚黒色症、並びに血管病変及び／又は色素病変による顔領域の関与の有無であった。毛細血管奇形で覆われた身体の割合は、Lund-Browderチャートを使用して推定した。他の記録された特徴は、頭囲、他の身体領域の過成長又は劣成長、骨格及び内分泌学的異常、血圧、神経学的及び眼科学的表現型であった。グラジエントエコーイメージング（すなわち、T2*、磁化率強調イメージング又は（前者が利用できなかった場合）拡散強調シーケンスのb0マップ）を含む、全ての脳コンピュータ断層撮影（CT、n=6）及び磁気共鳴イメージング（MRI、n=32）研究のレトロスペクティブレビューは、1人の放射線科医によって行われた。

10

【0254】

測定した血液指標は、イオン化カルシウム、総カルシウム、リン酸塩、マグネシウム、副甲状腺ホルモン（PTH）、活性ビタミンD、並びに尿素及び電解質であった。測定した尿指数は、カルシウム：クレアチニン比であった。

20

【0255】

4mmの皮膚パンチ生検による罹患組織の遺伝子型決定が、コホート全体に提供された。DNAを皮膚全体から標準的な方法で抽出し、Illumina技術を使用して、GNAQ及びGNA11の全てのコード配列について、平均深度1500×の標的化パネル配列決定を行った。遺伝子型検査は、15人の患者によって受け入れられ、以前のコホートの論文を代表するものであった[4、6、7]（n=8 GNAQ、n=5 GNA11、n=2 WT）。

【0256】

統計分析

二項ロジスティック回帰分析を行い、SPSS v. 26を使用して、多重検定のために調整されたp値有意性を使用して、血清低カルシウム血症と、変数の年齢、性別、頭蓋内石灰化、及び罹患した皮膚領域との間の関連性を確認した。平均間の差は、等分散を仮定して、対応のないt検定又は対応のあるt検定によって分析した。時間信号強度曲線は、二元配置分散分析（ANOVA）によって比較した。

30

【0257】

細胞株

hTERT不死化微小血管内皮細胞（TIME-ATCC CRL-4025TM、「TIME」細胞）及びそれらのトランスジェニック誘導体を、EGMTM-2 Bullet Kit（Lonza CC-3162）及び3%ウシ胎児血清（Gibco）を補充したEBMTM-2内皮細胞増殖基本培地2（Lonza CC-3156）中で維持した。

40

【0258】

TIME細胞をレンチウイルスベクターで形質導入して、GNAQ WT、GNAQ p. (R183Q)、GNA11 WT、GNA11 p. (R183C) cDNAのHAタグ付き形態の安定した発現を誘導し（図4）、本発明者らは、サンガー配列決定によってゲノムDNAにおける変異の存在を確認した（図4B）。形質導入システムは、WT又はHAタグ付き形質導入遺伝子のバリエーション形態を同様のレベルで発現し、両方のGNAQトランスジェニックモデルにおけるGNAQコードタンパク質Gαqの総発現は、親TIME細胞で観察された内因性発現に近かった（図4C）。

【0259】

50

HEK DKO $G\alpha q/11$; CasR; NFAT-Luc細胞は、以下のように誘導された：HEK DKO $G\alpha q/11$ [36] は、機能的なGNAQ及びGNA11遺伝子を欠いており、NFAT-ルシフェラーゼカルシウムレポーターを安定的に組み込み、カルシウム感受受容体 (CasR) を過剰発現するように操作された。CasRは、細胞外リガンドとしてカルシウムを感知し、 $G\alpha q$ 及び $G\alpha 11$ を介して下流にシグナル伝達し、細胞内カルシウム経路を活性化する。HEK DKO $G\alpha q/11$; CasR; NFAT-Lucを、10%ウシ胎児血清 (Gibco)、400 $\mu g/mL$ の Geneticin (商標) (Thermo Fisher)、及び100 $\mu g/mL$ のハイグロマイシン (Thermo Fisher) を含むDMEM-Glutamax (商標) 培地 (Thermo Fisher) で維持した。

10

【0260】

プラスミド及び試薬

GNAQ WT、GNAQ c. 548G>A, p. (R183Q)、GNA11 WT、及びGNA11 c. 547C>T, p. (R183C) cDNAを合成し、pCDNA3.1+N-HAプラスミドにクローニングし、それらのN末端でHAタグ (Genscript) とインフレームで融合した。ルシフェラーゼORFを、SalI及びXbaIを組み合わせた制限消化によって、pLenti PGK V5-LUC Puro (Addgene 21471) から切り出し、HAタグ付きGNAQ/11 cDNAを増幅し、オンラインプライマーデザインツール及び製造業者の説明書に従って、In-Fusion HDクローニングキット (Takara Bioカタログ638947) を使用して、消化したpLentiベクターにクローニングした。以下の抗体を使用した：Cell Signaling Technologyの抗ホスホERK T202/Y204抗体 (カタログ9101、1:1000) 及び抗ERK抗体 (カタログ9107、1:1000)；Invitrogenからの抗ピンクリン抗体 (カタログMA5-11690、1:3000)、BioLegendからの抗HA抗体 (クローン16B12、カタログ901501、1:2000)、及びSanta Cruz Biotechnologyからの抗 $G\alpha q$ 抗体 (カタログsc-136181、1:200)。CM4620は、MedChemExpress (カタログHY-101942) から入手した。

20

【0261】

レンチウイルス粒子の産生及び形質導入

レンチウイルス粒子を、0.93 μg のpCMV-VSVG、2.79 μg のデルター8.2 (Addgene)、及び3.72 μg のpLenti GNAQWT、GNAQR183Q、GNA11WT、又はGNA11R183C混合物 (Lipofectamine (商標)、Invitrogen) を用いて、10 cmの組織培養皿でHEK293T細胞をトランスフェクトすることによって産生した。トランスフェクションの48時間後、上清中のウイルス粒子を回収し、-80℃で保管した。TIME細胞を、8 $\mu g/mL$ のポリブレンの存在下、6ウェル組織培養皿で、GNAQWT、GNAQR183Q、GNA11WT、又はGNA11R183Cレンチウイルス粒子で形質導入し、次いで、4 $\mu g/mL$ のピューロマイシンを使用して選択した。

30

【0262】

IP1アッセイ

細胞内カルシウムシグナルの主要な媒介因子であるイノシトール三リン酸の下流代謝産物であるイノシトールリン酸 (IP1) の細胞内濃度を、製造業者の説明書に従って、HTRF-IP-Oneキット (Cisbio Bioassays) を使用して、TIMEトランスジェニック細胞で定量した。GNAQ又はGNA11バリエーションサイレンシング後のIP-One実験では、TIME細胞を、抗生物質不含完全培地中、siRNAでトランスフェクトし、トランスフェクションの18時間後、培地を交換し、トランスフェクションの48時間後、IP-Oneアッセイを行った。手短に言えば、TIME細胞を、トリプシン処理し、細胞ペレットを完全培地に再懸濁し、各ウェルに50,000細胞/7 μl の密度で384ウェルマイクロタイタープレートに移し、各実験条件について

40

50

、合計5～6ウェルを技術的反復として使用した。次いで、7 μ lの刺激緩衝液を、各ウェルに添加した。37℃で90分間のインキュベーション後、細胞に、3 μ lのIP1-d2コンジュゲート及び3 μ lの溶解緩衝液中に溶解したユーロピウムクリプテート標識抗IP1抗体を添加した。室温で1時間暗所でインキュベートした後、Tecan Spark（登録商標）プレートリーダーによって、620 nm及び665 nmで、各ウェルにおける蛍光を順次測定した。

【0263】

ルシフェラーゼアッセイ

HEK DKO G α q/11; CaSR; NFAT-Luc細胞を、96ウェルプレートに10,000細胞/ウェルの密度で播種し、pcDNA3.1 GNAQ^{WT}、GNAQ^{R183Q}、GNA11^{WT}、又はGNA11^{R183C}プラスミド（それぞれ、40 ng、5 ng、5 ng、及び4 ngの構築物を使用）でトランスフェクトして（Lipofectamine（商標）2000）、同様の発現レベルのcDNAを得た。トランスフェクションの翌日、細胞を、25 mMのHEPES、0.45 mMのCaCl₂、及び0.01%のFBSを含有するDMEMで16時間飢餓させた。飢餓後、細胞を、カルシウム不含DMEM-25 mM HEPES中の異なる濃度の塩化カルシウムで4時間処理し、次いで、溶解物をパッシブ溶解緩衝液（Promega）中に回収した。溶解物を、96ウェルアッセイプレートに移し、自動インジェクター（PHERAstar（登録商標））を備えたプレートリーダーを使用して、製造業者の説明書に従って、ルシフェラーゼアッセイ試薬（PromegaカタログE1501）を添加することによって、個々のウェルからのホタルルシフェラーゼ活性を測定した。

【0264】

Fluo-8 AMアッセイ

細胞を、96ウェルプレートに8000細胞/ウェルの密度で播種し、翌日、2 μ MのFluo-8 AM-HBSS中、37℃で60分間インキュベートした後、色素含有溶液をHBSSに交換し、室温で更に30分間インキュベートした。細胞を、HBSS中のトロンビン10倍溶液（最終濃度1 U/ml）で刺激し、自動インジェクター（PHERAstar（登録商標））を備えたプレートリーダーを使用して、蛍光（励起490 nm/発光525 nm）を毎秒記録した。

【0265】

HBSS不含緩衝液中の実験では、細胞を、カルシウム不含HBSS中で100秒間インキュベートした後、トロンビンによって刺激した。

【0266】

siRNAで処理した細胞の分析のために、細胞を、Fluo-8 AM負荷の48時間前にトランスフェクトした。

【0267】

細胞質カルシウム濃度は、以下を使用して計算した： $[Ca^{2+}]_c = KD (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ （式中、KDは、Ca²⁺（389 nM）に対するFluo-8の解離定数であり、F_{max}及びF_{min}は、それぞれ、HBSS中のCaCl₂（10 mM）及びTriton（0.1%）、又はCa²⁺不含HBSS中のBAPTA（10 mM）及びTriton（0.1%）の添加後に決定される最大及び最小の蛍光値である）。

【0268】

変異特異的siRNAの設計及び試験

バリエーションGNAQ c. 548 G>A, p. (R183Q)に特異的にアニーリングする6つのsiRNAを、以下のセンス鎖配列を用いて合成した：

siGNAQmut #1: UGCUUAGAGUUCAAGUCCC [dT] [dT] ;

siGNAQmut #2: GCUUAGAGUUCAAGUCCC [dT] [dT] ;

10

20

30

40

50

s i G N A Q m u t # 3 : C U U A G A G U U C A A G U C C C C A [d T] [d T] ;
s i G N A Q m u t # 4 : U U A G A G U U C A A G U C C C C A C [d T] [d T] ;
s i G N A Q m u t # 5 : U A G A G U U C A A G U C C C C A C C [d T] [d T] ;
s i G N A Q m u t # 6 : A G A G U U C A A G U C C C C A C C A [d T] [d T] 。

【 0 2 6 9 】

バリエーション G N A 1 1 c . 5 4 7 C > T , p . (R 1 8 3 C) に特異的にアニーリングする6つの s i R N A を、以下のセンス鎖配列を用いて合成した： 10

s i G N A 1 1 m u t # 1 : G U G C U G C G G G U C U G C G U G C [d T] [d T] ;
s i G N A 1 1 m u t # 2 : U G C U G C G G G U C U G C G U G C C [d T] [d T] ;
s i G N A 1 1 m u t # 3 : G C U G C G G G U C U G C G U G C C C [d T] [d T] ;
s i G N A 1 1 m u t # 4 : C U G C G G G U C U G C G U G C C C A [d T] [d T] ;
s i G N A 1 1 m u t # 5 : U G C G G G U C U G C G U G C C C A C [d T] [d T] ;
s i G N A 1 1 m u t # 6 : C G G G U C U G C G U G C C C A C C A [d T] [d T] 。

【 0 2 7 0 】

T I M E トラנסジェニック細胞を、製造業者の説明書に従って、L i p o f e c t a m i n e R N A i M A X (商 標) (I n v i t r o g e n) を使用して、s i R N A でトランスフェクトした。

【 0 2 7 1 】

バリエーション G N A Q 転写産物に特異的にアニーリングするように設計された6つの s i R N A のうちの2つは、W T G N A Q 導入遺伝子の産生を残しながら、バリエーション G α q の特異的なノックダウンを示した (図 5 A ~ B) 。バリエーション G N A 1 1 転写産物を標的化する6つの s i R N A のうちの1つについて、同じ特異性が観察された (図 5 A ~ B) 。 30

【 0 2 7 2 】

実施例 1 - S W S 及び P P V 患者では、全身カルシウム恒常性が破壊されている

36 人の患者が募集され、18 人が女性であり、29 人が S W S 患者及び7 人が P P V 患者であった。平均年齢及び中央値年齢は、それぞれ、8 . 3 歳及び9 . 4 歳であった (範囲 0 . 7 ~ 1 6 . 0) 。表現型及び血液指標データを、図 6 及び図 7 に要約する。

【 0 2 7 3 】

ベースラインでの患者の 6 4 % (2 3 / 3 6) が、カルシウム代謝の少なくとも1つの異常な測定値を有した (p H 補正イオン化カルシウム、アルブミン補正総カルシウム、P T H、リン酸塩、マグネシウム、活性ビタミン D、及び尿中カルシウム：クレアチニン比として定義される) 。最も一般的な所見は、4 3 % (1 3 / 3 0) で見られた低い血清イオン化カルシウムであった。2 番目に一般的な所見は、高い (n = 1) 、正常な (n = 2) 、及び低い (n = 2) イオン化カルシウムを伴う、1 5 % (5 / 3 4) で見られた高い P T H であった。尿中カルシウム排泄は、1 8 % (5 / 2 8) で異常であり、3 人で高く、2 人で低かった。2 人の患者のみが、異常なリン酸塩を有し、1 人が高く、1 人が低かった。マグネシウムレベルは全体的に正常であり、尿素及び電解質に異常な問題はなかった。本発明者らは、当初、抗癲癇薬によるビタミン D レベルへの干渉の可能性を検討したが、ビタミン D が低かった患者は 2 人だけであり、全ての分析で補充後の測定値を使用した。総血清補正カルシウムの線形回帰モデリングでは、年齢の増加との著しい負の関連性 40 50

($p < 0.001$)、性別との無関連性、及び罹患した皮膚表面積との無関連性を示した。これは、小児期の年齢の増加に伴うカルシウムのベースライン基準範囲の増加が既知であるにもかかわらずであった。年齢単独での尿中カルシウム：クレアチニン比の線形回帰は、年齢の増加と同じ著しい負の関連性を示した ($P = 0.019$)。

【0274】

毛細血管奇形の影響を受ける推定体表面積の平均値及び中央値は、11% (範囲：0.0～43.0) 及び7%であったが、ただし、体表面積の推定値は不正確であることが知られている。高血圧又は大頭症の患者はいなかったが、1人が小頭症であった。33%が非対称な成長を有した (10/33が過成長、1/33が劣成長)。頭蓋内石灰化は、患者の50%で検出可能であり (図1D～E)、一部の患者では、経時的にこれらの病変の新たな出現の明確な証拠があった。

10

【0275】

実施例2—GNAQ/GNA11バリエントは、内皮細胞における細胞内カルシウムシグナル伝達の構成的活性化を引き起こす

完全培地及び栄養欠乏培地の両方におけるIP-Oneの蓄積の急激な増加によって示されるように、基底カルシウムシグナル伝達は、野生型(WT)対照と比較して、GNAQR183Q及びGNA11R183Cバリエントの両方のTIME細胞において著しく増加した (図2A)。他方、基礎的なMAPK経路の活性化は、完全培地及び飢餓培地の両方でのERKリン酸化のウエスタンブロット分析によって示されるように、GNAQバリエント及びWT TIME細胞間、又はGNA11バリエント及びWT TIME細胞間で著しく差はなかった (図2B)。

20

【0276】

内因性Gαq及びGα11からの干渉なしに細胞システムで本発明者らの所見を検証するために、本発明者らは、HEK DKO Gαq/11; CaSR; NFAT-Luc細胞 (内因性GNAQ及びGNA11遺伝子がノックアウトされ、カルシウム感知受容体(CaSR)が過剰発現されるモデル) を用いた。次いで、上記のGNAQR183Q、GNAQWT、GNA11R183C、又はGNA11WT cDNA構築物を、それらのそれぞれの発現ベクターを用いて、この第2のモデルシステムにトランスフェクトした (図4D)。したがって、このモデルは、細胞内カルシウムシグナル伝達をもたらす細胞外GPCRリガンドとしてカルシウムを使用する。

30

【0277】

内因性GNAQ/GNA11の不在下で予想されるように、トランスフェクトされていない細胞は、細胞外カルシウム刺激に応答しなかったが、トランスフェクトされた細胞は、このリガンドによる処理後にルシフェラーゼシグナルの増加を示し、このモデルが検証された (図2C)。細胞外カルシウム刺激の不在下 (図2Cにおける「ビヒクル」条件)、バリエントGNAQ又はGNA11でトランスフェクトされた細胞では、それらのWT対応物と比較して、NFAT駆動ルシフェラーゼシグナルの統計的に著しい増加が認められ、これらの変異がカルシウムシグナル伝達の基底構成的活性化を誘導することが確認された。

40

【0278】

実施例3—バリエントGNAQは、細胞外カルシウムの存在下でのみ、内皮細胞におけるトロンビン誘導性の細胞内カルシウムシグナル伝達を増幅する

患者で特定された最も一般的な変異として、GPCRリガンド刺激時のTIME細胞におけるカルシウムシグナル伝達の活性化の動態を、GNAQR183Qモデルを使用して研究した。トロンピンは、内皮細胞におけるGαqシグナル伝達を活性化するための典型的なGPCR刺激剤として用いられた [37]。変異細胞は、トロンピン刺激後のWT細胞と比較して、細胞内カルシウムのレベルの著しい増加及びの長期化を示した。驚くべきことに、この差は、細胞外緩衝液からカルシウムを除去することによって完全に消失し (図2D)、細胞外カルシウムの流入が異常なシグナルの発生源であることが特定された。

50

【0279】

実施例 4 - C R A C チャネル阻害及びバリエント特異的 s i R N A は、バリエント細胞における異常なカルシウムシグナル伝達を救済する。

【0280】

本発明者らは、バリエント G α q の下流のカルシウムシグナル伝達の活性化の増加が、原形質膜の C R A C チャネルを介して細胞外カルシウムの流入を駆動していると仮定した。これを裏付けるように、C R A C チャネルの特異的阻害剤である C M 4 6 2 0 による細胞の処理は、G N A Q バリエント細胞における長時間のカルシウム細胞内ピークを顕著に救済する（図 3 B ~ C）一方、T I M E G N A Q W T におけるトロニン誘導性カルシウムシグナル伝達に対する効果は限定的であった（図 3 A）。

【0281】

これらの変異の生物学的効果を研究するための更なる分子ツールとして、W T アレルを残しながら、G N A Q c . 5 4 8 G > A , p . (R 1 8 3 Q) 又は G N A 1 1 c . 5 4 7 C > T , p . (R 1 8 3 C) の転写産物を特異的にノックダウンするための s i R N A を設計した（図 5 A ~ D）。

