

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7611825号
(P7611825)

(45)発行日 令和7年1月10日(2025.1.10)

(24)登録日 令和6年12月26日(2024.12.26)

(51)国際特許分類

| | | | | | |
|---------|------------------|-----|---------|--------|---------|
| C 1 2 N | 15/113 (2010.01) | F I | C 1 2 N | 15/113 | Z Z N A |
| C 0 7 K | 16/28 (2006.01) | | C 0 7 K | 16/28 | |
| C 1 2 N | 15/13 (2006.01) | | C 1 2 N | 15/13 | |
| A 6 1 P | 21/04 (2006.01) | | A 6 1 P | 21/04 | |
| A 6 1 K | 47/68 (2017.01) | | A 6 1 K | 47/68 | |

請求項の数 15 (全82頁) 最終頁に続く

| | |
|-------------------|-----------------------------|
| (21)出願番号 | 特願2021-529254(P2021-529254) |
| (86)(22)出願日 | 令和1年8月2日(2019.8.2) |
| (65)公表番号 | 特表2021-532831(P2021-532831) |
| | A) |
| (43)公表日 | 令和3年12月2日(2021.12.2) |
| (86)国際出願番号 | PCT/US2019/044949 |
| (87)国際公開番号 | WO2020/028832 |
| (87)国際公開日 | 令和2年2月6日(2020.2.6) |
| 審査請求日 | 令和4年8月1日(2022.8.1) |
| (31)優先権主張番号 | 62/714,031 |
| (32)優先日 | 平成30年8月2日(2018.8.2) |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) |
| (31)優先権主張番号 | 62/855,766 |
| (32)優先日 | 令和1年5月31日(2019.5.31) |
| | 最終頁に続く |

| | |
|----------|-----------------------------------|
| (73)特許権者 | 521048956 |
| | daini seラビューティクス, インコー |
| | ボレーテッド |
| | D Y N E T H E R A P E U T I C S , |
| | I N C . |
| | アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 |
| | 2 4 5 1、ウォルサム、トラベッロ 口 |
| | ード 1 5 6 0 |
| | 1 5 6 0 Trapelo Road, W |
| | altham, MA 02451, Un |
| | i ted States of Amer |
| | i ca |
| (74)代理人 | 110003971 |
| (72)発明者 | 弁理士法人葛和国際特許事務所 |
| | スプラマニアン, ロメシ, アール. |
| | 最終頁に続く |

(54)【発明の名称】 ジストロフィン異常症を処置するための筋標的化複合体およびそれらの使用

(57)【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

筋細胞中のジストロフィン(DMD)を標的にするオリゴヌクレオチドに共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含む複合体であって、

オリゴヌクレオチドは、DMDの発現または活性を促進するように構成されており、長さが20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30または35ヌクレオチドであり、およびDMD配列と相補性のある領域を含み、相補性のある領域は、長さが少なくとも12ヌクレオチドであり；

ここで、オリゴヌクレオチドが、ホスホジアミダイトモルホリノオリゴマー(PMO)であり、

ここで、オリゴヌクレオチドが、切断可能なリンカーを介して、抗トランスフェリン受容体抗体に共有結合的に連結されており、ここで切断可能なリンカーが、バリン-シトルリン配列を含み、

ならびに

抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号1～3のいずれか1つで表されるとおりのアミノ酸配列を有するトランスフェリン受容体タンパク質1(TfR1)のC89～F760の範囲において結合し、トランスフェリンのTfR1への結合を許容し、および、ヒト、非ヒト靈長類およびげっ歯類動物のトランスフェリン受容体のうちの2種以上の細胞外エピトープと交差反応する、

前記複合体。

【請求項 2】

抗トランスフェリン受容体抗体が、
 (a) ScFv、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')2フラグメント、またはFvフラグメントの形態であり、任意に、抗トランスフェリン受容体抗体が、Fabフラグメントの形態である；
 (b) ヒトTfR1と 10^{-11} M～ 10^{-6} MのKDで結合する；および／または
 (c) ヒト化抗体を含む、
 請求項1に記載の複合体。

【請求項 3】

(a) オリゴヌクレオチドは、長さが20～30ヌクレオチドであり；および／または
 (b) 相補性のある領域は、長さが16～35ヌクレオチドである、
 請求項1または2に記載の複合体。

【請求項 4】

オリゴヌクレオチドが、配列番号15～266のいずれか1つの少なくとも16個の連続したヌクレオチドを含み、任意に、オリゴヌクレオチドが、配列番号15～266のいずれか1つの配列を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 5】

抗トランスフェリン受容体抗体が、抗トランスフェリン受容体抗体のリシン残基またはシステイン残基への抱合を介してオリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結されている、請求項1～4のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 6】

複合体が、トランスフェリン受容体に媒介されるオリゴヌクレオチドの筋細胞中への内在化を促進するように構成されている、請求項1～5のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 7】

DMD遺伝子が、ジストロフィンアレル中に存在する79エキソンのうちの1つ以上のエキソンの、フレームシフト、欠失、置換、または重複突然変異を含む1以上の突然変異を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 8】

1以上の突然変異が、エキソン8、エキソン23、エキソン41、エキソン44、エキソン50、エキソン51、エキソン52、エキソン53、またはエキソン55におけるフレームシフト突然変異である、請求項7に記載の複合体。

【請求項 9】

オリゴヌクレオチドが、エキソン8～エキソン55の範囲のDMDのエキソンのスキッピングを促進し、任意に、オリゴヌクレオチドが、DMDのエキソン8、エキソン23、エキソン44、エキソン45、エキソン50、エキソン51、エキソン52、エキソン53、および／またはエキソン55のスキッピングを促進する、請求項6に記載の複合体。

【請求項 10】

オリゴヌクレオチドが、DMDのエキソン51のスキッピングを促進する、請求項1～9のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 11】

筋細胞中における複合体の内在化が、機能的ジストロフィンタンパク質の発現または活性を促進する、請求項10に記載の複合体。

【請求項 12】

筋細胞中におけるジストロフィン(DMD)のエキソンのスキッピングを誘導することによって改善または予防することができる疾患または疾病を処置する方法における使用のための、請求項1～11のいずれか一項に記載の複合体であって、方法が、筋細胞を複合体と接触させることを含む、前記複合体。