【0282】

全てのバリエント特異的 s i R N A は、I P - O n e アッセイによって測定されるように（図 3 D）、T I M E G N A Q R 1 8 3 Q 又は T I M E G N A 1 1 R 1 8 3 C 細胞、及び U P M M - 1 と呼ばれる G N A Q p . (R 1 8 3 Q) バリエントブドウ膜黒色腫細胞株において、構成的基底カルシウムシグナル伝達活性化を救済した（図 3 G）。この重要な結果を検証するために、第 2 のアッセイを使用して、T I M E G N A Q R 1 8 3 Q 細胞を操作して、N F A T - ルシフェラーゼカルシウムシグナル伝達レポーターを安定的に組み込んだ（図 3 E）。バリエント特異的 s i R N A による処理は、基底カルシウムシグナル伝達を再び正常化した。

【0283】

G P C R リガンドに対する応答の修飾における G N A Q 変異の役割を確認するために、T I M E G N A Q R 1 8 3 Q を、バリエント特異的オリゴでトランスフェクトし、トロニン刺激後の細胞内カルシウムの蓄積を測定した。構成的シグナル伝達に関して、T I M E G N A Q バリエント細胞のトロニンに対する異常に長期化した応答は、バリエント転写産物のサイレンシングによって救済され（図 3 F）、この変異をシグナル伝達異常のあらゆる側面と強く結びつけた。

【0284】

実施例 5 - インビトロ血管新生は、変異体 G N A Q によって破壊され、C R A C チャネルの阻害によって救済される

T I M E 内皮細胞モデルを使用して、標準的なインビトロ血管新生アッセイを使用して、血管新生を評価した [38]。G N A Q R 1 8 3 Q 細胞は、基底膜マトリックスにおける細管形成が著しく損なわれており（図 8 A ~ B）、この変異を血管奇形の病因に結びつけた。更に、トロニンの G P C R 活性化は、G N A Q W T よりも G N A Q R 1 8 3 Q において血管新生を破壊した（図 8 C）。C R A C チャネル阻害剤 C M 4 6 2 0 による処理は、特に G N A Q R 1 8 3 Q で細管形成を改善したが、G N A Q W T では改善せず（図 8 D）、これは、異常なカルシウムシグナル伝達が G N A Q 変異によって誘導され、血管奇形の原因であることを強く示唆している。

【0285】

実施例 6 - 血清イオン化カルシウムは、発作、癲癇重積、及び抗癲癇薬と著しく逆相関する。

総血清補正カルシウムの線形回帰モデリングは、年齢の増加と著しい負の関連性を示し（ $p = 0.001$ ）（図 1 F）、罹患した皮膚表面積との関連性はなかった。年齢単独での尿中カルシウム：クレアチニン比の線形回帰は、血清マグネシウム及びリン酸塩と同様に、年齢の増加と同じ著しい負の関連性を示した（ $p = 0.001$ ）（両方とも $p < 0.001$ ）。本発明者らは、次いで、最も一般的な有害事象である患者の発作を、最も一般的な血清異常であるイオン化カルシウムを使用してモデル化した。これは、血清 p H 補正

10

20

30

40

50

イオン化カルシウムレベルと発作（図 9 F）及び癲癇重積（図 9 G）（ $p = 0.017$ ）の存在との間の著しい逆相関（ $p = 0.013$ ）を示した。イオン化カルシウムとレベチラセタム（ $p = 0.02$ ）とオクスカルバゼピン（ $p = 0.003$ ）の使用との間にも著しい関連性が見られたが、他の抗癲癇薬との関連性は見られなかった。このコホートでは、予防的アスピリンの使用と発作の発生との間に関連性は見られなかった。主要な異常カルシウム代謝のパラメータについては、男女間で著しい差は見られなかった。コホートサイズを考慮して、異なる診断用標識及び遺伝子型の統計的寄与はモデル化されなかったが、将来的には興味深い可能性がある。

【0286】

実施例 7 - SWS / P P V 患者では、血清イオン化カルシウムのレベルは変動しているが、25-ヒドロキシビタミン D のレベルは正常である。

3 人の患者は、最初の測定時に 25-ヒドロキシビタミン D が低く、コホートの結果が分析される前に、経口補充が与えられ、再サンプリングされた。その補正されたバックグラウンドに基づいて、最初のサンプリング時の患者の 74%（31 / 42）が、pH 補正イオン化カルシウム、アルブミン補正総カルシウム、副甲状腺ホルモン（PTH）、リン酸塩、マグネシウム、25-ヒドロキシビタミン D、アルカリホスファターゼ（ALP）、及び尿中カルシウム：クレアチニン比として本明細書で定義される、カルシウム代謝の少なくとも 1 つの異常な測定値を有した。最も一般的な所見は、41%（15 / 37）で中程度に低い血清イオン化カルシウム、17%（7 / 42）で高い PTH、及び 17%（5 / 30）で異常な血清レベルに対して適切に調整された尿中カルシウム排泄であった。本発明者らは、26 人及び 10 人の患者で繰り返しサンプリングを行った（それぞれ、2 回及び 3 回のサンプリング時点）（図 7）。これは、患者内で異常な測定値のレベルが変動していることを示したが、各時点でのコホートにおける異常な結果の全体的な割合は同様であった（それぞれ、2 回及び 3 回のサンプリング時点で 69% 及び 80%）。これを反映して、パラメータ間の予想される相互関係（例えば、血清カルシウム及び PTH の逆のレベル）は、特定の時点で個体内で常に保持されていたわけではないが、コホートの測定値を全体として考慮すると、それらは通常の方法で明らかに関連していた（図 11 A）。

【0287】

これらのプロファイルを更に解明するために、本発明者らは、再試験に同意し、適切な試料を得ることができた患者において、インタクト及び C 末端線維芽細胞増殖因子 23（iFGF23 及び cFGF23）並びに 1, 25-ジヒドロキシビタミン D を測定した（図 7）。cFGF23 は、9 / 20 で高く（平均 105.9 RU / mL、範囲 23 ~ 355）、17 / 18 で正常な iFGF23、正常な 1, 25-ジヒドロキシビタミン D、及びリン酸塩濃度であった。注目すべきことに、cFGF23 及び iFGF23 レベルは、異なる生理学的パラメータと反対の相関を示し、iFGF23 のみが、1, 25-ジヒドロキシビタミン D と統計的に著しい負の相関を示した（図 11）。1, 25-ジヒドロキシビタミン D は、7 / 20 で低く（平均 129.6 pmol / L、範囲 53 ~ 218）、全てについて正常な 25-ヒドロキシビタミン D レベルであった。

【0288】

実施例 8 - SWS / P P V 患者は、甲状腺、腎臓、及び骨格系のカルシウム代謝機能に大きい異常はない

患者間及び患者内測定値におけるモザイク変動のため、主要なカルシウム代謝パラメータ間の関連性をコホートレベルでモデル化した。PTH は、血清 Ca と予想される逆相関を示し（図 12 A）、尿中 Ca / Cr 比は、血清 Ca の増加に伴って適切に増加し（図 12 B）、iFGF23 及び 1, 25-ジヒドロキシビタミン D は、予想される逆相関を示した（図 12 C）が、1, 25-ジヒドロキシビタミン D と PTH との間に相関は観察されなかった（図 12 D）。PTH と 1, 25-ジヒドロキシビタミン D との間の関係のこの欠如は、iFGF23 がこれらの患者における 1, 25-ジヒドロキシビタミン D の生理学的調節因子であり得ることを示している。推定糸球体濾過量（eGFR）の測定値

は、全体を通して正常であり（図 7）、血圧の測定値（利用可能な場合）（ $n = 39$ ）も同様であった。低カルシウム血症を有する 11 人の患者では、全身 DEXA スキャンは正常であり、1 人の頭部を除いた場合、境界線が異常であった（Z スコア = -1.9）。

【0289】

均等物及び範囲

当業者は、本発明が、本明細書に含まれる特定の実施形態の実施例又は他の説明によってではなく、添付の特許請求の範囲によって定義されることを理解するであろう。

【0290】

「a」、「an」、及び「the」という単数形は、文脈で別様に明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。

【0291】

別途上で定義されていない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様又は同等の任意の方法及び材料も、本発明の実施又は試験で使用するすることができる。一般に、本明細書に記載される細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、遺伝学、並びにタンパク質及び核酸化学に関連して使用される命名法、及びそれらの技術は、当該技術分野で周知であり、一般に使用されているもの、又は製造業者の仕様によるものである。

【0292】

本明細書で言及された全ての刊行物、特許、及び特許出願は、あたかも各個々の刊行物、特許、又は特許出願が参照により本明細書に援用されることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度まで、参照によりそれらの全体が本明細書に援用される。加えて、本出願における任意の参考文献の引用又は識別は、そのような参考文献が本発明の先行技術として利用可能であることを認めるものと解釈されるべきではない。セクションの見出しが使用されている限りにおいて、それらは必ずしも限定的であると解釈されるべきではない。

【0293】

10

20

30

40

50

【表 1】

配列

配列の説明	配列 番号	DNA /RNA	センス (S)/ アンチセ ンス(AS)	配列
GNAQ_c.548G>A RNA 1	1	RNA	S	UGCUUAGAGUUCAAGUCCC (DNA スクレオチドでは TGCTTAGAGTTCAAGTCCC)
GNAQ_c.548G>A RNA 2	2	RNA	S	GCUUAGAGUUCAAGUCCCC (DNA スクレオチドでは GCTTAGAGTTCAAGTCCCC)
GNAQ_c.548G>A RNA 3	3	RNA	S	CUUAGAGUUCAAGUCCCCA (DNA スクレオチドでは CTTAGAGTTCAAGTCCCCA)
GNAQ_c.548G>A RNA 4	4	RNA	S	UUAGAGUUCAAGUCCCCAC (DNA スクレオチドでは TTAGAGTTCAAGTCCCCAC)
GNAQ_c.548G>A RNA 5	5	RNA	S	UAGAGUUCAAGUCCCCACC (DNA スクレオチドでは TAGAGTTCAAGTCCCCACC)
GNAQ_c.548G>A RNA 6	6	RNA	S	AGAGUUCAAGUCCCCACCA (DNA スクレオチドでは AGAGTTCAAGTCCCCACCA)
GNA11_c.547C>T RNA 1	7	RNA	S	GUGCUGCGGGUCUGCGUGC (DNA スクレオチドでは GTGCTGCGGGTCTGCGTGC)
GNA11_c.547C>T RNA 2	8	RNA	S	UGCUGCGGGUCUGCGUGCC (DNA スクレオチドでは TGCTGCGGGTCTGCGTGCC)
GNA11_c.547C>T RNA 3	9	RNA	S	GCUGCGGGUCUGCGUGCCC (DNA スクレオチドでは GCTGCGGGTCTGCGTGCCC)
GNA11_c.547C>T RNA 4	10	RNA	S	CUGCGGGUCUGCGUGCCCA (DNA スクレオチドでは CTGCGGGTCTGCGTGCCCA)
GNA11_c.547C>T RNA 5	11	RNA	S	UGC GGGUCUGCGUGCCCAC (DNA スクレオチドでは TGCGGGTCTGCGTGCCCAC)
GNA11_c.547C>T RNA 6	12	RNA	S	CGGGUCUGCGUGCCCACCA (DNA スクレオチドでは CGGGTCTGCGTGCCCACCA)
GNAQ_c.548G>A RNA 1	13	RNA	AS	GGGACUUGAACUCUAAGCA (DNA スクレオチドでは GGGACTTGAAGTCTAAGCA)
GNAQ_c.548G>A RNA 2	14	RNA	AS	GGGGACUUGAACUCUAAGC

10

20

30

40

50

				(DNAヌクレオチドでは GGGGACTTGAACTCTAAGC)
GNAQ_c.548G>A RNA 3	15	RNA	AS	GGGGACUUGAACUCUAAGC (DNAヌクレオチドでは GGGGACTTGAACTCTAAGC)
GNAQ_c.548G>A RNA 4	16	RNA	AS	GGGGACUUGAACUCUAAGC (DNAヌクレオチドでは GGGGACTTGAACTCTAAGC)
GNAQ_c.548G>A RNA 5	17	RNA	AS	GGUGGGGACUUGAACUCUA (DNAヌクレオチドでは GGTGGGGACTTGAACTCTA)
GNAQ_c.548G>A RNA 6	18	RNA	AS	UGGUGGGGACUUGAACUCU (DNAヌクレオチドでは TGGTGGGGACTTGAACTCT)
GNA11_c.547C>T RNA 1	19	RNA	AS	GCACGCAGACCCGCAGCAC
GNA11_c.547C>T RNA 2	20	RNA	AS	GGCACGCAGACCCGCAGCA
GNA11_c.547C>T RNA 3	21	RNA	AS	GGGCACGCAGACCCGCAGC
GNA11_c.547C>T RNA 4	22	RNA	AS	UGGGCACGCAGACCCGCAG (DNAヌクレオチドでは TGGGCACGCAGACCCGCAG)
GNA11_c.547C>T RNA 5	23	RNA	AS	GUGGGCACGCAGACCCGCA (DNAヌクレオチドでは GTGGGCACGCAGACCCGCA)
GNA11_c.547C>T RNA 6	24	RNA	AS	UGGUGGGCACGCAGACCCG (DNAヌクレオチドでは TGGTGGGCACGCAGACCCG)
GNAQ R183Q バ リアントフォワード プライマー	25	DNA	-	CAACAAGATGTGCTTAGAGTTCA
GNAQ R183Q バ リアントリバー プライマー	26	DNA	-	CCCTACATCGACCATTCTGAAA
GNAQ_c.547C>G RNA 1	27	RNA	S	GUGCUUAGAGUUGGAGUCC(DNAヌクレ オチドでは GTGCTTAGAGTTGGAGTCC)
GNAQ_c.547C>G RNA 2	28	RNA	S	UGCUUAGAGUUGGAGUCCC(DNAヌクレ オチドでは TGCTTAGAGTTGGAGTCCC)
GNAQ_c.547C>G RNA 3	29	RNA	S	GCUUAGAGUUGGAGUCCCC(DNAヌクレ オチドでは GCTTAGAGTTGGAGTCCCC)
GNAQ_c.547C>G RNA 4	30	RNA	S	CUUAGAGUUGGAGUCCCCA(DNAヌクレ オチドでは CTTAGAGTTGGAGTCCCCA)
GNAQ_c.547C>G RNA 5	31	RNA	S	UUAGAGUUGGAGUCCCCAC(DNAヌクレ オチドでは TTAGAGTTGGAGTCCCCAC)

10

20

30

40

50

GNAQ_c.547C>G RNA 6	32	RNA	S	UAGAGUUGGAGUCCCCACC(DNA ヌクレ オチドでは TAGAGTTGGAGTCCCCACC)
GNAQ_c.547C>G RNA 1	33	RNA	AS	GGACUCCAACUCUAAGCAC(DNA ヌクレ オチドでは GGACTCCAACCTAAGCAC)
GNAQ_c.547C>G RNA 2	34	RNA	AS	GGGACUCCAACUCUAAGCA(DNA ヌクレ オチドでは GGGACTCCAACCTAAGCA)
GNAQ_c.547C>G RNA 3	35	RNA	AS	GGGGACUCCAACUCUAAGC(DNA ヌクレ オチドでは GGGGACTCCAACCTAAGC)
GNAQ_c.547C>G RNA 4	36	RNA	AS	UGGGGACUCCAACUCUAAG(DNA ヌクレ オチドでは TGGGGACTCCAACCTAAG)
GNAQ_c.547C>G RNA 5	37	RNA	AS	GUGGGGACUCCAACUCUAA(DNA ヌクレ オチドでは GTGGGGACTCCAACCTAA)
GNAQ_c.547C>G RNA 6	38	RNA	AS	GGUGGGGACUCCAACUCUA(DNA ヌクレ オチドでは GGTGGGGACTCCAACCTA)
GNAQ_c.548G>T RNA 1	39	RNA	S	UGCUUAGAGUUCUAGUCCCC(DNA ヌクレ オチドでは TGCTTAGAGTTCTAGTCCC)
GNAQ_c.548G>T RNA 2	40	RNA	S	GCUUAGAGUUCUAGUCCCC(DNA ヌクレ オチドでは GCTTAGAGTTCTAGTCCCC)
GNAQ_c.548G>T RNA 3	41	RNA	S	CUUAGAGUUCUAGUCCCCA(DNA ヌクレ オチドでは CTTAGAGTTCTAGTCCCCA)
GNAQ_c.548G>T RNA 4	42	RNA	S	UUAGAGUUCUAGUCCCCAC(DNA ヌクレ オチドでは TTAGAGTTCTAGTCCCCAC)
GNAQ_c.548G>T RNA 5	43	RNA	S	UAGAGUUCUAGUCCCCACC(DNA ヌクレ オチドでは TAGAGTTCTAGTCCCCACC)
GNAQ_c.548G>T RNA 6	44	RNA	S	AGAGUUCUAGUCCCCACCA(DNA ヌクレ オチドでは AGAGTTCTAGTCCCCACCA)
GNAQ_c.548G>T RNA 1	45	RNA	AS	GGGACUAGAACUCUAAGCA(DNA ヌクレ オチドでは GGGACTAGAACTCTAAGCA)
GNAQ_c.548G>T RNA 2	46	RNA	AS	GGGGACUAGAACUCUAAGC(DNA ヌクレ オチドでは GGGGACTAGAACTCTAAGC)
GNAQ_c.548G>T RNA 3	47	RNA	AS	UGGGGACUAGAACUCUAAG(DNA ヌクレ オチドでは TGGGGACTAGAACTCTAAG)
GNAQ_c.548G>T RNA 4	48	RNA	AS	GUGGGGACUAGAACUCUAA(DNA ヌクレ オチドでは GTGGGGACTAGAACTCTAA)
GNAQ_c.548G>T RNA 5	49	RNA	AS	GGUGGGGACUAGAACUCUA(DNA ヌクレ オチドでは GGTGGGGACTAGAACTCTA)
GNAQ_c.548G>T RNA 6	50	RNA	AS	UGGUGGGGACUAGAACUCU(DNA ヌクレ オチドでは TGGTGGGGACTAGAACTCT)
GNAQ_c.547C>T RNA 1	51	RNA	S	GUGCUUAGAGUUUGAGUCC(DNA ヌクレ オチドでは GTGCTTAGAGTTTGAGTCC)
GNAQ_c.547C>T RNA 2	52	RNA	S	UGCUUAGAGUUUGAGUCCC(DNA ヌクレ オチドでは TGCTTAGAGTTTGAGTCCC)

10

20

30

40

50

GNAQ_c.547C>T RNA 3	53	RNA	S	GCUUAGAGUUUGAGUCCCC(DNA スクレ オチドでは GCTTAGAGTTTGAGTCCCC)
GNAQ_c.547C>T RNA 4	54	RNA	S	CUUAGAGUUUGAGUCCCCA(DNA スクレ オチドでは CTTAGAGTTTGAGTCCCCA)
GNAQ_c.547C>T RNA 5	55	RNA	S	UUAGAGUUUGAGUCCCCAC(DNA スクレ オチドでは TTAGAGTTTGAGTCCCCAC)
GNAQ_c.547C>T RNA 6	56	RNA	S	UAGAGUUUGAGUCCCCACC(DNA スクレ オチドでは TAGAGTTTGAGTCCCCACC)
GNAQ_c.547C>T RNA 1	57	RNA	AS	GGACUCAAAACUCUAAGCAC(DNA スクレ オチドでは GGA CTCAA ACTCTAAGCAC)
GNAQ_c.547C>T RNA 2	58	RNA	AS	GGGACUCAAAACUCUAAGCA(DNA スクレ オチドでは GGGACTCAA ACTCTAAGCA)
GNAQ_c.547C>T RNA 3	59	RNA	AS	GGGGACUCAAAACUCUAAGC(DNA スクレ オチドでは GGGGACTCAA ACTCTAAGC)
GNAQ_c.547C>T RNA 4	60	RNA	AS	UGGGGACUCAAAACUCUAAG(DNA スクレ オチドでは TGGGGACTCAA ACTCTAAG)
GNAQ_c.547C>T RNA 5	61	RNA	AS	GUGGGGACUCAAAACUCUAA(DNA スクレ オチドでは GTGGGGACTCAA ACTCTAA)
GNAQ_c.547C>T RNA 6	62	RNA	AS	GGUGGGGACUCAAAACUCUA(DNA スクレ オチドでは GGTGGGGACTCAA ACTCTA)
GNA11_c.546_547 delinsTT RNA 1	63	RNA	S	GUGCUGCGGGUUUGCGUGGC(DNA スクレ オチドでは GTGCTGCGGGTTTGCGTGC)
GNA11_c.546_547 delinsTT RNA 2	64	RNA	S	UGCUGCGGGUUUGCGUGGCC(DNA スクレ オチドでは TGCTGCGGGTTTGCGTGCC)
GNA11_c.546_547 delinsTT RNA 3	65	RNA	S	GCUGCGGGUUUGCGUGCCC(DNA スクレ オチドでは GCTGCGGGTTTGCGTGCCC)
GNA11_c.546_547 delinsTT RNA 4	66	RNA	S	CUGCGGGUUUGCGUGCCCA(DNA スクレ オチドでは CTGCGGGTTTGCGTGCCCA)
GNA11_c.546_547 delinsTT RNA 5	67	RNA	S	UGC GGGUUUGCGUGCCCAC(DNA スクレ オチドでは TGC GGGTTTGCGTGCCCAC)
GNA11_c.546_547 delinsTT RNA 6	68	RNA	S	GCGGGUUUGCGUGCCCACC(DNA スクレ オチドでは GCGGGTTTGCGTGCCCACC)
GNA11_c.546_547 delinsTT RNA 1	69	RNA	AS	GCACGCAAACCCGCAGCAC(DNA スクレ オチドでは GCACGCAAACCCGCAGCAC)
GNA11_c.546_547 delinsTT RNA 2	70	RNA	AS	GGCACGCAAACCCGCAGCA(DNA スクレ オチドでは GGCACGCAAACCCGCAGCA)
GNA11_c.546_547 delinsTT RNA 3	71	RNA	AS	GGGCACGCAAACCCGCAGC(DNA スクレ オチドでは GGGCACGCAAACCCGCAGC)
GNA11_c.546_547 delinsTT RNA 4	72	RNA	AS	UGGGCACGCAAACCCGCAG(DNA スクレ オチドでは TGGGCACGCAAACCCGCAG)
GNA11_c.546_547 delinsTT RNA 5	73	RNA	AS	GUGGGCACGCAAACCCGCA(DNA スクレ オチドでは GTGGGCACGCAAACCCGCA)

10

20

30

40

50

GNA11_c.546_547 delinsTT RNA 6	74	RNA	AS	GGUGGGCACGCAAACCCGC(DNA スクレ オチドでは GGTGGGCACGCAAACCCGC)
GNA11_c.548G>A RNA 1	75	RNA	S	UGCUGCGGGUCCACGUGCC(DNA スクレ オチドでは TGCTGCGGGTCCACGTGCC)
GNA11_c.548G>A RNA 2	76	RNA	S	GCUGCGGGUCCACGUGCCC(DNA スクレ オチドでは GCTGCGGGTCCACGTGCCC)
GNA11_c.548G>A RNA 3	77	RNA	S	CUGCGGGUCCACGUGCCCA(DNA スクレ オチドでは CTGCGGGTCCACGTGCCCA)
GNA11_c.548G>A RNA 4	78	RNA	S	UGCGGGUCCACGUGCCCAC(DNA スクレ オチドでは TGCGGGTCCACGTGCCAC)
GNA11_c.548G>A RNA 5	79	RNA	S	GCGGGUCCACGUGCCCACC(DNA スクレ オチドでは GCGGGTCCACGTGCCACC)
GNA11_c.548G>A RNA 6	80	RNA	S	CGGGUCCACGUGCCCACCA(DNA スクレ オチドでは CGGGTCCACGTGCCACCA)
GNA11_c.548G>A RNA 1	81	RNA	AS	GGCACGUGGACCCGCAGCA(DNA スクレ オチドでは GGCACGTGGACCCGCAGCA)
GNA11_c.548G>A RNA 2	82	RNA	AS	GGGCACGUGGACCCGCAGC(DNA スクレ オチドでは GGGCACGTGGACCCGCAGC)
GNA11_c.548G>A RNA 3	83	RNA	AS	UGGGCACGUGGACCCGCAG(DNA スクレ オチドでは TGGGCACGTGGACCCGCAG)
GNA11_c.548G>A RNA 4	84	RNA	AS	GUGGGCACGUGGACCCGCA(DNA スクレ オチドでは GTGGGCACGTGGACCCGCA)
GNA11_c.548G>A RNA 5	85	RNA	AS	GGUGGGCACGUGGACCCGC(DNA スクレ オチドでは GGTGGGCACGTGGACCCGC)
GNA11_c.548G>A RNA 6	86	RNA	AS	UGGUGGGCACGUGGACCCG(DNA スクレ オチドでは TGGTGGGCACGTGGACCCG)
GNAQ 野生型 DNA 配列 (528~575 位)	87	DNA	-	ACAAGATGTGCTTAGAGTTCGAGTCCCC ACCACAGGGATCATCGAAT
GNAQ 野生型 mRNA 配列 (528~575 位)	88	RNA	-	ACAAGAUGUGCUUAGAGUUCGAGUCCC CACCACAGGGAUCAUCGAAU
GNAQ c.548G>A_p.R183 Q バリエント DNA 配列	89	DNA	-	ACAAGATGTGCTTAGAGTTCAAGTCCCC ACCACAGGGATCATCGAAT
GNAQ c.548G>A_p.R183 Q バリエント mRNA 配列	90	RNA	-	ACAAGAUGUGCUUAGAGUUCAAGUCCC CACCACAGGGAUCAUCGAAU
GNAQ c.547C>G_p.R183 G バリエント DNA 配列	91	DNA	-	ACAAGATGTGCTTAGAGTTGGAGTCCCC ACCACAGGGATCATCGAAT

10

20

30

40

50

GNAQ c.547C>G_p.R183 G バリアント mRNA 配列	92	RNA	-	ACAAGAUGUGCUUAGAGUUGGAGUCCC CACCACAGGGAUCAUCGAAU
GNAQ c.548G>T_p.R183 L バリアント DNA 配列	93	DNA	-	ACAAGATGTGCTTAGAGTTCTAGTCCCC ACCACAGGGATCATCGAAT
GNAQ c.548G>T_p.R183 L バリアント mRNA 配列	94	RNA	-	ACAAGAUGUGCUUAGAGUUCUAGUCCC CACCACAGGGAUCAUCGAAU
GNAQ c.547C>T_p.R183* バリアント DNA 配列	95	DNA	-	ACAAGATGTGCTTAGAGTTTGAGTCCCC ACCACAGGGATCATCGAAT
GNAQ c.547C>T_p.R183* バリアント mRNA 配列	96	RNA	-	ACAAGAUGUGCUUAGAGUUUGAGUCCC CACCACAGGGAUCAUCGAAU
GNA11 野生型 DNA 配列 (528~575 位)	97	DNA	-	AGCAGGACGTGCTGCGGGTCCGCGTGCC CACCACCGGCATCATCGAGTACCCT
GNA11 野生型 mRNA 配列 (528~575 位)	98	RNA	-	AGCAGGACGUGCUGCGGGUCCGCGUGC CCACCACCGGCAUCAUCGAGUACCCU
GNA11 c.547C>T_p.R183 C バリアント DNA 配列	99	DNA	-	AGCAGGACGTGCTGCGGGTCTGCGTGCC CACCACCGGCATCATCGAGTACCCT
GNA11 c.547C>T_p.R183 C バリアント mRNA 配列	100	RNA	-	AGCAGGACGUGCUGCGGGUCUGCGUGC CCACCACCGGCAUCAUCGAGUACCCU
GNA11 c.546_547delinsTT _p.R183C バリア ント DNA 配列	101	DNA	-	AGCAGGACGTGCTGCGGGTTTGCGTGCC CACCACCGGCATCATCGAGTACCCT
GNA11 c.546_547delinsTT _p.R183C バリア ント mRNA 配列	102	RNA	-	AGCAGGACGUGCUGCGGGUUUGCGUGC CCACCACCGGCAUCAUCGAGUACCCU
GNA11 c.548G>A_p.R183 H バリアント DNA 配列	103	DNA	-	AGCAGGACGTGCTGCGGGTCCACGTGCC CACCACCGGCATCATCGAGTACCCT

10

20

30

40

GNA11 c.548G>A_p.R183 H バリアント mRNA 配列	104	RNA	-	AGCAGGACGUGCUGCGGGUCCACGUGC CCACCACCGGCAUCAUCGAGUACCCU
--	-----	-----	---	---

表 1 一例示的な標的配列及び例示的な核酸配列

【 0 2 9 4 】

本出願はまた、以下の実施形態を提供する：

50

1. 10～50個の連結されたヌクレオシドの第1の鎖を含む核酸分子であって、第1の鎖が、GNAQ又はGNA11をコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、核酸分子。

2. 第1の鎖が、GNAQ又はGNA11の機能獲得バリエントをコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、実施形態1に記載の核酸分子。

3. 第1の鎖が、GNAQをコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

4. 第1の鎖が、GNAQの機能獲得バリエントをコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

5. 第1の鎖が、GNA11をコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、実施形態1又は2に記載の核酸分子。

6. 第1の鎖が、GNA11の機能獲得バリエントをコードするmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、実施形態1、2、又は5のいずれか1つに記載の核酸分子。

7. 第1の鎖が、10～40個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

8. 第1の鎖が、10～30個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

9. 第1の鎖が、15～30個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

10. 第1の鎖が、15～25個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

11. 第1の鎖が、15～20個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

12. 第1の鎖が、10～20個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

13. 第1の鎖が、20～30個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

14. 第1の鎖が、20～25個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

15. 第1の鎖が、21個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

16. 第1の鎖が、バリエントGNAQ p.(R183Q)、p.(R183G)、p.(R183L)、又はp.(R183*)をコードするmRNAの等長部分と少なくとも95%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

17. 第1の鎖が、バリエントGNAQ p.(R183Q)、p.(R183G)、p.(R183L)、又はp.(R183*)をコードするmRNAの等長部分と100%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

18. 核酸分子が、インビトロでのバリエントGNAQ p.(R183Q/G/L/*)の発現を少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%阻害することができる、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

19. 核酸分子が、インビトロでの野生型GNAQの発現の阻害と比較して、インビトロでのバリエントGNAQ p.(R183Q/G/L/*)の発現をより大きな程度

10

20

30

40

50

で阻害する、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

20. 核酸分子が、バリエント GNAQ p. (R183Q / G / L / *) を発現する細胞における異常な細胞分化シグナル伝達を部分的又は完全に救済することができる、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

21. バリエント GNAQ p. (R183Q) が、GNAQ ゲノム配列における c. G548A 変異によって引き起こされる、実施形態 16 ~ 20 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

22. 第 1 の鎖が、配列番号 13 ~ 18 からなる群から選択される配列と少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、又は少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含む、実施形態 21 に記載の核酸分子。

23. 第 1 の鎖が、配列番号 13 ~ 18 からなる群から選択される配列を含む、実施形態 21 又は 22 に記載の核酸分子。

24. 第 1 の鎖が、配列番号 13 ~ 18 からなる群から選択される配列からなる、実施形態 21 ~ 23 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

25. バリエント GNAQ p. (R183G) が、GNAQ ゲノム配列における c. C547G 変異によって引き起こされる、実施形態 16 ~ 20 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

26. 第 1 の鎖が、配列番号 33 ~ 38 からなる群から選択される配列と少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、又は少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含む、実施形態 25 に記載の核酸分子。

27. 第 1 の鎖が、配列番号 33 ~ 38 からなる群から選択される配列を含む、実施形態 25 又は 26 に記載の核酸分子。

28. 第 1 の鎖が、配列番号 33 ~ 38 からなる群から選択される配列からなる、実施形態 25 ~ 27 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

29. バリエント GNAQ p. (R183L) が、GNAQ ゲノム配列における c. G548T 変異によって引き起こされる、実施形態 16 ~ 20 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

30. 第 1 の鎖が、配列番号 45 ~ 50 からなる群から選択される配列と少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、又は少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含む、実施形態 29 に記載の核酸分子。

31. 第 1 の鎖が、配列番号 45 ~ 50 からなる群から選択される配列を含む、実施形態 29 又は 30 に記載の核酸分子。

32. 第 1 の鎖が、配列番号 45 ~ 50 からなる群から選択される配列からなる、実施形態 29 又は 30 に記載の核酸分子。

33. バリエント GNAQ p. (R183*) が、GNAQ ゲノム配列における c. C547T 変異によって引き起こされる、実施形態 16 ~ 20 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

34. 第 1 の鎖が、配列番号 57 ~ 62 からなる群から選択される配列と少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、又は少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含む、実施形態 33 に記載の核酸分子。

35. 第 1 の鎖が、配列番号 57 ~ 62 からなる群から選択される配列を含む、実施形態 33 又は 34 に記載の核酸分子。

36. 第 1 の鎖が、配列番号 57 ~ 62 からなる群から選択される配列からなる、実施形態 33 ~ 35 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

37. 第 1 の鎖が、バリエント GNA11 p. (R183C) 又は p. (R183H) をコードする mRNA の等長部分と少なくとも 95 % の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、実施形態 1 ~ 2 又は 5 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

38. 第 1 の鎖が、バリエント GNA11 p. (R183C) 又は p. (R183H) をコードする mRNA の等長部分と 100 % の同一性を有する配列に完全に相補的で

10

20

30

40

50

ある配列を含む、実施形態 1～2 又は 5～15 又は 37 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

39. 核酸分子が、インビトロでのバリエーション GNA11 p. (R183C/H) の発現を少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、又は少なくとも 90% 阻害することができる、実施形態 1～2 又は 5～15 又は 37～38 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

40. 核酸分子が、インビトロでの野生型 GNA11 の発現の阻害と比較して、インビトロでのバリエーション GNA11 p. (R183C/H) の発現をより大きな程度で阻害する、実施形態 1～2 又は 5～15 又は 37～39 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

41. 核酸分子が、バリエーション GNA11 p. (R183C/H) を発現する細胞における異常な細胞分化シグナル伝達を部分的又は完全に救済することができる、実施形態 1～2 又は 5～15 又は 37～40 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

42. バリエーション GNA11 p. (R183C) が、GNA11 ゲノム配列における c. C547T 変異によって引き起こされる、実施形態 37～41 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

43. 第 1 の鎖が、配列番号 19～24 からなる群から選択される配列と少なくとも 80%、少なくとも 90%、又は少なくとも 95% の同一性を有する配列を含む、実施形態 42 に記載の核酸分子。

44. 第 1 の鎖が、配列番号 19～24 からなる群から選択される配列を含む、実施形態 42 又は 43 に記載の核酸分子。

45. 第 1 の鎖が、配列番号 19～24 からなる群から選択される配列からなる、実施形態 42～44 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

46. バリエーション GNA11 p. (R183C) が、GNA11 ゲノム配列における c. 546 _ 547 del ins TT 変異によって引き起こされる、実施形態 37～41 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

47. 第 1 の鎖が、配列番号 69～74 からなる群から選択される配列と少なくとも 80%、少なくとも 90%、又は少なくとも 95% の同一性を有する配列を含む、実施形態 46 に記載の核酸分子。

48. 第 1 の鎖が、配列番号 69～74 からなる群から選択される配列を含む、実施形態 46 又は 47 に記載の核酸分子。

49. 第 1 の鎖が、配列番号 69～74 からなる群から選択される配列からなる、実施形態 46～48 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

50. バリエーション GNA11 p. (R183H) が、GNA11 ゲノム配列における c. G548A 変異によって引き起こされる、実施形態 37～41 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

51. 第 1 の鎖が、配列番号 81～86 からなる群から選択される配列と少なくとも 80%、少なくとも 90%、又は少なくとも 95% の同一性を有する配列を含む、実施形態 50 に記載の核酸分子。

52. 第 1 の鎖が、配列番号 81～86 からなる群から選択される配列を含む、実施形態 50 又は 51 に記載の核酸分子。

53. 第 1 の鎖が、配列番号 81～86 からなる群から選択される配列からなる、実施形態 50～52 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

54. 核酸分子が、一本鎖核酸分子である、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

55. 核酸分子が、二本鎖核酸分子である、実施形態 1～54 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

56. 二本鎖核酸分子が、10～50 個の連結されたヌクレオシドの第 2 の鎖を含み、第 2 の鎖が、第 1 の鎖に少なくとも部分的に相補的である、実施形態 55 に記載の核酸分子。

10

20

30

40

50

５７． 第２の鎖が、第１の鎖と少なくとも８０％相補的である、実施形態５６に記載の核酸分子。

５８． 第２の鎖が、第１の鎖と少なくとも９０％相補的である、実施形態５６又は５７に記載の核酸分子。

５９． 第２の鎖が、第１の鎖に少なくとも９５％相補的である、実施形態５６～５８のいずれか１つに記載の核酸分子。

６０． 第２の鎖が、第１の鎖に完全に相補的である、実施形態５６～５９のいずれか１つに記載の核酸分子。

６１． 第２の鎖が、１０～４０個の連結されたヌクレオシドからなる、実施形態５６～６０のいずれか１つに記載の核酸分子。

６２． 第２の鎖が、１０～３０個の連結されたヌクレオシドからなる、実施形態５６～６０のいずれか１つに記載の核酸分子。

６３． 第２の鎖が、１５～３０個の連結されたヌクレオシドからなる、実施形態５６～６０のいずれか１つに記載の核酸分子。

６４． 第２の鎖が、１５～２５個の連結されたヌクレオシドからなる、実施形態５６～６０のいずれか１つに記載の核酸分子。

６５． 第２の鎖が、１５～２０個の連結されたヌクレオシドからなる、実施形態５６～６０のいずれか１つに記載の核酸分子。

６６． 第２の鎖が、１０～２０個の連結されたヌクレオシドからなる、実施形態５６～６０のいずれか１つに記載の核酸分子。

６７． 第２の鎖が、２０～３０個の連結されたヌクレオシドからなる、実施形態５６～６０のいずれか１つに記載の核酸分子。

６８． 第２の鎖が、２０～２５個の連結されたヌクレオシドからなる、実施形態５６～６０のいずれか１つに記載の核酸分子。

６９． 第２の鎖が、２１個の連結されたヌクレオシドからなる、実施形態５６～６０のいずれか１つに記載の核酸分子。

７０． 第１の鎖が、第２の鎖よりも長い、実施形態５６～６９のいずれか１つに記載の核酸分子。

７１． １、２、３、４、５個以上のヌクレオシドの第１の鎖の３'末端にオーバーハングを有する、実施形態５６～７０のいずれか１つに記載の核酸分子。

７２． ２つのヌクレオシドの第１の鎖の３'末端にオーバーハングを有する、実施形態５６～７１のいずれか１つに記載の核酸分子。

７３． １、２、３、４、５個以上のヌクレオシドの第１の鎖の５'末端にオーバーハングを有する、実施形態５６～７２のいずれか１つに記載の核酸分子。

７４． ２つのヌクレオシドの第１の鎖の５'末端にオーバーハングを有する、実施形態５６～７３のいずれか１つに記載の核酸分子。

７５． 第２の鎖が、第１の鎖よりも長い、実施形態５６～６９のいずれか１つに記載の核酸分子。

７６． １、２、３、４、５個以上のヌクレオシドの第２の鎖の３'末端にオーバーハングを有する、実施形態５６～６９又は７５に記載の核酸分子。

７７． ２つのヌクレオシドの第２の鎖の３'末端にオーバーハングを有する、実施形態５６～６９又は７５～７６のいずれか１つに記載の核酸分子。

７８． １、２、３、４、５個以上のヌクレオシドの第２の鎖の５'末端にオーバーハングを有する、実施形態５６～６９又は７５～７７のいずれか１つに記載の核酸分子。

７９． ２つのヌクレオシドの第２の鎖の５'末端にオーバーハングを有する、実施形態５６～６９又は７５～７８のいずれか１つに記載の核酸分子。

８０． １、２、３、４、５個以上のヌクレオシドの第１の鎖の５'末端及び３'末端の両方にオーバーハングを有する、実施形態５６～６９又は７５～７９のいずれか１つに記載の核酸分子。