【請求項 13】

対象におけるデュシェンヌ型筋ジストロフィーを処置する方法における使用のための、請求項1～11のいずれか一項に記載の複合体であって、方法が、有効量の複合体を対象

10

20

30

40

50

へ投与することを含む、前記複合体。

【請求項 14】

対象の筋細胞中におけるジストロフィン(DMD)のエキソン51のスキッピングを誘導することによって改善または予防することができる疾患または疾病を処置する方法における使用のための複合体であって、方法は、複合体を対象に投与することを含む、請求項10に記載の複合体。

【請求項 15】

複合体が、注入によって対象に投与される、請求項14に記載の使用のための複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2018年8月2日に出願された表題「MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING DYSTROPHINOPATHIES」の米国仮出願第62/14,031号；および2019年5月31日に出願された表題「MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING DYSTROPHINOPATHIES」の米国仮出願第62/855,766号の出願日の利益を主張するものである；それらの各々の内容はそれらの全体が参照されることによって本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明の分野

本出願は、分子ペイロード(molecular payloads)(例として、オリゴヌクレオチド)を細胞へ送達するための標的化複合体、およびそれらの使用、具体的に疾患の処置に関する使用、に関する。

【0003】

配列表への言及

本出願は、電子書式で配列表と共に出願されている。配列表は、2019年7月31日に作成された、サイズが102キロバイトのD082470008W000-SEQ.txtという表題のファイルとして提供される。電子書式の配列表中の情報はその全体が参照されることによって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

ジストロフィン異常症は、ジストロフィン遺伝子の突然変異に起因する異なる神経筋疾患の群である。ジストロフィン異常症には、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、およびX連鎖性拡張型心筋症が含まれる。ジストロフィン(DMD)は、79のエキソンと約260万の総塩基対を含有する大きな遺伝子である。エキソンフレームシフト、欠失、置換、および重複突然変異を含むDMDにおける多数の突然変異は、ジストロフィン異常症に繋がる機能的ジストロフィンの発現を減少させることができる。ヒトDMDのエキソン51を標的とする薬剤の1つであるエテブリルセンは、米国食品医薬品局(FDA)により予備的に承認されているが、その有効性は未だ評価中である。

【発明の概要】

【0005】

発明の概要

いくつかの側面に従うと、本開示は、分子ペイロードを筋細胞へ送達することを目的として、それらの細胞を標的にする複合体を提供する。いくつかの態様において、本明細書に提供される複合体は、機能的DMDの発現または活性を増大または回復する分子ペイロードを送達するのにとくに有用である。いくつかの態様において、複合体は、インフレームエキソンスキッピングメカニズムまたはトップコドンの抑制を介して機能的DMDの正常な発現を促進するオリゴヌクレオチドベースの分子ペイロードを含む。他の態様において、複合体は、機能的ジストロフィン活性を増大または回復するミニジストロフィン遺伝子

10

20

30

40

50

または合成mRNAを送達するように構成される。結果的に、いくつかの態様において、本明細書に提供される複合体は、分子ペイロードを筋細胞へ送達することを目的として、筋細胞の表面上の受容体へ特異的に結合する筋標的化剤(例として、筋標的化抗体)を含む。いくつかの態様において、複合体は、受容体に媒介される内在化を介して細胞中へ取り入れられ、これを受け分子ペイロードは細胞内部に放出されて機能を果たし得る。例えば、オリゴヌクレオチドを送達するように改変された複合体は、オリゴヌクレオチドが(例として、エキソンスキッピングメカニズムを介して)筋細胞における機能的DMDの発現を促進し得るように、オリゴヌクレオチドを放出してもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、複合体のオリゴヌクレオチドと筋標的化剤とを接続する共有結合性リンカーのエンドソーム切断によって放出される。

10

【0006】

本開示のいくつかの側面は、DMDの発現または活性を促進するために構成されている分子ペイロードへ共有結合的に連結された筋標的化剤を含む複合体を含み、ここで筋標的化剤は、筋細胞上の内在化する細胞表面受容体へ特異的に結合する。

【0007】

いくつかの態様において、筋標的化剤は、筋標的化抗体である。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、トランスフェリン受容体の細胞外エピトープ(例として、トランスフェリン受容体の先端ドメイン(apical domain)のエピトープ)へ特異的に結合する抗体である。筋標的化抗体は、配列番号1～3のC89～F760の範囲にある配列のエピトープへ特異的に結合してもよい。いくつかの態様において、筋標的化抗体のトランスフェリン受容体への結合の平衡解離定数(K_d)は、 $10^{-11}M$ から $10^{-6}M$ までの範囲にある。

20

【0008】

いくつかの態様において、複合体の筋標的化抗体は、トランスフェリン受容体のエピトープへの特異的な結合について、表1中に列挙された抗体と競合する(例として、トランスフェリン受容体のエピトープへの特異的な結合について、 $10^{-6}M$ 未満またはこれと等しい K_d 、例として、 $10^{-11}M$ ～ $10^{-6}M$ の範囲にある K_d で競合する)。

【0009】

いくつかの態様において、複合体の筋標的化抗体は、トランスフェリン受容体のトランスフェリン結合部位へ特異的に結合しないか、および/またはトランスフェリンのトランスフェリン受容体への結合を阻害しない。いくつかの態様において、複合体の筋標的化抗体は、ヒト、霊長目の非ヒト動物、および齧歯類の動物のトランスフェリン受容体のうち2種以上の細胞外エピトープと交差反応する。いくつかの態様において、複合体の筋標的化抗体は、トランスフェリン受容体に媒介される分子ペイロードの筋細胞中への内在化を促進するように構成されている。

30

【0010】

筋標的化抗体(例として、筋標的化抗体は、トランスフェリン受容体の細胞外エピトープへ特異的に結合する抗体である)は、キメラ抗体であるが、ここで任意にキメラ抗体は、ヒト化モノクローナル抗体である。筋標的化抗体は、ScFv、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、 $F(ab')_2$ フラグメント、またはFvフラグメントの形態であってもよい。