８１． ２つのヌクレオシドの第１の鎖の５'末端及び３'末端の両方にオーバーハング

10

20

30

40

50

を有する、実施形態 56～69 又は 75～80 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

82. オーバーハングが、2 つのチミンヌクレオチド (TT) を含む、実施形態 71～74 又は 75～81 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

83. オーバーハングが、2 つのチミンヌクレオチド (TT) からなる、実施形態 71～74 又は 75～81 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

84. 核酸分子が、以下：配列番号 1 及び配列番号 13、配列番号 2 及び配列番号 14、配列番号 3 及び配列番号 15、配列番号 4 及び配列番号 16、配列番号 5 及び配列番号 17、並びに配列番号 6 及び配列番号 18、からなるリストから選択される一対の配列を含む第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む、実施形態 55～83 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

10

85. 核酸分子が、以下：配列番号 1 及び配列番号 13、配列番号 2 及び配列番号 14、配列番号 3 及び配列番号 15、配列番号 4 及び配列番号 16、配列番号 5 及び配列番号 17、並びに配列番号 6 及び配列番号 18、からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む、実施形態 55～83 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

86. 核酸分子が、以下：配列番号 1 及び配列番号 13、配列番号 2 及び配列番号 14、配列番号 3 及び配列番号 15、配列番号 4 及び配列番号 16、配列番号 5 及び配列番号 17、並びに配列番号 6 及び配列番号 18、からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖からなる、実施形態 55～83 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

20

87. 核酸分子が、以下：配列番号 7 及び配列番号 19、配列番号 8 及び配列番号 20、配列番号 9 及び配列番号 21、配列番号 10 及び配列番号 22、配列番号 11 及び配列番号 23、並びに配列番号 12 及び配列番号 24、からなるリストから選択される一対の配列を含む第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む、実施形態 55～83 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

88. 核酸分子が、以下：配列番号 7 及び配列番号 19、配列番号 8 及び配列番号 20、配列番号 9 及び配列番号 21、配列番号 10 及び配列番号 22、配列番号 11 及び配列番号 23、並びに配列番号 12 及び配列番号 24、からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む、実施形態 55～83 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

30

89. 核酸分子が、以下：配列番号 7 及び配列番号 19、配列番号 8 及び配列番号 20、配列番号 9 及び配列番号 21、配列番号 10 及び配列番号 22、配列番号 11 及び配列番号 23、並びに配列番号 12 及び配列番号 24、からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖からなる、実施形態 55～83 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

90. 核酸分子が、以下：配列番号 27 及び配列番号 33、配列番号 28 及び配列番号 34、配列番号 29 及び配列番号 35、配列番号 30 及び配列番号 36、配列番号 31 及び配列番号 37、並びに配列番号 32 及び配列番号 38、からなるリストから選択される一対の配列を含む第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む、実施形態 55～83 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

40

91. 核酸分子が、以下：配列番号 27 及び配列番号 33、配列番号 28 及び配列番号 34、配列番号 29 及び配列番号 35、配列番号 30 及び配列番号 36、配列番号 31 及び配列番号 37、並びに配列番号 32 及び配列番号 38、からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖を含む、実施形態 55～83 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

92. 核酸分子が、以下：配列番号 27 及び配列番号 33、配列番号 28 及び配列番号 34、配列番号 29 及び配列番号 35、配列番号 30 及び配列番号 36、配列番号 31 及び配列番号 37、並びに配列番号 32 及び配列番号 38、からなるリストから選択される一対の配列からなる第 1 の鎖及び第 2 の鎖からなる、実施形態 55～83 のいずれか 1 つに記載の核酸分子。

50

93. 核酸分子が、以下：配列番号39及び配列番号45、配列番号40及び配列番号46、配列番号41及び配列番号47、配列番号42及び配列番号48、配列番号43及び配列番号49、並びに配列番号44及び配列番号50、からなるリストから選択される一対の配列を含む第1の鎖及び第2の鎖を含む、実施形態55～83のいずれか1つに記載の核酸分子。

94. 核酸分子が、以下：配列番号39及び配列番号45、配列番号40及び配列番号46、配列番号41及び配列番号47、配列番号42及び配列番号48、配列番号43及び配列番号49、並びに配列番号44及び配列番号50、からなるリストから選択される一対の配列からなる第1の鎖及び第2の鎖を含む、実施形態55～83のいずれか1つに記載の核酸分子。

10

95. 核酸分子が、以下：配列番号39及び配列番号45、配列番号40及び配列番号46、配列番号41及び配列番号47、配列番号42及び配列番号48、配列番号43及び配列番号49、並びに配列番号44及び配列番号50、からなるリストから選択される一対の配列からなる第1の鎖及び第2の鎖からなる、実施形態55～83のいずれか1つに記載の核酸分子。

96. 核酸分子が、以下：配列番号51及び配列番号57、配列番号52及び配列番号58、配列番号53及び配列番号59、配列番号54及び配列番号60、配列番号55及び配列番号61、並びに配列番号56及び配列番号62、からなるリストから選択される一対の配列を含む第1の鎖及び第2の鎖を含む、実施形態55～83のいずれか1つに記載の核酸分子。

20

97. 核酸分子が、以下：配列番号51及び配列番号57、配列番号52及び配列番号58、配列番号53及び配列番号59、配列番号54及び配列番号60、配列番号55及び配列番号61、並びに配列番号56及び配列番号62、からなるリストから選択される一対の配列からなる第1の鎖及び第2の鎖を含む、実施形態55～83のいずれか1つに記載の核酸分子。

98. 核酸分子が、以下：配列番号51及び配列番号57、配列番号52及び配列番号58、配列番号53及び配列番号59、配列番号54及び配列番号60、配列番号55及び配列番号61、並びに配列番号56及び配列番号62、からなるリストから選択される一対の配列からなる第1の鎖及び第2の鎖からなる、実施形態55～83のいずれか1つに記載の核酸分子。

30

99. 核酸分子が、以下：配列番号63及び配列番号69、配列番号64及び配列番号70、配列番号65及び配列番号71、配列番号66及び配列番号72、配列番号67及び配列番号73、並びに配列番号68及び配列番号74、からなるリストから選択される一対の配列を含む第1の鎖及び第2の鎖を含む、実施形態55～83のいずれか1つに記載の核酸分子。

100. 核酸分子が、以下：配列番号63及び配列番号69、配列番号64及び配列番号70、配列番号65及び配列番号71、配列番号66及び配列番号72、配列番号67及び配列番号73、並びに配列番号68及び配列番号74、からなるリストから選択される一対の配列からなる第1の鎖及び第2の鎖を含む、実施形態55～83のいずれか1つに記載の核酸分子。

40

101. 核酸分子が、以下：配列番号63及び配列番号69、配列番号64及び配列番号70、配列番号65及び配列番号71、配列番号66及び配列番号72、配列番号67及び配列番号73、並びに配列番号68及び配列番号74、からなるリストから選択される一対の配列からなる第1の鎖及び第2の鎖からなる、実施形態55～83のいずれか1つに記載の核酸分子。

102. 核酸分子が、以下：配列番号75及び配列番号81、配列番号76及び配列番号82、配列番号77及び配列番号83、配列番号78及び配列番号84、配列番号79及び配列番号85、並びに配列番号80及び配列番号86、からなるリストから選択される一対の配列を含む第1の鎖及び第2の鎖を含む、実施形態55～83のいずれか1つに記載の核酸分子。

50

103. 核酸分子が、以下：配列番号75及び配列番号81、配列番号76及び配列番号82、配列番号77及び配列番号83、配列番号78及び配列番号84、配列番号79及び配列番号85、並びに配列番号80及び配列番号86、からなるリストから選択される一対の配列からなる第1の鎖及び第2の鎖を含む、実施形態55～83のいずれか1つに記載の核酸分子。

104. 核酸分子が、以下：配列番号75及び配列番号81、配列番号76及び配列番号82、配列番号77及び配列番号83、配列番号78及び配列番号84、配列番号79及び配列番号85、並びに配列番号80及び配列番号86、からなるリストから選択される一対の配列からなる第1の鎖及び第2の鎖からなる、実施形態55～83のいずれか1つに記載の核酸分子。

105. いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子と、標的化部分と、を含む、化合物。

106. 標的化部分が、脂質ナノ粒子、リポソーム、エクソソーム、抗体若しくはその断片、抗原結合ドメイン若しくはその断片、ペプチド、細胞透過性ペプチド、コンジュゲート基、又はそれらの任意の組み合わせを含む、実施形態105に記載の化合物。

107. 標的化部分が、コンジュゲート基を含み、コンジュゲート基が、1つ以上の炭水化物を含む、実施形態105又は106に記載の化合物。

108. コンジュゲート基が、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、多糖、修飾多糖、マンノース、ガラクトース、マンノース誘導体、ガラクトース誘導体、D-マンノピラノース、L-マンノピラノース、D-アラビノース、L-ガラクトース、D-キシロフラノース、L-キシロフラノース、D-グルコース、L-グルコース、D-ガラクトース、L-ガラクトース、 α -D-マンノフラノース、 β -D-マンノフラノース、 α -D-マンノピラノース、 β -D-マンノピラノース、 α -D-グルコピラノース、 β -D-グルコピラノース、 α -D-グルコフラノース、 β -D-グルコフラノース、 α -D-フルクトフラノース、 α -D-フルクトピラノース、 α -D-ガラクトピラノース、 β -D-ガラクトピラノース、 α -D-ガラクトフラノース、 β -D-ガラクトフラノース、グルコサミン、シアル酸、 α -D-ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、2-アミノ-3-O-[(R)-1-カルボキシエチル]-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース、2-デオキシ-2-メチルアミノ-L-グルコピラノース、4,6-ジデオキシ-4-ホルムアミド-2,3-ジ-O-メチル-D-マンノピラノース、2-デオキシ-2-スルホアミノ-D-グルコピラノース、N-グリコイル- α -ノイラミン酸、5-チオ- β -D-グルコピラノース、メチル2,3,4-トリ-O-アセチル-1-チオ-6-O-トリチル- α -D-グルコピラノシド、4-チオ- β -D-ガラクトピラノース、エチル3,4,6,7-テトラ-O-アセチル-2-デオキシ-1,5-ジチオ- α -D-グルコヘプトピラノシド、2,5-アンヒドロ-D-アロノニトリル、リボース、D-リボース、D-4-チオリボース、L-リボース、又はL-4-チオリボースを含む、実施形態107に記載の化合物。

109. 標的化部分が、第2の鎖の3'末端に連結されている、実施形態105～108のいずれか1つに記載の化合物。

110. 標的化部分が、第2の鎖の5'末端に連結されている、実施形態105～108のいずれか1つに記載の化合物。

111. 標的化部分が、第1の鎖の5'末端に連結されている、実施形態105～108のいずれか1つに記載の化合物。

112. 標的化部分が、第1の鎖の3'末端に連結されている、実施形態105～108のいずれか1つに記載の化合物。

113. 少なくとも1つのヌクレオシドが、修飾糖を含む、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子又は化合物。

114. 少なくとも1つのヌクレオシド間結合が、修飾されたヌクレオシド間結合である、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子又は化合物。

115. 修飾されたヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエート又はホスホロジチオ

10

20

30

40

50

エートヌクレオシド間結合である、実施形態 114 に記載の核酸分子又は化合物。

116. 1~40 個のホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合を含む、実施形態 114 又は 115 に記載の核酸分子又は化合物。

117. 1~30 個のホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合を含む、実施形態 114 又は 115 に記載の核酸分子又は化合物。

118. 1~20 個のホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合を含む、実施形態 114 又は 115 に記載の核酸分子又は化合物。

119. 1~10 個のホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合を含む、実施形態 114 又は 115 に記載の核酸分子又は化合物。

120. 核酸分子が、配列番号 89 (GNAQ c. 548G>A__p. R183Q)、配列番号 91 (GNAQ c. 547C>G__p. R183G)、配列番号 93 (GNAQ c. 548G>T__p. R183L)、配列番号 95 (GNAQ c. 547C>T__p. R183*)、配列番号 99 (GNA11 c. 547C>T__p. R183C)、配列番号 101 (GNA11 c. 546__547delinsTT__p. R183C)、及び配列番号 103 (GNA11 c. 548G>A__p. R183H) からなるリストから選択される DNA 配列を特異的に標的化する、いずれかの先行実施形態に記載の核酸分子。

121. いずれかの先行実施形態に記載の一本鎖核酸分子若しくは化合物又はその塩と、薬学的に許容される担体又は希釈剤のうちの少なくとも 1 つと、を含む、組成物。

122. 実施形態 1~120 のいずれかに記載の核酸分子又は化合物を含む、プロドラグ。

123. CRISPR ガイド RNA (gRNA) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、gRNA が、細胞における標的配列とハイブリダイズし、標的配列が、GNAQ 又は GNA11 のバリエーションをコードする、核酸分子。

124. CRISPR ヌクレアーゼシステムであって、

(a) CRISPR ガイド RNA (gRNA) をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターであって、gRNA が、対象の細胞における標的 DNA 配列とハイブリダイズし、標的配列が、GNAQ 又は GNA11 のバリエーションをコードする、プロモーターと、

(b) ヌクレアーゼ (例えば、Cas ヌクレアーゼ) をコードするヌクレオチド配列であって、成分 (a) 及び (b) が、システムの同じ又は異なるベクター上に位置する、ヌクレオチド配列と、を含む 1 つ以上のベクターを含み、

gRNA が、標的 DNA 配列を標的化し、標的 DNA 配列とハイブリダイズし、ヌクレアーゼが、標的配列を切断して、GNAQ 又は GNA11 のバリエーションの発現を変化させる、CRISPR ヌクレアーゼシステム。

125. システムが、単一のアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子にパッケージングされる、実施形態 124 に記載の CRISPR ヌクレアーゼシステム。

126. ヌクレアーゼが、細胞における発現のためにコドン最適化されている、実施形態 124 又は 125 に記載の CRISPR ヌクレアーゼシステム。

127. プロモーターが、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個の gRNA に作動可能に連結されている、実施形態 124~126 のいずれか 1 つに記載の CRISPR ヌクレアーゼシステム。

128. gRNA が、バリエーション GNAQ p. (R183Q)、p. (R183G)、p. (R183L)、又は p. (R183*) をコードする DNA 配列を標的化する、実施形態 124~127 のいずれか 1 つに記載の CRISPR ヌクレアーゼシステム。

129. gRNA が、バリエーション GNA11 p. (R183C) 又は p. (R183H) をコードする DNA 配列を標的化する、実施形態 124~128 のいずれか 1 つに記載の CRISPR ヌクレアーゼシステム。

130. GNAQ 及び／又は GNA11 におけるバリエーションに関連する又はそれによって駆動される疾患又は障害を有する患者を治療する方法であって、実施形態 1~129

10

20

30

40

50

のいずれか 1 つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む、方法。

131. スタージ・ウェーバー症候群 (SWS)、色素血管母斑症 (PPV)、又は広範囲皮膚黒色症 (EDM) を有する患者を治療する方法であって、実施形態 1 ~ 129 のいずれか 1 つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む、方法。

132. 先天性血管腫を有する患者を治療する方法であって、実施形態 1 ~ 129 のいずれか 1 つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む、方法。

133. 先天性血管腫が、急速退縮性先天性血管腫 (RICH)、部分退縮性先天性血管腫 (PICH)、又は非退縮性先天性血管腫 (NICH) である、実施形態 132 に記載の方法。

134. がんを有する患者を治療する方法であって、実施形態 1 ~ 129 のいずれか 1 つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む、方法。

135. がんが、以下：副腎がん、自律神経節がん、胆道がん、骨がん、乳がん、中枢神経系がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、眼がん、卵管がん、女性性器がん、胃腸管がん、生殖器がん、造血がん、リンパ系がん、腎臓がん、大腸がん、肝臓がん、肺がん、髄膜がん、NS がん、食道がん、卵巣がん、膵臓がん、副甲状腺がん、陰茎がん、会陰がん、腹膜がん、下垂体がん、胎盤がん、胸膜がん、前立腺がん、唾液腺がん、皮膚がん、小腸がん、軟部組織がん、胃がん、精巣がん、胸腺がん、甲状腺がん、上気道消化管がん、尿路がん、子宮付属器がん、膣がん、及び外陰がん、からなるリストから選択される、実施形態 230 に記載の方法。

136. 黒色腫を有する患者を治療する方法であって、実施形態 1 ~ 129 のいずれか 1 つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む、方法。

137. 医薬として使用するための、実施形態 1 ~ 129 のいずれか 1 つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステム。

138. スタージ・ウェーバー症候群 (SWS)、色素血管母斑症 (PPV)、又は広範囲皮膚黒色症 (EDM) の治療を必要とする患者におけるスタージ・ウェーバー症候群 (SWS)、色素血管母斑症 (PPV)、又は広範囲皮膚黒色症 (EDM) を治療する方法で使用するための、実施形態 1 ~ 129 のいずれか 1 つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステムであって、方法が、実施形態 1 ~ 129 のいずれか 1 つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステム。

139. 先天性血管腫を有する患者を治療する方法で使用するための、実施形態 1 ~ 129 のいずれか 1 つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステムであって、方法が、実施形態 1 ~ 129 のいずれか 1 つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステム。

140. 先天性血管腫が、急速退縮性先天性血管腫 (RICH)、部分退縮性先天性血管腫 (PICH)、又は非退縮性先天性血管腫 (NICH) である、実施形態 139 に記載の使用のための核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステム。

141. がんの治療を必要とする患者におけるがんを治療する方法で使用するための、実施形態 1 ~ 129 のいずれか 1 つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレアーゼシステムであって、方法が、実施形態 1 ~ 129 のいずれか 1 つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又は C R I S P R ヌクレア

10

20

30

40

50

ーゼシステムを患者に投与することを含む、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステム。

142. 黒色腫の治療を必要とする患者における黒色腫を治療する方法で使用するための、実施形態1～129のいずれか1つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムであって、方法が、実施形態1～129のいずれか1つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムを患者に投与することを含む、核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステム。

143. 実施形態1～129のいずれか1つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムをコードする核酸分子を含む、発現構築物。

144. 実施形態1～129のいずれか1つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムをコードする、単離された核酸分子。

145. 実施形態144に記載の単離された核酸分子を含む、ベクター。

146. ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、発現カセット、又はプラスミドである、実施形態144に記載のベクター。

147. RNAポリメラーゼIII又はRNAポリメラーゼIIプロモーターを更に含む、実施形態144又は145に記載のベクター。

148. RNAポリメラーゼIIIプロモーターが、U6又はH1プロモーターである、実施形態147に記載のベクター。

149. 実施形態1～129のいずれか1つに記載の核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム、実施形態144に記載の単離された核酸分子、又は実施形態145～148のいずれか1つに記載のベクターを含む、宿主細胞。

150. 哺乳動物宿主細胞である、実施形態149に記載の宿主細胞。

151. ヒト宿主細胞である、実施形態149又は150に記載の宿主細胞。

152. 核酸分子、化合物、組成物、又はプロドラッグが、脂質ベースのナノ粒子、リポソーム、エクソソーム、高分子ナノ粒子、無機ナノ粒子、又はルキソリチニブとサリドマイドとの同時送達高分子電解質ナノ複合体(RTNP)による送達のために製剤化される、実施形態130～142のいずれか1つに記載の使用のための方法、又は核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム。

153. 核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムが、送達(ジムノティック送達)のためにパッケージングされていない、実施形態130～142のいずれか1つに記載の使用のための方法、又は核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム。

154. 核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムが、注射によって投与される、実施形態130～142又は254～257のいずれか1つに記載の使用のための方法、又は核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム。

155. 核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムが、マイクロニードルを使用して注射される、実施形態130～142又は254～258のいずれか1つに記載の使用のための方法、又は核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム。

156. 核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムが、局所投与される、実施形態130～142又は254～260のいずれか1つに記載の使用のための方法、又は核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム。

157. 投与が、エレクトロポレーション又は超音波を更に含む、実施形態130～142又は254～262のいずれか1つに記載の使用のための方法、又は核酸分子、化

10

20

30

40

50

合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム。

158. 核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムが、ドコサン酸(DCA)にコンジュゲートされる、実施形態130~142又は254~262のいずれか1つに記載の使用のための方法、又は核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム。

159. 核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムが、送達(ジムノティック送達)のためにパッケージングされていない、実施形態130~142又は254~262のいずれか1つに記載の使用のための方法、又は核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム。

160. 核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムが、注射によって投与される、実施形態130~142又は254~262のいずれか1つに記載の使用のための方法、又は核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム。

161. 核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムが、マイクロニードルを使用して注射される、実施形態130~142又は254~262のいずれか1つに記載の使用のための方法、又は核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム。

162. 核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムが、脂質ベースのナノ粒子による送達のために製剤化され、マイクロニードルを使用して注射される、実施形態130~142又は254~262のいずれか1つに記載の使用のための方法、又は核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム。

163. 核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、又はCRISPRヌクレアーゼシステムが、ドコサン酸(DCA)にコンジュゲートされ、マイクロニードルを使用して注射される、実施形態130~142又は254~262のいずれか1つに記載の使用のための方法、又は核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ、若しくはCRISPRヌクレアーゼシステム。

164. 15~30個の連結されたヌクレオシドからなるセンス鎖と、15~30個の連結されたヌクレオシドからなるアンチセンス鎖と、を含む、二本鎖リボ核酸分子であって、アンチセンス鎖が、GNAQの機能獲得バリエーション又はGNA11の機能獲得バリエーションをコードするプレゲノムRNA及び／又はmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含み、センス鎖が、アンチセンス鎖に少なくとも部分的に相補的である、二本鎖リボ核酸分子。

165. 15~30個の連結されたヌクレオシドからなるセンス鎖と、15~30個の連結されたヌクレオシドからなるアンチセンス鎖と、を含む、二本鎖リボ核酸分子であって、アンチセンス鎖が、バリエーションGNAQ又はバリエーションGNA11をコードするプレゲノムRNA及び／又はmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含み、センス鎖が、アンチセンス鎖に少なくとも部分的に相補的である、二本鎖リボ核酸分子。

166. 15~30個の連結されたヌクレオシドからなるセンス鎖と、15~30個の連結されたヌクレオシドからなるアンチセンス鎖と、を含む、二本鎖リボ核酸分子であって、アンチセンス鎖が、バリエーションGNAQ p.(R183Q)又はバリエーションGNA11 p.(R183C)をコードするプレゲノムRNA及び／又はmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含み、センス鎖が、アンチセンス鎖に少なくとも部分的に相補的である、二本鎖リボ核酸分子。

167. 15~30個の連結されたヌクレオシドからなるセンス鎖と、15~30個の連結されたヌクレオシドからなるアンチセンス鎖と、を含む、二本鎖リボ核酸分子であって、アンチセンス鎖が、バリエーションGNAQ p.(R183Q)をコードするプレゲノムRNA及び／又はmRNAの等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含み、センス鎖が、アンチセンス鎖に少なくとも部分的に相補的

10

20

30

40

50

である、二本鎖リボ核酸分子。

168. 15～30個の連結されたヌクレオシドからなるセンス鎖と、15～30個の連結されたヌクレオシドからなるアンチセンス鎖と、を含む、二本鎖リボ核酸分子であって、アンチセンス鎖が、バリエーション GNA11 p. (R183C) をコードするプレゲノム RNA 及び／又は mRNA の等長部分と少なくとも90%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含み、センス鎖が、アンチセンス鎖に少なくとも部分的に相補的である、二本鎖リボ核酸分子。

169. アンチセンス鎖が、15～20個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

170. アンチセンス鎖が、15～25個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

171. アンチセンス鎖が、20～30個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

172. アンチセンス鎖が、20～25個の連結されたヌクレオシドからなる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

173. アンチセンス鎖が、19個の連結されたヌクレオシドからなる、実施形態164～170のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子。

174. 第1の鎖が、バリエーション GNAQ p. (R183Q) 又は GNA11 p. (R183C) をコードするプレゲノム RNA 及び／又は mRNA の等長部分と少なくとも95%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

175. アンチセンス鎖が、バリエーション GNAQ p. (R183Q) 又は GNA11 p. (R183C) をコードするプレゲノム RNA 及び／又は mRNA の等長部分と100%の同一性を有する配列に完全に相補的である配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

176. センス鎖が、アンチセンス鎖と少なくとも80%相補的である、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

177. センス鎖が、アンチセンス鎖と少なくとも90%相補的である、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

178. センス鎖が、アンチセンス鎖と少なくとも95%相補的である、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

179. センス鎖が、アンチセンス鎖に完全に相補的である、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

180. 化合物が、インビトロでのバリエーション GNAQ p. (R183Q) 又は GNA11 p. (R183C) の発現を少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、又は好ましくは少なくとも90%阻害することができる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

181. 化合物が、バリエーション GNAQ p. (R183Q) 又は GNA11 p. (R183C) を発現する細胞における異常なカルシウムシグナル伝達を部分的又は完全に救済することができる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

182. GNAQ R183Q バリエーションが、GNAQ ゲノム配列における c. G548A 変異によって引き起こされる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

183. アンチセンス鎖が、c. G548A 変異に完全に相補的である配列を含む、実施形態182に記載の二本鎖リボ核酸分子。

184. GNA11 R183C バリエーションが、GNA11 ゲノム配列における c. C547T 変異によって引き起こされる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

185. アンチセンス鎖が、c. C547T 変異に完全に相補的である配列を含む、実施形態184に記載の二本鎖リボ核酸分子。

10

20

30

40

50

186. アンチセンス鎖が、センス鎖よりも長い、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

187. 1、2、3、4、5個以上のヌクレオシドのアンチセンス鎖の3'末端にオーバーハングを有する、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

188. 2つのヌクレオシドのアンチセンス鎖の3'末端にオーバーハングを有する、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

189. 1、2、3、4、5個以上のヌクレオシドのアンチセンス鎖の5'末端にオーバーハングを有する、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

190. 2つのヌクレオシドのアンチセンス鎖の5'末端にオーバーハングを有する、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

191. センス鎖が、アンチセンス鎖よりも長い、実施形態164～180のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子。

192. 1、2、3、4、5個以上のヌクレオシドのセンス鎖の3'末端にオーバーハングを有する、実施形態191に記載の二本鎖リボ核酸分子。

193. 2つのヌクレオシドのセンス鎖の3'末端にオーバーハングを有する、実施形態191又は192に記載の二本鎖リボ核酸分子。

194. 1、2、3、4、5個以上のヌクレオシドのセンス鎖の5'末端にオーバーハングを有する、実施形態191～193のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子。

195. 2つのヌクレオシドのセンス鎖の5'末端にオーバーハングを有する、実施形態191～194のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子。

196. センス鎖が、配列番号1 (UGCUUAGAGUUCAAGUCCCC)、配列番号2 (GCUUAGAGUUCAAGUCCCCC)、配列番号3 (CUUAGAGUUCAAGUCCCCCA)、配列番号4 (UUAGAGUUCAAGUCCCCCAC)、配列番号5 (UAGAGUUCAAGUCCCCCACCC)、配列番号6 (AGAGUUCAAGUCCCCCACCA)、配列番号7 (GUGCUGCGGGGUCUGCGUGC)、配列番号8 (UGCUGCGGGGUCUGCGUGCC)、配列番号9 (GCGCGGGGUCUGCGUGCCCC)、配列番号10 (CUGCGGGGUCUGCGUGCCCCA)、配列番号11 (UGCGGGGUCUGCGUGCCCCAC)、又は配列番号12 (CGGGGUCUGCGUGCCCCACCA)のうちのいずれか1つを含む核酸塩基配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

197. センス鎖が、配列番号1 (UGCUUAGAGUUCAAGUCCCC)又は配列番号3 (CUUAGAGUUCAAGUCCCCCA)のうちのいずれか1つを含む核酸塩基配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

198. センス鎖が、配列番号10 (CUGCGGGGUCUGCGUGCCCCA)を含む核酸塩基配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

199. センス鎖が、配列番号1 (UGCUUAGAGUUCAAGUCCCC)、配列番号2 (GCUUAGAGUUCAAGUCCCCC)、配列番号3 (CUUAGAGUUCAAGUCCCCCA)、配列番号4 (UUAGAGUUCAAGUCCCCCAC)、配列番号5 (UAGAGUUCAAGUCCCCCACCC)、配列番号6 (AGAGUUCAAGUCCCCCACCA)、配列番号7 (GUGCUGCGGGGUCUGCGUGC)、配列番号8 (UGCUGCGGGGUCUGCGUGCC)、配列番号9 (GCGCGGGGUCUGCGUGCCCC)、配列番号10 (CUGCGGGGUCUGCGUGCCCCA)、配列番号11 (UGCGGGGUCUGCGUGCCCCAC)、又は配列番号12 (CGGGGUCUGCGUGCCCCACCA)のうちのいずれか1つを有する核酸塩基配列からなる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

200. センス鎖が、配列番号1 (UGCUUAGAGUUCAAGUCCCC)又は配列番号3 (CUUAGAGUUCAAGUCCCCCA)のうちのいずれか1つを有する核酸塩基配列からなる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

201. センス鎖が、配列番号10 (CUGCGGGGUCUGCGUGCCCCA)を有する核酸塩基配列からなる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

10

20

30

40

50

202. アンチセンス鎖が、配列番号13 (GGGACUUGAACUCUAAGCA)、配列番号14 (GGGGACUUGAACUCUAAGC)、配列番号15 (UGGGGACUUGAACUCUAAG)、配列番号16 (GUGGGGACUUGAACUCUAA)、配列番号17 (GGUGGGGACUUGAACUCUA)、配列番号18 (UGGUGGGGACUUGAACUCU)、配列番号19 (GCACGCAGACCCGCAGCAC)、配列番号20 (GGCACGCAGACCCGCAGCA)、配列番号21 (GGGCACGCAGACCCGCAGC)、配列番号22 (UGGGCACGCAGACCCGCAG)、配列番号23 (GUGGGCACGCAGACCCGCAG)、配列番号24 (UGGUGGGCACGCAGACCCGCAG)のうちのいずれか1つを含む核酸塩基配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

10

203. アンチセンス鎖が、配列番号13 (GGGACUUGAACUCUAAGCA)又は配列番号15 (UGGGGACUUGAACUCUAAG)のうちのいずれか1つを含む核酸塩基配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

204. アンチセンス鎖が、配列番号22 (UGGGCACGCAGACCCGCAG)を含む核酸塩基配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

205. アンチセンス鎖が、配列番号13 (GGGACUUGAACUCUAAGCA)、配列番号14 (GGGGACUUGAACUCUAAGC)、配列番号15 (UGGGGACUUGAACUCUAAG)、配列番号16 (GUGGGGACUUGAACUCUAA)、配列番号17 (GGUGGGGACUUGAACUCUA)、配列番号18 (UGGUGGGGACUUGAACUCU)、配列番号19 (GCACGCAGACCCGCAGCAC)、配列番号20 (GGCACGCAGACCCGCAGCA)、配列番号21 (GGGCACGCAGACCCGCAGC)、配列番号22 (UGGGCACGCAGACCCGCAG)、配列番号23 (GUGGGCACGCAGACCCGCAG)、配列番号24 (UGGUGGGCACGCAGACCCGCAG)のうちのいずれか1つを有する核酸塩基配列からなる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

20

206. アンチセンス鎖が、配列番号13 (GGGACUUGAACUCUAAGCA)又は配列番号15 (UGGGGACUUGAACUCUAAG)のうちのいずれか1つを有する核酸塩基配列からなる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

207. アンチセンス鎖が、配列番号22 (UGGGCACGCAGACCCGCAG)を有する核酸塩基配列からなる、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

30

208.

a. センス鎖が、配列番号1を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号13を含む核酸塩基配列を含むか、

b. センス鎖が、配列番号2を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号14を含む核酸塩基配列を含むか、

c. センス鎖が、配列番号3を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号15を含む核酸塩基配列を含むか、

d. センス鎖が、配列番号4を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号16を含む核酸塩基配列を含むか、

40

e. センス鎖が、配列番号5を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号17を含む核酸塩基配列を含むか、

f. センス鎖が、配列番号6を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号18を含む核酸塩基配列を含むか、

g. センス鎖が、配列番号7を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号19を含む核酸塩基配列を含むか、

h. センス鎖が、配列番号8を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号20を含む核酸塩基配列を含むか、

i. センス鎖が、配列番号9を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号

50

号 2 1 を含む核酸塩基配列を含むか、

j . センス鎖が、配列番号 1 0 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 2 2 を含む核酸塩基配列を含むか、

k . センス鎖が、配列番号 1 1 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 2 3 を含む核酸塩基配列を含むか、又は

l . センス鎖が、配列番号 1 2 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 2 4 を含む核酸塩基配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

2 0 9 .

a . センス鎖が、配列番号 1 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 1 3 を含む核酸塩基配列を含むか、又は

b . センス鎖が、配列番号 3 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 1 5 を含む核酸塩基配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

2 1 0 .

a . センス鎖が、配列番号 1 0 を含む核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 2 2 を含む核酸塩基配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

2 1 1 .

a . センス鎖が、配列番号 1 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 1 3 からなる核酸塩基配列を含むか、

b . センス鎖が、配列番号 2 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 1 4 からなる核酸塩基配列を含むか、

c . センス鎖が、配列番号 3 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 1 5 からなる核酸塩基配列を含むか、

d . センス鎖が、配列番号 4 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 1 6 からなる核酸塩基配列を含むか、

e . センス鎖が、配列番号 5 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 1 7 からなる核酸塩基配列を含むか、

f . センス鎖が、配列番号 6 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 1 8 からなる核酸塩基配列を含むか、

g . センス鎖が、配列番号 7 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 1 9 からなる核酸塩基配列を含むか、

h . センス鎖が、配列番号 8 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 2 0 からなる核酸塩基配列を含むか、

i . センス鎖が、配列番号 9 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 2 1 からなる核酸塩基配列を含むか、

j . センス鎖が、配列番号 1 0 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 2 2 からなる核酸塩基配列を含むか、

k . センス鎖が、配列番号 1 1 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 2 3 からなる核酸塩基配列を含むか、又は

l . センス鎖が、配列番号 1 2 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 2 4 からなる核酸塩基配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

2 1 2 .

a . センス鎖が、配列番号 1 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 1 3 からなる核酸塩基配列を含むか、又は

b . センス鎖が、配列番号 3 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 1 5 からなる核酸塩基配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

10

20

30

40

50

2 1 3 .

a. センス鎖が、配列番号 1 0 からなる核酸塩基配列を含み、アンチセンス鎖が、配列番号 2 2 からなる核酸塩基配列を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子。

2 1 4 . いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子と、コンジュゲート基と、を含む、化合物。

2 1 5 . コンジュゲート基が、1 つ以上の炭水化物を含む、実施形態 2 1 4 に記載の化合物。

2 1 6 . コンジュゲート基が、単糖、二糖、三糖、四糖、オリゴ糖、多糖、修飾多糖、マンノース、ガラクトース、マンノース誘導体、ガラクトース誘導体、D-マンノピラノース、L-マンノピラノース、D-アラビノース、L-ガラクトース、D-キシロフラノース、L-キシロフラノース、D-グルコース、L-グルコース、D-ガラクトース、L-ガラクトース、 α -D-マンノフラノース、 β -D-マンノフラノース、 α -D-マンノピラノース、 β -D-マンノピラノース、 α -D-グルコピラノース、 β -D-グルコピラノース、 α -D-グルコフラノース、 β -D-グルコフラノース、 α -D-フルクトフラノース、 α -D-フルクトピラノース、 α -D-ガラクトピラノース、 β -D-ガラクトピラノース、 α -D-ガラクトフラノース、 β -D-ガラクトフラノース、グルコサミン、シアル酸、 α -D-ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、2-アミノ-3-O-[(R)-1-カルボキシエチル]-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース、2-デオキシ-2-メチルアミノ-L-グルコピラノース、4, 6-ジデオキシ-4-ホルムアミド-2, 3-ジ-O-メチル-D-マンノピラノース、2-デオキシ-2-スルホアミノ-D-グルコピラノース、N-グリコロイル- α -ノイラミン酸、5-チオ- β -D-グルコピラノース、メチル 2, 3, 4-トリ-O-アセチル-1-チオ-6-O-トリチル- α -D-グルコピラノシド、4-チオ- β -D-ガラクトピラノース、エチル 3, 4, 6, 7-テトラ-O-アセチル-2-デオキシ-1, 5-ジチオ- α -D-グルコ-ヘプトピラノシド、2, 5-アンヒドロ-D-アロノニトリル、リボース、D-リボース、D-4-チオリボース、L-リボース、又は L-4-チオリボースを含む、実施形態 2 1 4 又は 2 1 5 に記載の化合物。

2 1 7 . コンジュゲート基が、センス鎖の 3' 末端に連結されている、実施形態 2 1 4 ~ 2 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

2 1 8 . コンジュゲート基が、センス鎖の 5' 末端に連結されている、実施形態 2 1 4 ~ 2 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

2 1 9 . コンジュゲート基が、アンチセンス鎖の 5' 末端に連結されている、実施形態 2 1 4 ~ 2 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

2 2 0 . コンジュゲート基が、アンチセンス鎖の 3' 末端に連結されている、実施形態 2 1 4 ~ 2 1 6 のいずれか 1 つに記載の化合物。

2 2 1 . 少なくとも 1 つのヌクレオシドが、修飾糖を含む、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子又は化合物。

2 2 2 . 少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合が、修飾されたヌクレオシド間結合である、いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子又は化合物。

2 2 3 . 修飾されたヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合である、実施形態 2 2 2 に記載の二本鎖リボ核酸分子又は化合物。

2 2 4 . 1 ~ 1 5 個のホスホロチオエート又はホスホロジチオエートヌクレオシド間結合を含む、実施形態 2 2 2 又は 2 2 3 に記載の二本鎖リボ核酸分子又は化合物。