40

【0011】

いくつかの態様において、複合体の分子ペイロードは、オリゴヌクレオチドである。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、表2に列挙された配列を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、配列番号15～266のいずれか1つに提供される配列を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、突然変異したDMDアレルと相補性のある領域を含む。

【0012】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、モノまたはマルチエキソンスキッピングによってDMDアレルにおける短縮型突然変異(truncating mutation)を抑制するように構成されている。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、アンチセンス媒介エキソンスキッピングを促進して、インフレームジストロフィンmRNAを産生する。いく

50

つかの態様において、オリゴヌクレオチドは、エキソン8～エキソン55の範囲(例として、エキソン23～エキソン53)のDMDのエキソンのスキッピングを促進する。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、エキソン8、エキソン23、エキソン44、エキソン45、エキソン50、エキソン51、エキソン52、エキソン53、および/またはエキソン55のスキッピングを促進する。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、エキソン44～エキソン53の範囲の複数のエキソンのスキッピングを促進する。

【0013】

本開示のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の修飾ヌクレオチド間連結(例として、ホスホロチオアート連結)を含んでいてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、Rp立体化学配置(stereochemical conformation)にあり、およびSp立体化学配置にあるホスホロチオアート連結を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、すべてRp立体化学配置にあるホスホロチオアート連結を含む。他の態様において、オリゴヌクレオチドは、すべてSp立体化学配置にあるホスホロチオアート連結を含む。

10

【0014】

本開示のオリゴヌクレオチドは、1個以上の修飾ヌクレオチド(例として、2'-修飾ヌクレオチド)を含んでいてもよい。いくつかの態様において、修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル、2'-フルオロ(2'-F)、2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)、または2',4'-架橋ヌクレオチドである。いくつかの態様において、修飾ヌクレオチドは、架橋ヌクレオチドである(例として、2',4'-拘束(constrained)2'-O-エチル(cEt)およびロックド核酸(LNA)ヌクレオチドから選択される)。

20

【0015】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、細胞中のDMD発現を負に調節するmRNAのRNase H媒介切断を指向する(directs)gapmerオリゴヌクレオチドであり、任意にmiRNAはmiR-31である。gapmerオリゴヌクレオチドは、5～15個のデオキシリボヌクレオチドの中心部を、その両脇から2～8個ずつの修飾ヌクレオチド(例として、2'-修飾ヌクレオチド)に挟まれて(*flanked by wings of 2 to 8 modified nucleotides (e.g., 2-modified nucleotides)*)含んでいてもよい。

【0016】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、mixmerオリゴヌクレオチドである。いくつかの態様において、mixmerオリゴヌクレオチドは、エキソンスキッピングを促進する。mixmerオリゴヌクレオチドは、2個以上の異なる2'修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。

30

【0017】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、細胞中のDMD発現を負に調節するmRNAのRNAi媒介切断を促進するRNAiオリゴヌクレオチドであり、任意にmiRNAはmiR-31である。RNAiオリゴヌクレオチドは、長さが19～25ヌクレオチドの二本鎖オリゴヌクレオチドであってもよい。いくつかの態様において、RNAiオリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の2'修飾ヌクレオチドを含む。

【0018】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ゲノム編集ヌクレアーゼのためのガイド配列を含む。

40

【0019】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ホスホジアミダイトモルホリノオリゴマー(PMO)である。

【0020】

他の態様において、分子ペイロードは、ポリペプチドである。いくつかの態様において、分子ペイロードは、ジストロフィンタンパク質の機能的フラグメントであるポリペプチドである。

【0021】

いくつかの態様において、筋標的化剤は、切断可能なリンカー(例として、プロテアーゼ

50

感受性リンカー、pH感受性リンカー、またはグルタチオン感受性リンカー)を介して、分子ペイロードへ共有結合的に連結されている。プロテアーゼ感受性リンカーは、リソソームのプロテアーゼおよび/またはエンドソームのプロテアーゼによって切断可能な配列を含んでいてもよい。いくつかの態様において、プロテアーゼ感受性リンカーは、バリン-シトルリンジペプチド配列を含む。pH感受性リンカーは、4~6の範囲にあるpHにて切断されてもよい。

【0022】

いくつかの態様において、筋標的化剤は、切断不能なリンカー(例として、アルカンリンカー)を介して分子ペイロードへ共有結合的に連結されている。

【0023】

いくつかの態様において、筋標的化抗体は、オリゴヌクレオチドが共有結合的に連結され得る非天然アミノ酸を含む。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、抗体のリシン残基またはシステイン残基への抱合を介してオリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結されている。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、マレイミド含有リンカーを介して抗体のシステインへ抱合されており、任意にここでマレイミドリンカーは、マレイミドカブロイルまたはマレイミドメチルシクロヘキサン-1-カルボキシラート基を含む。

【0024】

いくつかの態様において、筋標的化抗体は、オリゴヌクレオチドが共有結合的に連結された少なくとも1個の糖部を含むグリコシリ化抗体である。いくつかの態様において、グリコシリ化抗体は、分枝マンノースである少なくとも1個の糖部を含む。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、1~4個の糖部を含むグリコシリ化抗体であって、前記糖部の各々は、別々のオリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結されている。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、全体的にグリコシリ化された抗体または部分的にグリコシリ化された抗体である。部分的にグリコシリ化された抗体は、化学的または酵素的な手段を介して產生されてもよい。いくつかの態様において、部分的にグリコシリ化された抗体は、N-またはO-グリコシリ化経路中の酵素を欠乏した細胞において產生される。

【0025】

本開示のいくつかの側面は、分子ペイロードをトランスフェリン受容体発現細胞へ送達する方法を含む。いくつかの態様において、分子ペイロードをトランスフェリン受容体発現細胞へ送達する方法は、細胞を、DMDの発現または活性を促進するために構成されている分子ペイロードへ共有結合的に連結された筋標的化剤を含む複合体と接触させることを含む。