2 2 5 . いずれかの先行実施形態に記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物又はその塩と、薬学的に許容される担体又は希釈剤のうちの少なくとも 1 つと、を含む、組成物。

2 2 6 . 実施形態 1 ~ 2 2 4 のいずれかに記載の二本鎖リボ核酸分子又は化合物を含む、プロドラッグ。

10

20

30

40

50

227. GNAQ及び／又はGNA11におけるバリエーションに関連する又はそれによって駆動される疾患又は障害を有する患者を治療する方法であって、バリエーションGNAQ及び／又はGNA11アレルを特異的に標的化する化合物又は組成物を患者に投与することを含む、方法。

228. GNAQ及び／又はGNA11におけるバリエーションに関連する又はそれによって駆動される疾患又は障害を有する患者を治療する方法であって、実施形態1～224のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、実施形態225に記載の組成物、又は実施形態226に記載のプロドラッグを患者に投与することを含む、方法。

229. スタージ・ウェーバー症候群（SWS）、色素血管母斑症（PPV）、又は広範囲皮膚黒色症（EDM）を有する患者を治療する方法であって、実施形態1～224のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、実施形態225に記載の組成物、又は実施形態226に記載のプロドラッグを患者に投与することを含む、方法。

230. がんを有する患者を治療する方法であって、実施形態1～224のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、実施形態225に記載の組成物、又は実施形態226に記載のプロドラッグを患者に投与することを含む、方法。

231. がんが、以下：副腎がん、自律神経節がん、胆道がん、骨がん、乳がん、中枢神経系がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、眼がん、卵管がん、女性性器がん、胃腸管がん、生殖器がん、造血がん、リンパ系がん、腎臓がん、大腸がん、肝臓がん、肺がん、髄膜がん、NSがん、食道がん、卵巣がん、脾臓がん、副甲状腺がん、陰茎がん、会陰がん、腹膜がん、下垂体がん、胎盤がん、胸膜がん、前立腺がん、唾液腺がん、皮膚がん、小腸がん、軟部組織がん、胃がん、精巣がん、胸腺がん、甲状腺がん、上気道消化管がん、尿路がん、子宮付属器がん、膣がん、及び外陰がん、からなるリストから選択される、実施形態230に記載の方法。

232. 黒色腫を有する患者を治療する方法であって、実施形態1～224のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、実施形態225に記載の組成物、又は実施形態226に記載のプロドラッグを患者に投与することを含む、方法。

233. 医薬として使用するための、実施形態1～224のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、実施形態225に記載の組成物、又は実施形態226に記載のプロドラッグ。

234. スタージ・ウェーバー症候群（SWS）、色素血管母斑症（PPV）、又は広範囲皮膚黒色症（EDM）の治療を必要とする患者におけるスタージ・ウェーバー症候群（SWS）、色素血管母斑症（PPV）、又は広範囲皮膚黒色症（EDM）を治療する方法で使用するための、実施形態1～224のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、実施形態225に記載の組成物、又は実施形態226に記載のプロドラッグであって、方法が、実施形態1～224のいずれか1つに記載の化合物、実施形態225に記載の組成物、又は実施形態226に記載のプロドラッグを患者に投与することを含む、実施形態1～224のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、実施形態225に記載の組成物、又は実施形態226に記載のプロドラッグ。

235. がんの治療を必要とする患者におけるがんを治療する方法で使用するための、実施形態1～224のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、実施形態225に記載の組成物、又は実施形態226に記載のプロドラッグであって、方法が、実施形態1～224のいずれか1つに記載の化合物、実施形態225に記載の組成物、又は実施形態226に記載のプロドラッグを患者に投与することを含む、実施形態1～224のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、実施形態225に記載の組成物、又は実施形態226に記載のプロドラッグ。

236. 黒色腫の治療を必要とする患者における黒色腫を治療する方法で使用するための、実施形態1～224のいずれか1つに記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、実施形態225に記載の組成物、又は実施形態226に記載のプロドラッグであって、方法が、実施形態1～224のいずれか1つに記載の化合物、実施形態225に記載の組成物、又は実施形態226に記載のプロドラッグを患者に投与することを含む、実施形態1

10

20

30

40

50

～ 2 2 4 のいずれか 1 つに記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、実施形態 2 2 5 に記載の組成物、又は実施形態 2 2 6 に記載のプロドラッグ。

2 3 7. スタージ・ウェーバー症候群 (SWS)、色素血管母斑症 (PPV)、又は広範囲皮膚黒色症 (EDM) を有する患者を治療する方法であって、GNAQ 及び／又は GNA11 のバリエーションアレルを特異的に標的化する化合物又は組成物を患者に投与することを含む、方法。

2 3 8. がんを有する患者を治療する方法であって、GNAQ 及び／又は GNA11 のバリエーションアレルを特異的に標的化する化合物又は組成物を患者に投与することを含む、方法。

2 3 9. 黒色腫を有する患者を治療する方法であって、GNAQ 及び／又は GNA11 のバリエーションアレルを特異的に標的化する化合物又は組成物を患者に投与することを含む、方法。

2 4 0. 黒色腫が、ブドウ膜黒色腫、皮膚黒色腫、又は髄膜悪性腫瘍である、実施形態 2 3 9 に記載の方法。

2 4 1. GNAQ のバリエーションアレルが、R183Q 置換を引き起こす変異を含む、実施形態 2 3 7 ～ 2 3 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

2 4 2. GNA11 のバリエーションアレルが、R183C 置換を引き起こす変異を含む、実施形態 2 3 7 ～ 2 3 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

2 4 3. GNAQ 及び／又は GNA11 のバリエーションアレルを特異的に標的化する化合物又は組成物が、インビトロでのバリエーション GNAQ 又はバリエーション GNA11 の発現を少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、又は好ましくは少なくとも 90% 阻害することができる、実施形態 2 3 7 ～ 2 4 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

2 4 4. GNAQ 及び／又は GNA11 のバリエーションアレルを特異的に標的化する化合物又は組成物が、バリエーション GNAQ 又はバリエーション GNA11 を発現する細胞における異常なカルシウムシグナル伝達を部分的又は完全に救済することができる、実施形態 2 3 7 ～ 2 4 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

2 4 5. 実施形態 1 ～ 2 2 4 のいずれか 1 つに記載の二本鎖リボ核酸分子又は化合物をコードする核酸分子を含む、発現構築物。

2 4 6. 実施形態 1 ～ 2 2 4 のいずれか 1 つに記載の二本鎖リボ核酸分子又は化合物をコードする、単離された核酸分子。

2 4 7. 実施形態 2 4 6 に記載の単離された核酸分子を含む、ベクター。

2 4 8. ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、発現カセット、又はプラスミドである、実施形態 2 4 7 に記載のベクター。

2 4 9. RNA ポリメラーゼ III 又は RNA ポリメラーゼ III プロモーターを更に含む、実施形態 2 4 7 又は 2 4 8 に記載のベクター。

2 5 0. RNA ポリメラーゼ III プロモーターが、U6 又は H1 プロモーターである、実施形態 2 4 9 に記載のベクター。

2 5 1. 実施形態 1 ～ 2 2 4 のいずれか 1 つに記載の二本鎖リボ核酸分子若しくは化合物、実施形態 2 4 6 に記載の単離された核酸分子、又は実施形態 2 4 7 ～ 2 5 0 のいずれか 1 つに記載のベクターを含む、宿主細胞。

2 5 2. 哺乳動物宿主細胞である、実施形態 2 5 1 に記載の宿主細胞。

2 5 3. ヒト宿主細胞である、実施形態 2 5 1 又は 2 5 2 に記載の宿主細胞。

2 5 4. 二本鎖核酸分子、化合物、組成物、又はプロドラッグが、脂質ベースのナノ粒子、リポソーム、エクソソーム、高分子ナノ粒子、無機ナノ粒子、又はルキソリチニブとサリドマイドとの同時送達高分子電解質ナノ複合体 (RTNP) による送達のために製剤化される、実施形態 1 6 4 ～ 2 4 4 のいずれか 1 つに記載の使用のための、方法、又は二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ。

2 5 5. 二本鎖核酸分子、化合物、組成物、又はプロドラッグが、脂質ベースのナノ粒子による送達のために製剤化される、実施形態 1 6 4 ～ 2 4 4 のいずれか 1 つに記載の

10

20

30

40

50

使用のための、方法、又は二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ。

256. 二本鎖核酸分子、化合物、組成物、又はプロドラッグが、ドコサン酸（DCA）にコンジュゲートされる、実施形態164～244のいずれか1つに記載の使用のための、方法、又は二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ。

257. 二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグが、送達（ジムノティック送達）のためにパッケージングされていない、実施形態164～244のいずれか1つに記載の使用のための、方法、又は二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ。

258. 二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグが、注射によって投与される、実施形態164～244又は254～257のいずれか1つに記載の使用のための、方法、又は二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ。

259. 二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグが、マイクロニードルを使用して注射される、実施形態164～244又は254～258のいずれか1つに記載の使用のための、方法、又は二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ。

260. 二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグが、脂質ベースのナノ粒子による送達のために製剤化され、マイクロニードルを使用して注射される、実施形態164～244又は254～259のいずれか1つに記載の使用のための、方法、又は二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ。

261. 二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグが、ドコサン酸（DCA）にコンジュゲートされ、マイクロニードルを使用して注射される、実施形態164～244又は254～260のいずれか1つに記載の使用のための、方法、又は二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ。

262. 核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグが、局所投与される、実施形態164～244又は254～261のいずれか1つに記載の使用のための、方法、又は二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ。

263. 投与が、エレクトロポレーション又は超音波を更に含む、実施形態164～244又は254～262のいずれか1つに記載の使用のための、方法、又は二本鎖核酸分子、化合物、組成物、プロドラッグ。

【0295】

参考文献

[1] Hasegawa Y, Yasuhara, M. A variant of phakomatosis pigmentovascularis. Skin Research 1979; 21: 178-86.

[2] Happle R. Phacomatosis pigmentovascularis revisited and reclassified. Archives of dermatology 2005; 141: 385-8.

[3] Comi AM. Sturge-Weber syndrome and epilepsy: an argument for aggressive seizure management in these patients. Expert Rev Neurother 2007; 7: 951-6.

[4] Shirley MD, Tang H, Gallione CJ, et al. Sturge-Weber syndrome and port-wine stains caused by somatic mutation in GNAQ. N Engl J Med 2013; 368: 1971-9.

[5] Thomas AC, Zeng Z, Riviere JB, et al. Mosaic Activating Mutations in GNA11 and GNAQ Are Associated with Phacomatosis Pigmentovascularis and Extensive Dermal Melanocytosis. The Journal of investigative dermatology 2016; 136 (4): 770-8.

[6] Jordan M, Carmignac V, Sorlin A, et al

l. Reverse Phenotyping in Patients with Skin Capillary Malformations and Mosaic GNAQ or GNA11 Mutations Defines a Clinical Spectrum with Genotype-Phenotype Correlation. The Journal of investigative dermatology 2020;140:1106-10 e2.

[7] Polubothu S, Al-Olabi L, Carmen Del B oente M, et al. GNA11 Mutation as a Cause of Sturge-Weber Syndrome: Expansion of the Phenotypic Spectrum of Galpha/11 Mosaicism and the Associated Clinical Diagnoses. The Journal of investigative dermatology 2020;140:1110-3.

[8] Huang L, Couto JA, Pinto A, et al. Somatic GNAQ Mutation is Enriched in Brain Endothelial Cells in Sturge-Weber Syndrome. Pediatr Neurol 2017;67:59-63.

[9] Waelchli R, Aylett SE, Robinson K, Chong WK, Martinez AE, Kinsler VA. New vascular classification of port-wine stains: improving prediction of Sturge-Weber risk. Br J Dermatol 2014;171:861-7.

[10] Ayturk UM, Couto JA, Hann S, et al. Somatic Activating Mutations in GNAQ and GNA11 Are Associated with Congenital Hemangioma. American journal of human genetics 2016;98:789-95.

[11] Lim YH, Bacchiocchi A, Qiu J, et al. GNA14 Somatic Mutation Causes Congenital and Sporadic Vascular Tumors by MAPK Activation. American journal of human genetics 2016;99:443-50.

[12] Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. Nucleic acids research 2015;43:D805-11.

[13] Zhou J, Azizan EAB, Cabrera CP, et al. Somatic mutations of GNA11 and GNAQ in CTNNB1-mutant aldosterone-producing adenomas presenting in puberty, pregnancy or menopause. Nature genetics 2021;53:1360-72.

[14] Nesbit MA, Hannan FM, Howles SA, et al. Mutations affecting G-protein subunit alpha11 in hypercalcemia and hypocalcemia. The New England journal of medicine 2013;368:2476-86.

[15] Wetteschureck N, Lee E, Libutti SK, Offermanns S, Robey PG, Spiegel AM. Parathyroid-specific double knockout of Gq and

10

20

30

40

50

d G11 α -subunits leads to a phenotype resembling germline knockout of the extracellular Ca^{2+} -sensing receptor. *Mol Endocrinol* 2007;21:274-80.

[16] Nesbit MA, Hannan FM, Howles SA, et al. Mutations affecting G-protein subunit $\alpha 11$ in hypercalcemia and hypocalcemia. *N Engl J Med* 2013;368:2476-86.

[17] Fjaer R, Marciniak K, Sundnes O, et al. A novel somatic mutation in GNB2 provides new insights to the pathogenesis of Sturge-Weber syndrome. *Human molecular genetics* 2021;30:1919-31.

[18] Gorvin CM, Hannan FM, Howles SA, et al. $\alpha 11$ mutation in mice causes hypocalcemia rectifiable by calcilytic therapy. *JCI Insight* 2017;2:e91103.

[19] Weber FP. Right-sided hemi-hypotrophy resulting from right-sided congenital spastic hemiplegia, with a morbid condition of the left side of the brain, revealed by radiograms. *J Neurol Psychopathol* 1922;3:134-9.

[20] Mitchell RH. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta* 1975;415:81-47.

[21] Mitchell RH, Kirk CJ, Jones LM, Downes CP, Creba JA. The stimulation of inositol lipid metabolism that accompanies calcium mobilization in stimulated cells: defined characteristics and unanswered questions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1981;296:123-38.

[22] Hart, Multifunctional nanocomplexes for gene transfer and gene therapy. *Cell Biol Toxicol.* 2010 Feb;26(1):69-81. doi:10.1007/s10565-009-9141-y. Epub 2010 Feb 3.

[23] Jung Hyeon Cho, Jeong Yi Kang, Seulgi Kim, Hwi Ra Baek, Junoh Kim, Kwang-Suk Jang, Jin Woong Kim. Skin protein-derived peptide-conjugated vesicular nanocargos for selected skin cell targeting and consequent activation. *J Mater Chem B.* 2021 Jun 23;9(24):4956-4962. doi:10.1039/d1tb00935d

[24] Qi Tang, Jacquelyn Sousa, Dimas Echeverria, Xueli Fan, Ying-Chao Hsueh, Khashayar Afshari, Nicholas MeHugh, David A. Cooper, Lorenc Vangjeli, Kathryn Monopoli, Ken Okamura, Annabelle Biscans, Ada

10

20

30

40

50

m Clauss, John E. Harris, Anastasia Khvorova, RNAi-based modulation of IFN- γ signaling in skin, *Molecular Therapy*, Volume 30, Issue 8, 2022, Pages 2709–2721.

[25] Day AM, Hammill AM, Juhasz C, et al. Hypothesis: Presymptomatic treatment of Sturge-Weber Syndrome With Aspirin and Antiepileptic Drugs May Delay Seizure Onset. *Pediatric neurology* 2019;90:8–12.

[26] Guseo A. Ultrastructure of calcification in Sturge-Weber Disease. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1975;366:353–6.

[27] Di Trapani G, Di Rocco C, Abbamondi AL, Caldarelli M, Pocchiari M. Light microscopy and ultrastructural studies of Sturge-Weber disease. *Childs Brain* 1982;9:23–36.

[28] Lin DD, Barker PB, Hatfield LA, Comi AM. Dynamic MR perfusion and proton MR spectroscopic imaging in Sturge-Weber syndrome: correlation with neurological symptoms. *J Magn Reson Imaging* 2006;24:274–81.

[29] Kelley TM, Hatfield LA, Lin DD, Comi AM. Quantitative analysis of cerebral cortical atrophy and correlation with clinical severity in unilateral Sturge-Weber syndrome. *J Child Neurol* 2005;20:867–70.

[30] Pilli VK, Behen ME, Hu J, et al. Clinical and metabolic correlates of cerebral calcifications in Sturge-Weber syndrome. *Developmental medicine and child neurology* 2017;59:952–8.

[31] Waelchli R, Williams J, Cole T, et al. Growth and hormone profiling in children with congenital melanocytic naevi. *The British journal of dermatology* 2015;173:1471–8.

[32] Cooper MS, Gittos NJ. Diagnosis and management of hypocalcaemia. *BMJ* 2008;336:1298–302.

[33] Gerasimenko JV, Gryshchenko O, Ferdiek PE, et al. Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel blockade as a potential tool in antipancreatitis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:13186–91.

[34] Kinsler VA, Boccara O, Fraitag S, Torrello A, Vabres P, Diociauti A. Mosaic abnormalities of the skin – review and guidelines from the European Reference Network for rare skin diseases (ERN-Skin). *The*

10

20

30

40

50

British journal of dermatology 2019.

[35] Happle R. Lethal genes surviving by mosaicism: a possible explanation for sporadic birth defects involving the skin. Journal of the American Academy of Dermatology 1987;16:899-906.

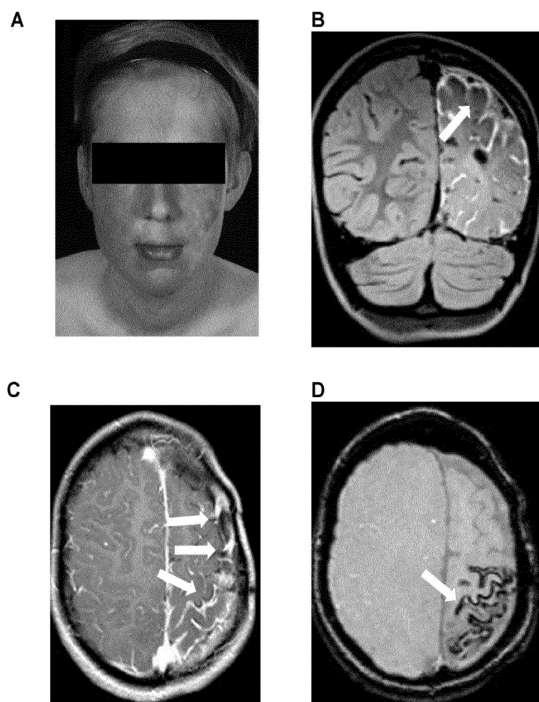
[36] Schrage R, Schmitz AL, Gaffal E, et al. The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes. Nat Commun 2015;6:10156.

[37] Korhonen H, Fisslthaler B, Moers A, et al. Anaphylactic shock depends on endothelial Gq/G11. J Exp Med 2009;206:411-20.

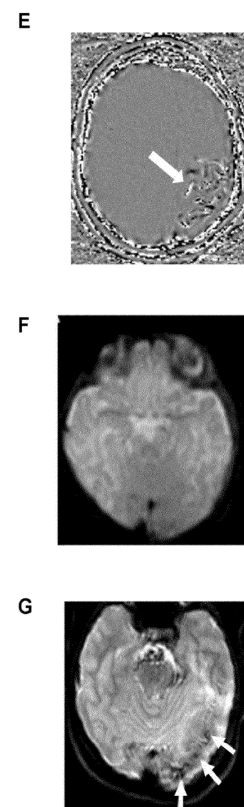
[38] I. Arnaoutova, H. K. Kleinman, In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. Nat Protoc 5, 628-635 (2010).