【0026】

本開示のいくつかの側面は、細胞中DMDタンパク質の発現または活性を促進する方法を含む。いくつかの態様において、細胞中DMDタンパク質の発現または活性を促進する方法は、細胞を、DMDの発現または活性を促進するために構成されている分子ペイロードへ共有結合的に連結された筋標的化剤を含む複合体と、分子ペイロードの細胞への内在化を促進するのに有効な量で接触させることを含む。いくつかの態様において、細胞は、in vitroにある。いくつかの態様において、細胞は、対象にある。いくつかの態様において、対象は、ヒトである。

【0027】

本開示のさらなる側面は、ジストロフィン異常症に関連する突然変異したDMDアレルを有する対象を処置する方法を含む。いくつかの態様において、ジストロフィン異常症に関連する突然変異したDMDアレルを有する対象を処置する方法は、DMDの発現または活性を促進するために構成されている分子ペイロードへ共有結合的に連結された筋標的化剤を含む有効量の複合体を対象へ投与することを含む。

【0028】

本開示のなおさらなる側面は、細胞中のDMD mRNA転写産物のエキソンのスキッピングを促進する方法を含む。いくつかの態様において、細胞中のDMD mRNA転写産物のエキソンのスキッピングを促進する方法は、DMDの発現または活性を促進するために構成さ

10

20

30

40

50

れている分子ペイロードへ共有結合的に連結された筋標的化剤を含む有効量の複合体を対象へ投与することを含む。いくつかの態様において、前記方法は、DMD mRNA転写産物のエキソン8、エキソン23、エキソン44、エキソン45、エキソン50、エキソン51、エキソン52、エキソン53および/またはエキソン55のスキッピングを促進する。

【図面の簡単な説明】

【0029】

図面の簡単な記載

【図1】図1は、siRNAで細胞をトランスフェクトする効果を示す非限定的な概略図を描く。

【0030】

【図2】図2は、siRNAを含む筋標的化複合体の活性を示す非限定的な概略図を描く。

【0031】

【図3】図3A～3Bは、対照実験と比べたin vivoでのマウス筋組織(腓腹筋および心臓)におけるsiRNAを含む筋標的化複合体の活性を示す非限定的な概略図を描く。(N=4匹のC57BL/6 WTマウス)

【0032】

【図4 A - B】図4A～4Eは、siRNAを含む筋標的化複合体の組織選択性を示す非限定的な概略図を描く。

【図4 C - D】図4C～4Dは、siRNAを含む筋標的化複合体の組織選択性を示す非限定的な概略図を描く。

【図4 E】図4Eは、siRNAを含む筋標的化複合体の組織選択性を示す非限定的な概略図を描く。

【発明を実施するための形態】

【0033】

発明の詳細な記載

本開示の側面は、ある分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチド、ペプチド、小分子)が筋細胞に有益な効果を有し得るもの、かかる細胞を効果的に標的にすることは難航を極めるという認識に関する。本明細書に記載のとおり、本開示は、かかる課題を克服するために、分子ペイロードへ共有結合的に連結された筋標的化剤を含む複合体を提供する。いくつかの態様において、複合体は、例として、希少な筋疾患を有するかまたはこれを有すると疑われる対象において、筋細胞における標的遺伝子の発現または活性をモジュレート(例として、促進)する分子ペイロードを送達するのに具体的に有用である。例えば、いくつかの態様において、複合体は、DMD、例として突然変異したDMDアレルを標的にするために提供される。いくつかの態様において、本明細書に提供される複合体は、DMDの正常な発現および活性を促進するオリゴヌクレオチドを含んでもよい。別の例として、複合体は、DMD mRNAのエキソンのスキッピングを誘導するオリゴヌクレオチドを含んでいてもよい。いくつかの態様において、DMDの正常な発現および活性を促進する1以上のタンパク質を発現する合成核酸ペイロード(例として、DNAまたはRNAペイロード)が使用されてもよい。

【0034】

いくつかの態様において、複合体は、例として、ジストロフィンまたはそのフラグメント(例として、ジストロフィンミニ遺伝子)を発現する合成cDNAおよび/または合成mRNAの分子ペイロードを含んでいてもよい。いくつかの態様において、複合体は、核酸をプログラムできるヌクレアーゼ(nucleic acid programmable nucleases)(例として、Cas9)に、DMDの疾患関連突然変異、例として突然変異したDMDエキソンの配列またはその近くの配列を標的にさせることができ可能なガイド分子(例として、ガイドRNA)などの分子ペイロードを含む。いくつかの態様において、かかる核のプログラム可能なヌクレアーゼは、DMDの疾患関連突然変異、例として突然変異したDMDエキソンの一部またはすべてを切断して、機能的DMDの発現を促進するために使用され得る。いくつかの態様において、複合体は、ユートロフィンなどのジストロフィンの機能を置き換えることができる遺伝子の

10

20

30

40

50

発現および/または活性を上方調節する分子ペイロードを含んでいてもよい。

【0035】

さらなる本開示の側面は、定義される用語の記載を含め、下に提供される。

【0036】

I . 定義

投与する(施す)こと:

本明細書に使用されるとき、用語「投与する(施す)こと」または「投与(施し)」は、生理学的および/または薬理学的に有用なやり方で対象へ複合体を提供すること(例として、対象における疾病を処置すること)を意味する。

【0037】

10

およそ:

本明細書に使用されるとき、用語「およそ」または「約」は、関心のある1つ以上の値へ適用されるとき、規定された参照値と同様の値を指す。ある態様において、用語「およそ」または「約」は、別様に述べられない限りまたは文脈から明らかでない限り(かかる数字が実行可能な値の100%を超える場合を除く)、規定された参照値のプラスマイナス(超または未満)の15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはこれ未満に収まる広範な値を指す。

【0038】

抗体:

本明細書に使用されるとき、用語「抗体」は、少なくとも1個の免疫グロブリン可変ドメインまたは少なくとも1個の抗原決定基、例として、抗原へ特異的に結合するパラトープを包含するポリペプチドを指す。いくつかの態様において、抗体は、完全長の抗体である。いくつかの態様において、抗体は、キメラ抗体である。いくつかの態様において、抗体は、ヒト化抗体である。しかしながら、いくつかの態様において、抗体は、Fabフラグメント、F(ab')2フラグメント、Fvフラグメント、またはscFvフラグメントである。いくつかの態様において、抗体は、ラクダ科の動物の抗体に由来するナノボディー、またはサメ抗体に由来するナノボディーである。いくつかの態様において、抗体は、二重特異性抗体である。いくつかの態様において、抗体は、ヒト生殖細胞系配列を有するフレームワークを含む。別の態様において、抗体は、IgG、IgG1、IgG2、IgG2A、IgG2B、IgG2C、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgM、およびIgEの定常領域からなる群から選択される重鎖定常領域を含む。いくつかの態様において、抗体は、重(H)鎖可変領域(本明細書中VHと略される)および/または軽(L)鎖可変領域(本明細書中VLと略される)を含む。いくつかの態様において、抗体は、定常領域、例としてFc領域を含む。免疫グロブリン定常領域は、重鎖または軽鎖定常領域を指す。ヒトIgG重鎖および軽鎖定常領域アミノ酸配列およびそれらの機能的バリエーションは知られている。重鎖に関し、いくつかの態様において本明細書に記載の抗体の重鎖は、アルファ()、デルタ()、イプシロン()、ガンマ()、またはミュー(μ)重鎖であり得る。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗体の重鎖は、ヒトのアルファ()、デルタ()、イプシロン()、ガンマ()、またはミュー(μ)重鎖を含み得る。具体的な態様において、本明細書に記載の抗体は、ヒトのガンマ1 CH1、CH2、および/またはCH3ドメインを含む。いくつかの態様において、VHドメインのアミノ酸配列は、ヒトガンマ()重鎖定常領域のアミノ酸配列、たとえば当該技術分野において知られているいずれの配列も含む。ヒト定常領域配列の非限定例は当該技術分野において記載されており、例として、米国特許第5,693,780号および上記のKabat E Aら(1991)を参照。いくつかの態様において、VHドメインは、本明細書に提供される可変鎖定常領域のいずれかと少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗体は修飾されており、例として、グリコシル化、リン酸化、SUMO化、および/またはメチル化を介して修飾されている。いくつかの態様において、抗体は、1個以上の糖または炭水化物分子へ抱合されたグリコシル化抗体である。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、N-グリコシル化、O-グリコシル化、C-グリコシル化、グリピエーション(glypi

20

30

40

50

ation)(GPIアンカー付着)、および/またはホスホグリコシル化を介して抗体へ抱合されている。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、またはグリカンである。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、分枝オリゴ糖類または分枝グリカンである。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、マンノース単位、グルコース単位、N-アセチルグルコサミン単位、N-アセチルガラクトサミン単位、ガラクトース単位、フコース単位、またはホスホ脂質単位を包含する。いくつかの態様において、抗体は、リンカーポリペプチドまたは免疫グロブリン定常領域へ連結された本開示の1個以上の抗原結合性フラグメントを含むポリペプチドを含む構築物である。リンカーポリペプチドは、ペプチド結合によって結び合わされた2個以上のアミノ酸残基を含み、1個以上の抗原結合部と連結させるために使用される。リンカーポリペプチドの例は報告されている(例として、Holliger,P.,et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak,R.J.,et al.(1994)Structure 2: 1121-1123を参照)。またさらに、抗体は、1以上の他のタンパク質またはペプチドと、抗体もしくは抗体部分との共有結合または非共有結合の結び付きによって形成される、より大きな免疫接着分子の一部であってもよい。かかる免疫接着分子の例は、四量体scFv分子を作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用(Kipriyanov,S.M.,et al.(1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101)、ならびに二価のおよびビオチン化されたscFv分子を作製するためのシステイン残基、マーカーペプチド、およびC末ポリヒスチジンタグの使用(Kipriyanov,S.M.,et al.(1994)Mol.Immunol.31:1047-1058)を包含する。

10

【0039】

CDR:

本明細書に使用されるとき、用語「CDR」は、抗体可変配列内の相補性決定領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域の各々において3つのCDRがあり、これらは可変領域の各々につきCDR1、CDR2、およびCDR3と指定される。用語「CDRセット」は、本明細書に使用されるとき、抗原に結合することが可能な单一の可変領域に生じる3つのCDRの一群を指す。これらのCDRの厳密な境界は、種々の系に従い異なって定義されている。Kabat(Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest(国立衛生研究所,Bethesda,Md.(1987)および(1991))によって記載される系は、抗体のいずれの可変領域へも適用可能な一義的な残基ナンバリング系を提供するのみならず、3つのCDRを定義する正確な残基境界をも提供する。これらのCDRは、Kabat CDRと称されることもある。CDRの下位部(Sub-portions)は、L1、L2、およびL3、またはH1、H2、およびH3と指定されることがあり、ここで「L」および「H」は夫々、軽鎖および重鎖領域を指定する。これらの領域は、Kabat CDRと重複する境界を有するChothia CDRと称されることもある。Kabat CDRと重複するCDRを定義する他の境界は、Padlan(FASEB J.9:133-139(1995))およびMacCallum(J Mol Biol 262(5):732-45(1996))によって記載されている。さらに他のCDR境界定義は、上の系の1つに厳重に従わなくてもよいが、それでもなおKabat CDRと重複することがあり、具体的な残基もしくは残基の群またはCDR全体でさえも抗原結合に有意に影響を及ぼすものではないという予測あるいは実験的知見を踏まえ、それらは短縮または伸長されてもよい。本明細書に使用される方法は、これらの系のいずれかに従って定義されるCDRを利用してよいが、好ましい態様はKabatまたはChothiaに定義されるCDRを使用する。

20

【0040】

CDR接合(-grafted)抗体:

用語「CDR接合抗体」は、マウス重鎖および軽鎖可変領域を有するがマウスCDRの1以上(例として、CDR3)がヒトCDR配列に置き換えられている抗体などの、ある種からの重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、そのVHおよび/またはVLのCDR領域の1以上の配列が別の種のCDR配列に置き換えられている抗体を指す。

30

【0041】

キメラ抗体:

40

50

用語「キメラ抗体」は、ヒト定常領域へ連結されたマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体などの、ある種からの重鎖および軽鎖可変領域配列と別の種からの定常領域配列を含む抗体を指す。

【0042】

相補的:

本明細書に使用されるとき、用語「相補的」は、2ヌクレオチド間または2組のヌクレオチド間の正確な対形成のための能力(capacity)を指す。とりわけ、相補的は、2ヌクレオチド間または2組のヌクレオチド間に結合をもたらす水素結合対形成の程度を特徴付ける用語である。例えば、ある位置のオリゴヌクレオチドの塩基が、対応する位置の標的核酸(例として、mRNA)の塩基と水素結合することが可能である場合、そのとき塩基は、その位置にて互いに相補的であると見なされる。塩基対合は、標準的なWatson-Crick塩基対合と非Watson-Crick塩基対合(例として、Wobble塩基対合およびHoogsteen塩基対合)との両方を包含してもよい。例えば、いくつかの態様において、相補的な塩基対合として、アデノシン型塩基(A)は、チミジン型塩基(T)またはウラシル型塩基(U)に相補的であり、シトシン型塩基(C)は、グアノシン型塩基(G)に相補的であり、3-ニトロピロールまたは5-ニトロインドールなどのユニバーサル塩基は、いずれのA、C、U、またはTとハイブリダイズし得、これらと相補的であると見なされる。イノシン(I)はまた、当該技術分野においてユニバーサル塩基であるとも見なされており、いずれのA、C、U、またはTに相補的であると見なされる。

10

【0043】

保存アミノ酸置換:

本明細書に使用されるとき、「保存アミノ酸置換」は、アミノ酸置換がなされたタンパク質の相対的な電荷またはサイズの特徴を変更しないアミノ酸置換を指す。バリエントは、当業者に知られているポリペプチド配列を変更するための方法に従って調製され得、たとえば、かかる方法をまとめた参考文献、例として、Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook,et al.,eds.,Fourth Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,2012、またはCurrent Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel,et al.,eds.,John Wiley & Sons,Inc.,New Yorkから見出される。アミノ酸の保存的置換は、以下の群:(a)M、I、L、V;(b)F、Y、W;(c)K、R、H;(d)A、G;(e)S、T;(f)Q、N;および(g)E、D内のアミノ酸に対してなされる置換を包含する。

20

【0044】

共有結合的に連結された(ている):

本明細書に使用されるとき、用語「共有結合的に連結された」は、少なくとも1個の共有結合を介して一緒に連結されている2個以上の分子の特徴を指す。いくつかの態様において、2個の分子は一緒に、分子間リンカーとして働く単結合(例として、ジスルフィド結合またはジスルフィド架橋)によって共有結合的に連結され得る。しかしながら、いくつかの態様において、複数の共有結合を通して2個以上の分子と一緒に結び合わせるリンカーとして働く分子を介して、2個以上の分子は一緒に、共有結合的に連結され得る。いくつかの態様において、リンカーは、切断可能なリンカーであってもよい。しかしながら、いくつかの態様において、リンカーは、切断不能なリンカーであってもよい。

30

【0045】

交差反応すること:

本明細書に使用されるとき、および標的化剤(例として、抗体)の文脈において、用語「交差反応すること」は、同様のタイプまたはクラスの1種より多くの抗原(例として、複数のホモログ、パラログ、もしくはオルソログの抗原)へ、同様の親和性または結合活性で特異的に結合することが可能な剤の特性を指す。例えば、いくつかの態様において、同様のタイプまたはクラスのヒトおよび靈長目の非ヒト動物の抗原(例として、ヒトransフェリン受容体および靈長目の非ヒト動物のtransフェリン受容体)に対して交差反応する抗体は、ヒト抗原および靈長目の非ヒト動物の抗原へ、同様の親和性または結合活性で結合することが可能である。いくつかの態様において、抗体は、同様のタイプまたはクラスの

40

50

ヒト抗原および齧歯類動物抗原に対して交差反応する。いくつかの態様において、抗体は、同様のタイプまたはクラスの齧歯類動物の抗原および靈長目の非ヒト動物の抗原に対して交差反応する。いくつかの態様において、抗体は、同様のタイプまたはクラスのヒト抗原、靈長目の非ヒト動物の抗原、および齧歯類動物の抗原に対して交差反応する。

【0046】

DMD:

本明細書に使用されるとき、用語「DMD」は、筋細胞、具体的には筋纖維において内部の細胞骨格および細胞外マトリックスを橋渡しする、ジストロフィン・糖タンパク質複合体の重要な構成要素である、ジストロフィンタンパク質をコードする遺伝子を指す。DMDにおける欠失、重複、および点突然変異は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、または心筋症などのジストロフィン異常症を引き起こす可能性がある。代替プロモーターの使用および選択的(alternative)スプライシングは、この遺伝子に対する多数の異なる転写産物バリエントおよびタンパク質アイソフォームをもたらす。いくつかの態様において、ジストロフィン遺伝子は、ヒト(Gene ID:1756)、靈長目の非ヒト動物(例として、Gene ID:465559)、または齧歯類の動物(例として、Gene ID:13405; Gene ID:24907)の遺伝子であってもよい。加えて、種々のタンパク質アイソフォームをコードする、複数のヒト転写産物バリエント(例として、GenBank RefSeq受託番号:NM_000109.3、NM_004006.2、NM_004009.3、NM_004010.3およびNM_004011.3の注釈付きのものであるように)が特徴付けられている。

10

【0047】

DMDアレル:

本明細書に使用されるとき、用語「DMDアレル」は、DMD遺伝子の代替の形態(例として、野生型または突然変異形態)のいずれか1つを指す。いくつかの態様において、DMDアレルは、その正常かつ典型的な機能を保持するジストロフィンをコードしてもよい。いくつかの態様において、DMDアレルは、筋ジストロフィーをもたらす1以上の突然変異を含んでいてもよい。デュシェンヌ型筋ジストロフィーに繋がる一般的な突然変異は、ジストロフィンアレル中に存在する79エキソン、例として、エキソン8、エキソン23、エキソン41、エキソン44、エキソン50、エキソン51、エキソン52、エキソン53、またはエキソン55のうちの1つ以上のエキソンの1以上のフレームシフト、欠失、置換、および重複突然変異を含む。DMD突然変異のさらなる例は、例えば、Flanigan KM, et al., *Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort.* Hum Mutat. 2009 Dec; 30 (12):1657-66に開示され、その内容は参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。