【図面】

【図1-1】



【図1-2】



10

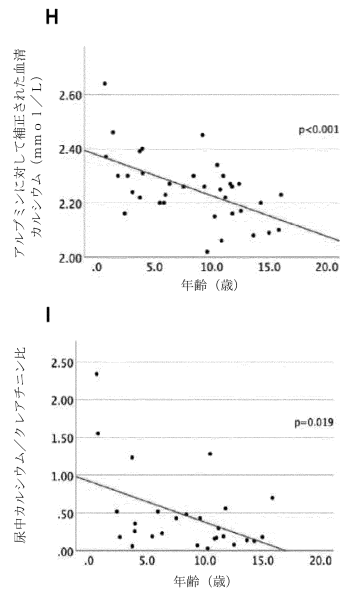
20

30

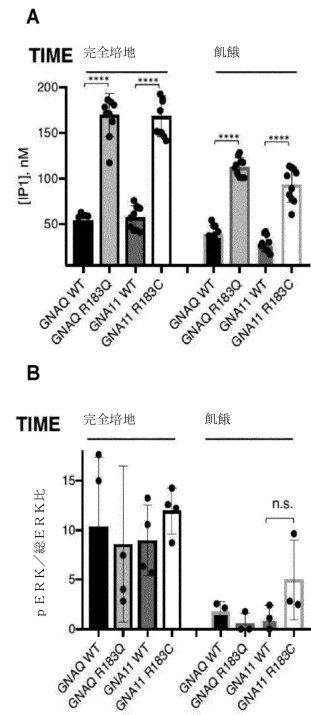
40

50

【図 1 - 3】



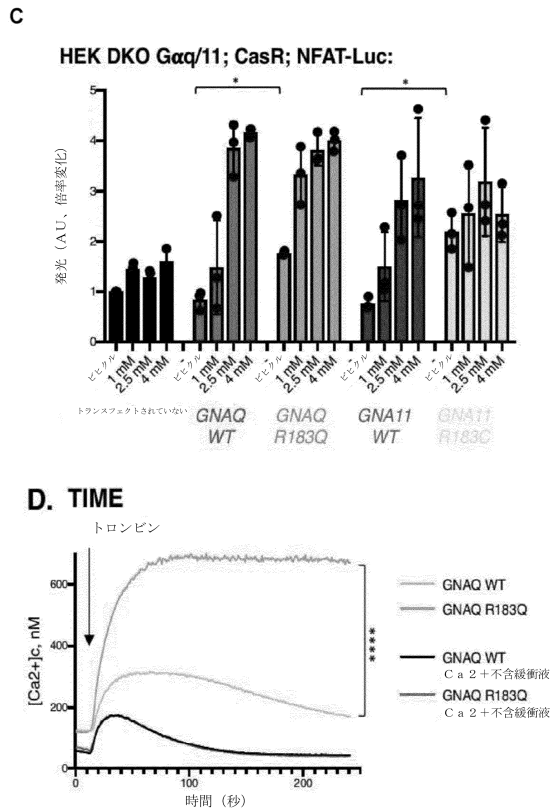
【図 2 - 1】



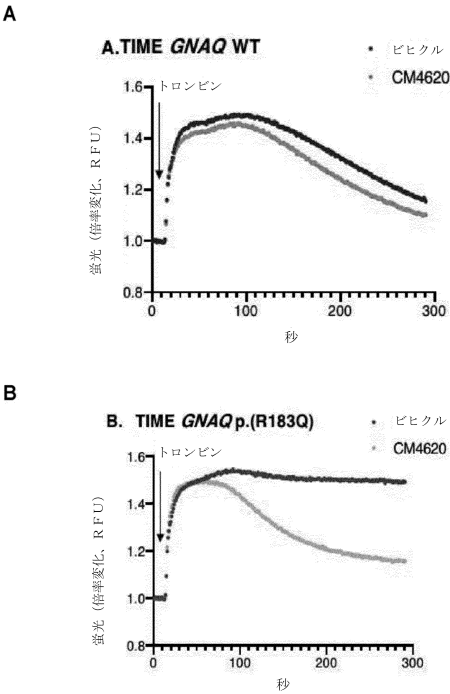
10

20

【図 2 - 2】



【図 3 - 1】

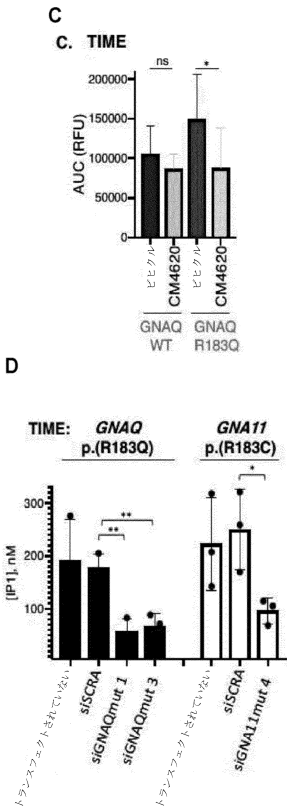


30

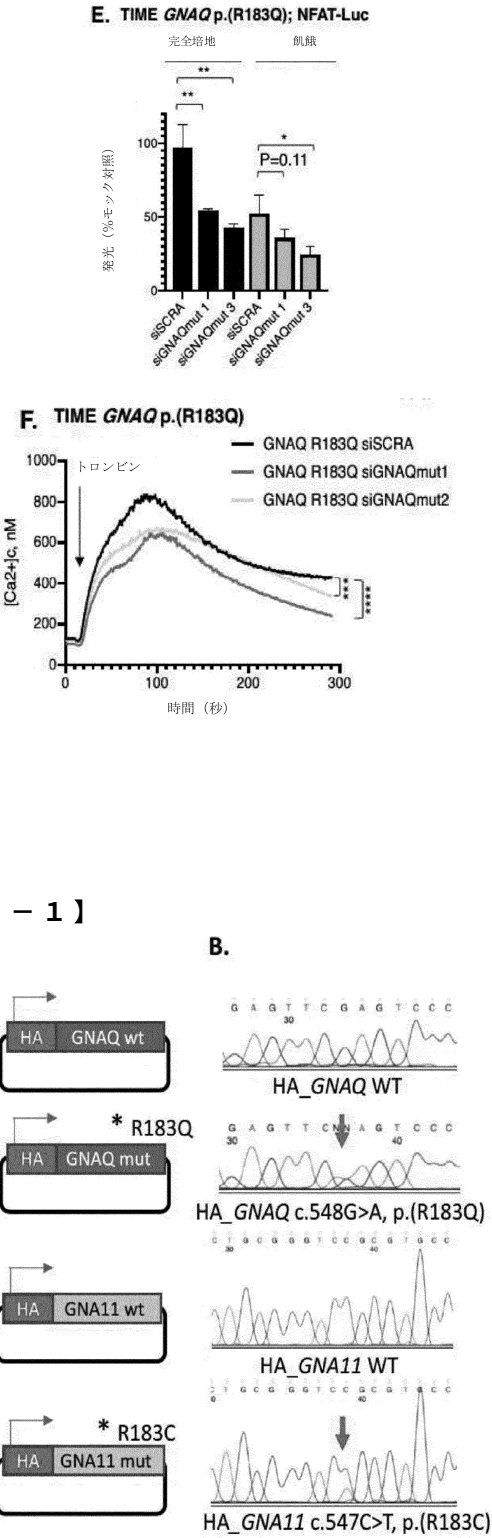
40

50

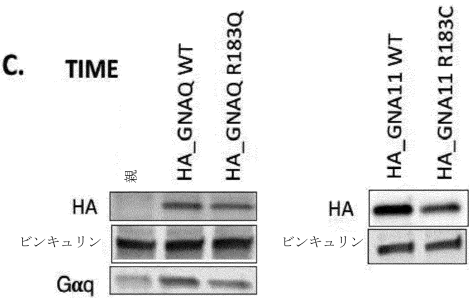
【図 3 - 2】



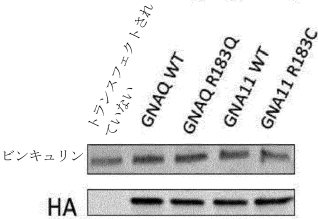
【図 3 - 3】



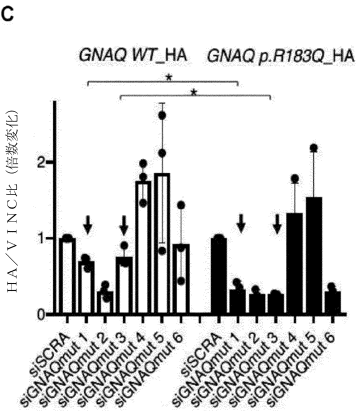
【図 4 - 2】



D. HEK DKO Gαq/11; CasR; NFAT-Luc:



【図 5 - 2】



D

標的: c.547C>T
AGCAGGACGTGCTGCGGGTCTGCGTGCCACACCGGCATCATCGAGTACCT

siRNA.1..... GTGCTGCGGGTCTGCGTGC

siRNA.2..... TGCTGCGGGTCTGCGTGCC

siRNA.3..... GCTGCGGGTCTGCGTGCCC

siRNA.4..... CTGCGGGTCTGCGTGCCCA

siRNA.5..... TGC GG TCTGCGTGCCAC

siRNA.6..... CGGGTC T GCGTGCCACCA

【図 5 - 1】

A

標的: c.548G>A
ACAAGATGTGCTTAGAGTTCAAGTCCCCACACAGGGATCATCGAAT

siRNA.1..... TGCTTAGAGTTCAAGTCCC

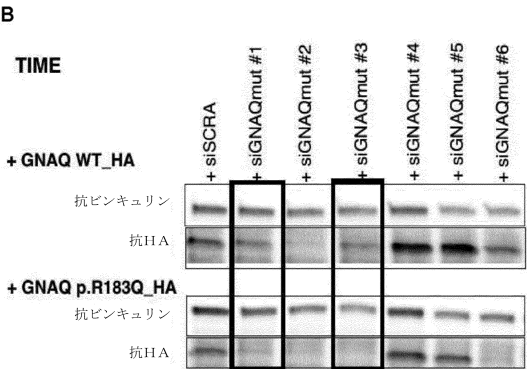
siRNA.2..... GCTTAGAGTTCAAGTCCCC

siRNA.3..... CTTAGAGTTCAAGTCCCCA

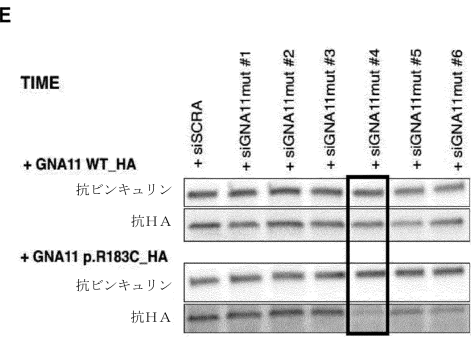
siRNA.4..... TTAGAGTTCAAGTCCCCAC

siRNA.5..... TAGAGTTCAAGTCCCCACC

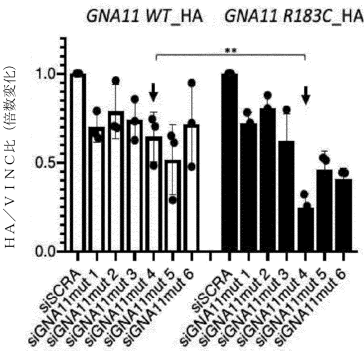
siRNA.6..... AGAGTTCAAGTCCCCACCA



【図 5 - 3】



F



10

20

30

40

50

【図 6-1】

[illegible]

【圖 6-2】

患者番号	性別	年齢、歳	皮膚病の特徴	神経学的特徴	眼科的特徴	脳のMRI検査 異常	肺のMRI検査 肺の生検 (後)	最新の脳MRI / 所見	イソシ化カル シウム	PMH
6	M	2.7	顔面 (両眼、眼を含み) の毛細血管畸形	なし	左生眼症 (左瞳孔閉鎖、黄斑萎縮)	-	0.03	顕著な左大脳後質及び後頭動脈管	正常	正常
7	F	11.0	顔面 (両眼、眼を含み) の毛細血管畸形、血管炎発作	発作、左片頭痛、頭部血管痛、左片頭痛、ADHD、及び言語障害	両側瞳孔障	脊髄神経症候群、左片頭痛、左の片側一過性 (僅つて一過性) の血管病変を伴わない	1.9	下部頸動脈の閉塞を伴う右大脳後質動脈の狭窄、右大脳後質動脈、及び左後頭動脈の血管壁肥厚	-	正常
8	M	1.9	顔面 (両眼、眼を含み) の毛細血管畸形、血管炎発作、毛細血管	発作、頸部と顔面に繰り返す血管炎、正常な発達	正常	脊髄神経症候群	1.7	前頭葉での閉塞を伴う右大脳後質動脈の狭窄、及び左側動脈管狭窄と大脳中動脈	正常	正常
9	F	11.8	顔面 (両眼、眼を含み)、頭部、及び上半身体幹の毛細血管奇形	発作、右片頭痛、頭痛、知的障害、自閉症、ADHD、及び言語障害	左瞳孔閉鎖	頸動脈拡張	9.6	下位大脳後質動脈及び後頭動脈の発出静脈を伴う左片大脳の後頭動脈管狭窄。	低	正常

【圖 6-3】

患者番号 (性別)	年齢 歳	皮膚病特徴	神経学的特徴	眼科的特徴	他の臨床特 徴の提示 反	検査のBMLH1 中の年齢 (歳)	最新の間隔MR T1 所見	イオン化カル シウム	PH
10	M	11.6	左側の毛細血管奇形 に血管病変又は色素 病変がない	発疹、右片側麻、頭 部、四肢、及び 面、ADHD、及び 言語障害	正常	7.7	下位実質体梗塞欠を伴う左半球の軟 化病変、左側頭葉の皮質の萎縮、 増大、皮質シナプスの変化及び神経病 変	正常	正常
11	M	15.0	左側の骨突出、皮膚病 に血管病変又は色素 病変がない	発疹、頭痛、不眠、 正常な発達	-	15.0	下位実質体梗塞欠及び頭頂右石化を 伴う左側頭葉、頭頂葉、及び後頭葉 の軟化病変、頭頂葉に左側頭葉の病変 の提示と右側頭葉で進行	低	正常
12	M	12.4	顔面 (左側、髪び下 唇) の毛細血管奇形	発疹、発達遅延、及 社会的コミュニケーション障害	-	0.3	下位実質体梗塞欠を伴う左側頭葉及 び後頭葉の軟化病変、側頭葉 非特発	-	正常
13	F	9.2	顔面 (右側、髪を合 併、及び下 唇) の毛細血管奇形	発疹、四肢の片側麻 痺、及び言語障害	小頭症	6.5	石化を伴う前頭葉右側頭葉及び左 側頭葉の軟化病変、左側頭葉の軟化 病変、左側頭葉の軟化病変、側頭葉 頭蓋骨の肥厚と顕著な後部DVA (主に右側)	正常	正常
14	F	9.4	左側の毛細血管奇形	発疹、右片側麻、知 覚過敏、ADHD、 及び言語障 害	-	9.4	下位実質体梗塞欠及び頭頂右石化を 伴う左側頭葉、頭頂葉、及び後頭 葉の軟化病変、頭頂葉に左側頭葉 の軟化病変、側頭葉	低	正常

【圖 6-4】

患者番号	性別	年齢、歳	皮膚病の特徴	神経学的特徴	眼科的特徴	他の臨床所見	経頭蓋ドプラー（顔面動脈）	最新の頸動脈（CAR）所見	イオン化カルシウム	PH
15	M	11.8	顔面（左眼、額を含む）、頭髪、身体、及び四肢の過覚覚を伴う毛細血管奇形	発作、四肢の動作麻痺、及び知覚障害	両眼瞼内障	神経運動症、左股関節形成不全及び膝蓋骨の欠損を伴う毛細血管奇形（を伴う）	9.6	利用可能な画像がない	正常	正常
16	M	1.4	額（両側）及び頭頂の毛細血管奇形	発作、右片麻痺、及び覚醒障害	両側（LOP）の上昇		1.6	石灰化を伴う頭頂及び右前頭葉の両方の軟膜側血管腫。顔面、左前頭、中腹、右中腹に沿った顕著な線状静脈、顔面葉の両側の拡大	-	-
17	F	4.0	顔面（左眼、額を含む）、頭髪、及び頭部の毛細血管奇形	なし	視野欠損	-	0.4	左後頭葉の軟膜側血管腫、左網膜血管の拡大	正常	正常
18	F	0.7	右側の毛細血管奇形	発作、右片麻痺、及び覚醒障害	正常	低酸素血	0.7	下位室管膜増大及び頭頂右房を伴う右頭頂及び前頭葉の軟膜側血管腫、右網膜血管の拡大	正常	高
19	M	10.9	顔面（左眼、額を含む）、身体、及び四肢の過覚覚を伴う毛細血管奇形	発作、腹中棘痛エピソード、知覚障害、自閉的な行動傾向、及び言語障害	左斜内障	-	10.8	頭頂葉、顔面葉、及び後頭葉の軟膜側血管腫、左網膜血管の拡大、右頭頂及び前頭葉の軟膜側血管腫、右頭頂及び前頭葉の軟膜側血管腫の拡大	低	正常

【圖 6-3】

【圖 6-4】

【圖 6-5】

患者番号	性別	年齢、歳	成癆の特徴	神経症状の特徴	眼科的特徴	他の臨床所見	最新のBMR I 時の年齢(歳)	BMR I 所見	PTH
20	M	10.8	顔面(両側、額を含む)の毛細血管奇形。頭部のファースト度。	発作及び頭痛、不安定な変量	左斜視	眼瞼、黒点状色素斑、及び虹彩脱離、及び虹彩性色素斑形成した網膜灰質性色素斑、石炭化	7.8	右乳岩骨軟組織及びび類固石灰化を伴う右乳岩骨の軟組織血管腫、肥大した軟組織及びびVNAに拘びる左側の大きい腫外殻肺動脈	正常
21	M	5.5	顔面(左側、額を含む)、頤部、及び上唇体体の毛細血管奇形	顔面、左片頭痛、知覚障害、自閉症、及びADHD	正常	-	3.7	大きなDVVAを伴う左小脳半球の軟組織血管腫	正常
22	M	11.2	右側の毛細血管奇形	発作、左片頭痛、知覚障害、自閉症、及びADHD	右斜視と及び左斜視、平首	神経同位症	6.8	石灰化を伴う右半球の軟組織血管腫、右大脳半球の微小低吸収した囊胞性白質軟化病を伴う右半球の半肢切断術の後、	正常
23	M	13.7	顔面(両側、額を含む)の毛細血管奇形	発作、顔面中線エピソード、頭痛、知的障害、及び言語障害	右斜視と左斜視	-	10.5	顔面石灰化を伴う右前頭葉の軟組織血管腫	減
24	F	10.3	顔面(両側、額を含む)の毛細血管奇形。頤部、上唇体、及び四肢の遠端長を伴う毛細血管奇形	頭痛、知的障害、及び言語障害	左斜視	-	7.1	右前頭葉、後面葉、頤部、四肢、及び膝関節大脳の軟組織血管腫、テラント上及びポイント下区面の複数のDVNA	正常

【圖 6-6】

患者番号	性別	年齢、 歳	皮膚病の特徴	神経学的特徴	眼病的特徴	他の臨床的 所見 (歳)	最重の眼MR I 所見 (歳)	PTH
25	F	9.6	顔面 (両側、額を 含む)、四肢、 及び背の四肢末 節に毛細血管奇 形	発作、左片麻痺、 失音、失用、 記憶障害、及び 失読症	正常	-	6.4	正常
26	F	6.00	顔面 (両側、額を 含む)、四肢、 及び背の四肢末 節に毛細血管奇 形	発作、左片麻痺、 記憶障害、及び 失読症	右側小脳	-	5.9	正常
27	F	2.4	右側の毛細血管奇 形	発作、失音、記憶 障害	正常	-	2.4	高
28*	F	10.5	顔面 (両側、額を 含む)、四肢、及 び四肢の四肢末 節に毛細血管奇 形	なし	右虹彩黄色症、右 10Dの上昇	肺の圧さの 不一致 (皮 膚を触ると 血管を叩く う)	6.7	正常
29	M	5.9	顔面 (右側、額を 含む)、四肢、及 び四肢の四肢末 節に毛細血管奇 形	学習障害、自閉 症	正常	肺の圧さの 不一致 (皮 膚を触ると 血管を叩く う)	0.9	正常

【圖 6-7】

患者番号	性別	年齢、歳	成癥の特徴	神経学的特徴	眼筋の異常徴	嚙の臨床所見 時の年齢（歳）	最新の脳MR I 時の年齢（歳）	最近の脳MR I 所見	イオン化カル シウム	PTH
30*	F	8.4	顔面（顎をのこ）、 四肢末端の骨端部で 成長を伴う小細胞性軟 奇形及び位置間皮膚 黒色症	乗作、右片頭痛、知 覚障害、右口角痙攣 著明	両側斜視弱	8.7		左半額、右前頭葉、及び小脳白質の 軟組織病変が認められ、右 前頭葉の灰質の石灰化	正常	正常
31*	F	7.6	体幹及び四肢の線状 肥を伴う毛細血管 畸形、上唇の皮膚黒色 症、及び下腹のカフ マニエー症	なし	左眼黒色症	-	3.2	正常な脳の所見	正常	正常
32	F	0.8	体幹の背腰部に特異的 に伴う毛細血管畸形、 体幹部及び四肢の広範 網皮黒色症。	なし	正常	-	0.2	正常な脳の所見	正常	高
33*	F	14.3	体幹及び四肢のびく担 血管畸形、四肢の網 膜黒色症。下腹部の フェオレシ症	なし	正常	反復性鼻出 血	-	脳MR Iは行われていない*	-	高

【圖 6-8】

患者番号	性別	年齢、歳	皮膚病の特徴	神経学的特徴	眼科的特徴	他の臨床的特徴	最新のfMRI検査の年齢(歳)	最新のfMRI 1例	PTH
34	F	6.3	顔面(両側、顎角を含む)の皮膚病及び四肢の皮膚病。両側性、対称性、血行障害を伴う単純血管畸形。体格及び四肢のフェオレオレ顔色潮紅を著	言語障害	正常	-	6.0	右顔面領域における小さい皮質高信号。脳幹領域又は脳脊髄領域なし。右顔面領域の異常なし。頭蓋内の異常なし。	正常
35*	M	3.8	顔面(右側、顎角を含む)、上肢(肘、及びび下肢)の毛細血管畸形。体格及び四肢の皮膚病は軽微に正常。	なし	両側瞳孔小	-	0.7	左側顔面の領域に右皮質の類似、同所質帯及び野帯を形成領域の類似なし	正常
36*	M	12.6	顔面(頬を含む)の皮膚病。上肢(肘、及びび四肢)の過形成を伴う毛細血管畸形。左足の血管性浮腫。体格及び四肢の広範囲皮膚病に正常。	ADHD	正常	-	-	顔fMRIは行われていない*	正常

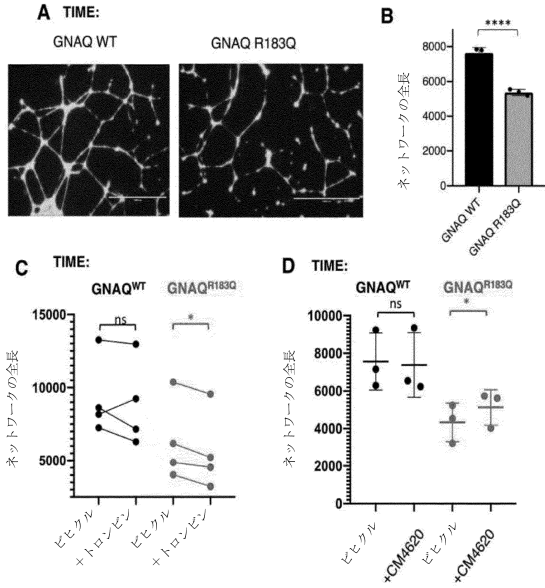
【図 7 - 1】

患者番号	年齢、歳	遺伝子型	イオン化カルシウム	総カルシウム	リン酸塩	ビタミンD	PTH	ALP	尿中Ca/Cr 比
1	3.8	-	1.23	2.39	1.33	89	1.6	221	増加
2	3.1	-	1.24	2.24	1.59	72	1.5	236	-
3	16.1	-	1.22	2.23	1.04	53	0.3 (低)	146 (低)	-
4	4.0	-	1.22	2.40	1.32	95	4.4	239	正常
5	15.9	-	1.24	2.1	0.98	174	1.5	78	正常
6	2.7	-	1.20	2.80	1.73	8	5.5	138 (低)	正常
7	11.0	-	-	2.30	1.53	57	4.8	300	正常
8	1.9	GNAQ c.548G>A, p.R183Q	1.24	2.30	1.58	97	3.0	175	-
9	11.8	-	1.12 (低)	2.16 (低)	1.45	78	2.6	174	正常
10	11.6	-	1.22	2.27	1.34	81	0.8	306	正常
11	15.0	-	1.13 (低)	2.09 (低)	1.20	57	4.4	86 (低)	正常
12	12.4	-	-	2.27	1.59	90	1.4	139 (低)	-
13	9.2	-	1.26	2.45	1.05 (低)	118	3.0	132	-
14	9.4	GNAQ c.548G>A, p.R183Q	1.17 (低)	2.26	1.57	66	4.4	128 (低)	正常
15	11.8	GNAQ c.548G>A, p.R183Q	1.22	2.26	1.29	111	4.4	171 (低)	-
16	1.4	-	-	2.46 (高)	1.58	114	-	317	-
17	4.0	-	1.25	2.31	1.52	81	1.6	217	正常
18	0.7	GNAQ c.548G>A, p.R183Q	1.26	2.64 (高)	1.77	130	8.9 (高)	171	増加
19	10.9	-	1.15 (低)	2.06 (低)	1.37	97	2.4	198	正常

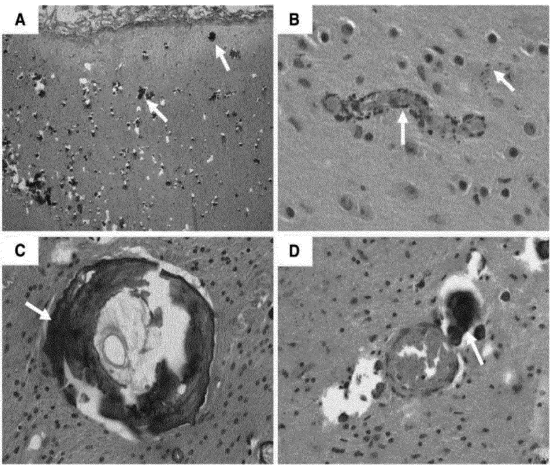
【図 7 - 2】

患者番号	年齢、歳	遺伝子型	イオン化カルシウム	総カルシウム	リン酸塩	ビタミンD	PTH	ALP	尿中Ca/Cr 比
20	10.8	-	1.18 (低)	2.25	1.71	62	1.5	154	減少
21	5.5	-	1.19 (低)	2.20 (低)	1.54	70	4.5	277	正常
22	11.2	GNAQ c.548G>A, p.R183Q	1.21 (低)	2.22	1.65	82	1.5	197 (低)	正常
23	13.7	GNAQ c.548G>A, p.R183Q	1.15 (低)	2.08 (低)	1.50	55	7.4 (高)	353	正常
24	10.3	-	1.25	2.15 (低)	1.30	97	2.3	279	減少
25	9.6	-	1.14 (低)	2.02 (低)	1.46	64	4.8	205	正常
26	6.00	-	1.24	2.23	1.56	60	2.1	359	正常
27	2.4	GNAQ c.548G>A, p.R183Q	1.14 (低)	2.16 (低)	1.62	132	5.9 (高)	226	正常
28	10.5	GNAQ c.547C>T, p.R183C	1.27	2.34	1.29	103	0.8	248	増加
29	5.9	-	1.19 (低)	2.20 (低)	1.81 (高)	80	3.6	221	-
30	8.4	GNAQ c.547C>T, p.R183C	1.24	2.30	1.45	52	1.8	260	正常
31	7.6	GNAQ c.548G>A, p.R183Q	1.22	2.26	1.56	65	1.8	170 (低)	正常
32	0.8	GNAQ and GNAI1 WT	1.29	2.37	1.90	72	7.8 (高)	337 (高)	正常
33	14.3	GNAQ and GNAI1 WT	-	2.20	1.23	58	7.8 (高)	83	正常
34	6.3	GNAQ c.547C>T, p.R183C	1.18 (低)	2.27	1.58	64	2.6	218	正常
35	3.8	GNAQ c.547C>T, p.R183C	-	2.22	1.92 (高)	50	5.1	193	正常
36	12.6	GNAQ c.548G>A, p.R183Q	1.18 (低)	2.17 (低)	1.65	75	3.8	219	正常

【図 8】



【図 9 - 1】



10

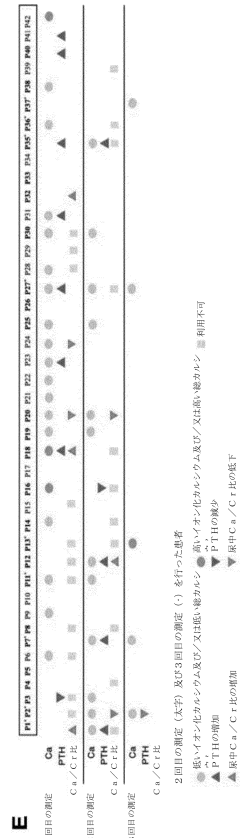
20

30

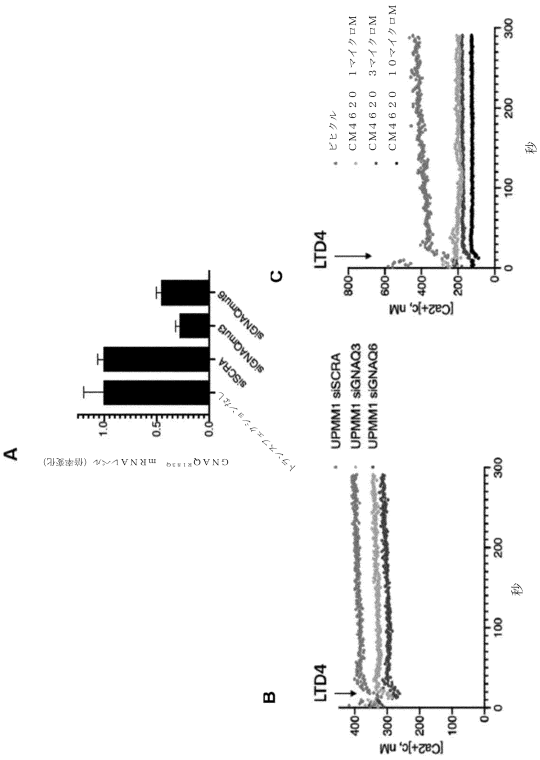
40

50

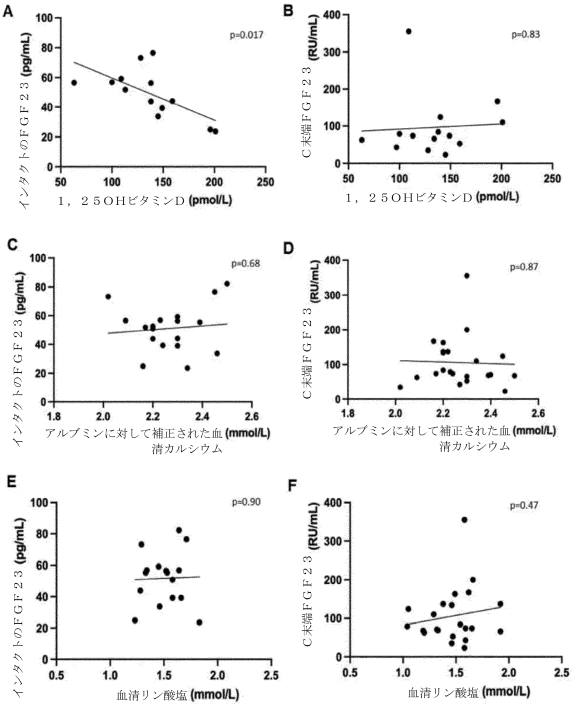
【図 9 - 2】



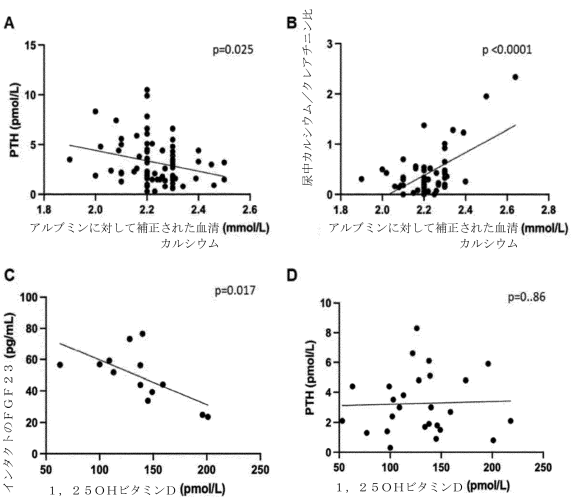
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【配列表】

2025509242000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/055817

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 A61P25/00 A61P17/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61P

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI YONGYUN ET AL: "The oncolytic virus H101 combined with GNAQ siRNA-mediated knockdown reduces uveal melanoma cell viability", JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 120, no. 4, 15 October 2018 (2018-10-15), pages 5766-5776, XP093051660, Hoboken, USA ISSN: 0730-2312, DOI: 10.1002/jcb.27863 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.27863> page 5768, left-hand column, paragraph 3 figures 1-3 page 5767, right-hand column, paragraph 1 ----- -/-	1, 2, 6, 7, 9, 17-19, 29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June 2023

Date of mailing of the international search report

21/06/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Solyga-Zurek, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/055817

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUGHES STEVEN ET AL: "Using siRNA to define functional interactions between melanopsin and multiple G Protein partners", CMLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, BIRKHAUSER VERLAG, HEIDELBERG, DE, vol. 72, no. 1, 24 June 2014 (2014-06-24), pages 165-179, XP035417320, ISSN: 1420-682X, DOI: 10.1007/s00018-014-1664-6 [retrieved on 2014-06-24] page 176, right-hand column, paragraph 1 figure 4B -----	1,3-5, 11,12, 14,17-19
X	WO 2010/068816 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; GOLLOB JARED [US] ET AL.) 17 June 2010 (2010-06-17) tables 2, 6-14 examples 3-7 page 12, line 31 - page 13, line 15 page 18, line 21 - page 20, line 21 page 15, line 1 - page 18, line 20 page 1, line 22 - page 2, line 7 -----	1,2,4-7, 9,17-27, 29
X	POSCH CHRISTIAN ET AL: "Detection of GNAQ mutations and reduction of cell viability in uveal melanoma cells with functionalized gold nanoparticles", BIOMEDICAL MICRODEVICES, SPRINGER US, NEW YORK, vol. 17, no. 1, 31 January 2015 (2015-01-31), pages 1-9, XP035493645, ISSN: 1387-2176, DOI: 10.1007/s10544-014-9908-7 [retrieved on 2015-01-31] figure 4 page 15, right-hand column, paragraph 2 - page 15, right-hand column, paragraph 3 -& Posch Christian ET AL: "Supporting information Detection of GNAQ Mutations and Reduction of Cell Viability in Uveal Melanoma Cells with Functionalized Gold Nanoparticles", , 31 January 2015 (2015-01-31), pages 1-18, XP093052384, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4586106/ [retrieved on 2023-06-07] page 8 ----- -/--	1,2,6,7, 9,17-19, 27,29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/055817

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/097023 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER [US]) 14 May 2020 (2020-05-14) sequences 6, 13 paragraph [0002] -----	1, 2, 6, 9, 10, 16, 27, 28
X	WO 2014/172434 A1 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; KENNEDY KRIEGER INST [US]; UNIV DUKE [US]) 23 October 2014 (2014-10-23) sequences 4, 11 page 5, line 26 - page 6, line 3 page 3, line 18 - page 6, line 9 page 16, lines 22-29 table 2 -----	1-3, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 16, 27, 28, 30
X	CN 105 218 668 B (UNIV SHANDONG AGRICULTURE) 24 March 2020 (2020-03-24) sequence 20 -----	1, 3, 11, 14, 15, 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/055817

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/055817

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010068816 A1	17-06-2010	AU 2009324534 A1	14-07-2011
		CA 2746514 A1	17-06-2010
		EP 2373382 A1	12-10-2011
		EP 3225281 A1	04-10-2017
		JP 5855462 B2	09-02-2016
		JP 2012511332 A	24-05-2012
		JP 2016063826 A	28-04-2016
		NZ 593618 A	22-02-2013
		US 2010168206 A1	01-07-2010
		US 2013012570 A1	10-01-2013
		US 2015099794 A1	09-04-2015
		US 2017240890 A1	24-08-2017
		US 2019106694 A1	11-04-2019
		US 2022348915 A1	03-11-2022
		WO 2010068816 A1	17-06-2010
WO 2020097023 A1	14-05-2020	US 2021403864 A1	30-12-2021
		WO 2020097023 A1	14-05-2020
WO 2014172434 A1	23-10-2014	US 2016237492 A1	18-08-2016
		US 2020370118 A1	26-11-2020
		WO 2014172434 A1	23-10-2014
CN 105218668 B	24-03-2020	NONE	

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	31/712 (2006.01)	A 6 1 K	31/712	
A 6 1 K	31/7125 (2006.01)	A 6 1 K	31/7125	
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54	
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51	
A 6 1 K	9/127 (2025.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	47/42	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 1 2 N	15/87 (2006.01)	A 6 1 K	35/12	
		C 1 2 N	15/87	Z

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

ロンドン ロンドン ミッドランド ロード 1 シー／オーザ フランシス クリック インスティテ
ュート リミテッド

(72)発明者 ツェッキン ダビデ

イギリス国 NW1 1 A T グレーター ロンドン ロンドン ミッドランド ロード 1 シー／オー
ザ フランシス クリック インスティテュート リミテッド

F ターム (参考)	4C076	AA19 AA65 AA95 CC11 CC18 EE41 EE59 FF34
	4C084	AA13 MA24 MA38 NA05 NA13 NA14 ZA36 ZA89
	4C085	AA13 AA14 BB31 CC22 CC23 EE01
	4C086	AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA24 MA38 NA05 NA13 NA14
		ZA36 ZA89
	4C087	AA01 AA02 BB63 MA24 MA38 NA05 NA13 NA14 ZA36 ZA89