20

30

【0048】

ジストロフィン異常症:

本明細書に使用されるとき、用語「ジストロフィン異常症」は、1以上の突然変異したDMDアレルに起因する筋疾患を指す。ジストロフィン異常症には、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、およびDMD関連拡張型心筋症(DCM)を含む(軽度から重度までにわたる)状態のスペクトラムが含まれる。いくつかの態様において、スペクトラムの一端において、ジストロフィン異常症は、クレアチンホスホキナーゼ(CK)の血清濃度の無症候性増大および/またはミオグロビン尿症を伴う筋痙攣と表現型的に関連している。いくつかの態様において、スペクトラムの他端において、ジストロフィン異常症は、骨格筋が主に影響を受ける場合にはデュシェンヌまたはベッカーリー筋ジストロフィーとして、心臓が主に影響を受ける場合にはDMD関連拡張型心筋症(DCM)として一般的に分類される、進行性の筋疾患と表現型的に関連している。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの症状としては、筋肉の喪失や変性、筋機能の低下、舌や腓腹筋の仮性肥大、神経学的異常の高いリスク、および短くなる寿命が含まれる。デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) Entry #310200と関連している。ベッカーリー筋ジストロフィーはOMIM Entry #300376と関連している。拡張型心筋症はOMIM Entry X#302045と関連している。

40

50

【0049】

フレームワーク:

本明細書に使用されるとき、用語「フレームワーク」または「フレームワーク配列」は、CDRを差し引いた可変領域の残りの配列を指す。CDR配列の厳密な定義が種々の系によつて決定され得ることから、フレームワーク配列の意味は、相応に異なる解釈に依存する。6つのCDR(軽鎖のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3、ならびに重鎖のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3)もまた、軽鎖および重鎖上のフレームワーク領域を各鎖上の4つの下位領域(FR1、FR2、FR3、およびFR4)に分け、ここでCDR1はFR1とFR2との間に、CDR2はFR2とFR3との間に、CDR3はFR3とFR4との間に位置付けられる。具体的な下位領域をFR1、FR2、FR3、またはFR4と特定しないフレームワーク領域は、他によって言及されるとき、天然に存在する単一の免疫グロブリン鎖の可変領域内の組み合わされたFR(複数)を表す。本明細書に使用されるとき、FRは4つの下位領域のうち1つを表し、FR(複数)はフレームワーク領域を含有する4つの下位領域のうち2つ以上を表す。ヒト重鎖および軽鎖アクセプター配列は、当該技術分野において知られている。一態様において、当該技術分野において知られているアクセプター配列は、本明細書に開示の抗体に使用されてもよい。

10

【0050】

ヒト抗体:

用語「ヒト抗体」は、本明細書に使用されるとき、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を包含することが意図される。本開示のヒト抗体は、例えばCDR、とりわけCDR3において、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例として、*in vitro*でのランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘発によってか、または*in vivo*での体細胞変異によって導入された突然変異)を包含していてもよい。しかしながら、用語「ヒト抗体」は、本明細書に使用されるとき、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上へ接合された抗体を包含することは意図されない。

20

【0051】

ヒト化抗体:

用語「ヒト化抗体」は、非ヒト種(例として、マウス)からの重鎖および軽鎖の可変領域配列を含むが、VH配列および/またはVL配列の少なくとも一部がより「ヒト様」に、すなわち、ヒト生殖細胞系可変配列とより同様なものに変更された抗体を指す。ヒト化抗体のあるタイプは、ヒトCDR配列が非ヒトVHおよびVL配列上へ導入されて対応する非ヒトCDR配列と置き換えられたCDR接合抗体である。一態様において、ヒト化された抗トランスフェリン受容体抗体および抗原結合部分が提供される。かかる抗体は、既存のハイブリドーマ技術、これに続く*in vitro*の遺伝子工学を使用するヒト化(KasaiらのPCT刊行物第WO 2005/123126 A2号に開示されたものなど)を使用してマウス抗トランスフェリン受容体モノクローナル抗体を得ることによって生成されてもよい。

30

【0052】

内在化する細胞表面受容体:

本明細書に使用されるとき、用語「内在化する細胞表面受容体」は、例として、外部刺激(例として、受容体へ結合するリガンド)の際、細胞によって内在化される細胞表面受容体を指す。いくつかの態様において、内在化する細胞表面受容体は、エンドサイトーシスによって内在化される。いくつかの態様において、内在化する細胞表面受容体は、クラスリン媒介エンドサイトーシスによって内在化される。しかしながら、いくつかの態様において、内在化する細胞表面受容体は、クラスリンに依存しない経路、例えば、食作用、マクロビノサイトーシス、カベオラ-およびラフト-媒介取り込み、またはクラスリンに依存しない構成的エンドサイトーシスなどによって内在化される。いくつかの態様において、内在化する細胞表面受容体は、細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、および/または細胞外ドメインを含み、これらは任意にさらにリガンド結合ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞表面受容体は、リガンド結合後に細胞によって内在化されるようになる。いく

40

50

つかの態様において、リガンドは、筋標的化剤または筋標的化抗体であってもよい。いくつかの態様において、内在化する細胞表面受容体は、トランスフェリン受容体である。

【 0 0 5 3 】

単離された抗体:

「単離された抗体」は、本明細書に使用されるとき、異なる抗原特異性を有する他の抗体が実質的でない抗体を指すことが意図される(例として、トランスフェリン受容体に特異的に結合する単離された抗体は、トランスフェリン受容体以外の抗原に特異的に結合する抗体が実質的でない)。しかしながら、トランスフェリン受容体複合体に特異的に結合する単離された抗体は、他の種からのトランスフェリン受容体分子などの他の抗原への交差反応性を有していてもよい。その上、単離された抗体は、他の細胞の材料および/または化学物質が実質的でなくともよい。

10

【 0 0 5 4 】

Kabatナンパリング:

用語「Kabatナンパリング」、「Kabat定義」、および「Kabat標識化」は本明細書中、互換的に使用される。これらの用語は、当該技術分野において認識されているが、抗体またはその抗原結合部分の重鎖および軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基より可変(すなわち、高可変)であるアミノ酸残基をナンパリングする系を指す(Kabat et al.(1971)Ann.N Y Acad,Sci.190:382-391および、Kabat,E.A.,et al.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)。重鎖可変領域において、超可変領域は、CD R1につきアミノ酸位置31～35、CDR2につきアミノ酸位置50～65、およびCDR3につきアミノ酸位置95～102に及ぶ。軽鎖可変領域において、超可変領域は、CDR1につきアミノ酸位置24～34、CDR2につきアミノ酸位置50～56、およびCDR3につきアミノ酸位置89～97に及ぶ。

20

【 0 0 5 5 】

分子ペイロード:

本明細書に使用されるとき、用語「分子ペイロード」は、生物学的結果(biological outcome)をモジュレートするよう機能する分子または種を指す。いくつかの態様において、分子ペイロードは、筋標的化剤へ連結されているか、または筋標的化剤へ別様に結び付けられている。いくつかの態様において、分子ペイロードは、小分子、タンパク質、ペプチド、核酸、またはオリゴヌクレオチドである。いくつかの態様において、分子ペイロードは、DNA配列の転写をモジュレートするよう、タンパク質の発現をモジュレートするよう、またはタンパク質の活性をモジュレートするよう機能する。いくつかの態様において、分子ペイロードは、標的遺伝子と相補性のある領域を有する鎖を含むオリゴヌクレオチドである。

30

【 0 0 5 6 】

筋標的化剤:

本明細書に使用されるとき、用語「筋標的化剤」は、筋細胞上に発現されている抗原へ特異的に結合する分子を指す。筋細胞中または筋細胞上の抗原は、膜タンパク質、例えば、内在性膜タンパク質または表在性膜タンパク質であってもよい。典型的には、筋標的化剤は、筋細胞中への筋標的化剤(および結び付けられたいずれの分子ペイロード)の内在化を容易にさせる筋細胞上の抗原へ特異的に結合する。いくつかの態様において、筋標的化剤は、筋肉上の内在化する細胞表面受容体へ特異的に結合し、受容体媒介内在化を通して筋細胞中へ内在化されることが可能である。いくつかの態様において、筋標的化剤は、小分子、タンパク質、ペプチド、核酸(例として、アブタマー)、または抗体である。いくつかの態様において、筋標的化剤は、分子ペイロードへ連結されている。

40

【 0 0 5 7 】

筋標的化抗体:

本明細書に使用されるとき、用語「筋標的化抗体」は、筋細胞中または筋細胞上に見出される抗原へ特異的に結合する抗体である筋標的化剤を指す。いくつかの態様において、

50

筋標的化抗体は、筋細胞中への筋標的化抗体(および結び付けられたいずれの分子ペイロード)の内在化を容易にする筋細胞上の抗原へ特異的に結合する。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、筋細胞上に存在する、内在化する細胞表面受容体へ特異的に結合する。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、トランスフェリン受容体へ特異的に結合する抗体である。

【 0 0 5 8 】

オリゴヌクレオチド:

本明細書に使用されるとき、用語「オリゴヌクレオチド」は、長さが最大200ヌクレオチドまでのオリゴマーの核酸化合物を指す。オリゴヌクレオチドの例は、これらに限定されないが、RNAlオリゴヌクレオチド(例として、siRNA、shRNA)、マイクロRNA、gapmer、mixmer、ホスホロジアミダイトモルホリノ、ペプチド核酸、アブタマー、ガイド核酸(例として、Cas9ガイドRNA)等々を包含する。オリゴヌクレオチドは一本鎖または二本鎖であってもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、1個以上の修飾ヌクレオチド(例として、2'-O-メチル糖修飾、プリンまたはピリミジン修飾)を含んでいてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、1個以上の修飾ヌクレオチド間連結を含んでいてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、RpまたはSpの立体化学配置にあってもよい1個以上のホスホロチオアート連結を含んでいてもよい。

10

【 0 0 5 9 】

組換え抗体:

用語「組換えヒト抗体」は、本明細書に使用されるとき、組換え手段によって調製、発現、創出、もしくは単離されたすべてのヒト抗体、たとえば、宿主細胞中へトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現された抗体(本開示により詳細に記載される)、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体(Hoogenboom H.R., (1997)TIB Tech.15:62-70;Azzazy H.,and Highsmith W.E.,(2002)Clin.Biochem.35:425-445;Gavilondo J.V.,and Larrick J.W.(2002)BioTechniques 29:128-145;Hoogenboom H.,and Chames P.(2000)Immunology Today 21:371-378)、ヒト免疫グロブリン遺伝子トランスジェニック動物(例として、マウス)から単離された抗体(例として、Taylor,L.D.,et al.(1992)Nucl.Acids Res.20:6287-6295;Kellermann S-A.,and Green L.L.(2002)Current Opinion in Biotechnology 13:593-597;Little M.et al(2000)Immunology Today 21:364-370を参照)、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列とのスプライシングを伴ういすれの他の手段によって調製、発現、創出、もしくは単離された抗体を包含することが意図される。かかる組換えヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。しかしながら、ある態様において、かかる組換えヒト抗体は、*in vitro*での変異誘発(または、ヒトIg配列トランスジェニック動物が使用されるとき、*in vivo*での体細胞変異誘発)へ供され、よって、組換え抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系のVH配列およびVL配列に由来しかつこれに関するとはいえ、*in vivo*でのヒト抗体の生殖細胞系列レパートリー内には天然に存在しないこともある配列である。本開示の一態様は、当該技術分野において周知である技法を使用して、たとえば、これらに限定されないが、ヒトIgファージライブラリ(たとえば、JermutusらのPCT刊行物第WO 2005/007699 A2号に開示されたもの)を使用する技法を使用して生成され得るヒトトランスフェリン受容体に結合することが可能な完全ヒト抗体を提供する。

20

【 0 0 6 0 】

相補性のある領域:

本明細書に使用されるとき、用語「相補性のある領域」は、2つのヌクレオチド配列が生理学的な条件下(例として、細胞中)相互にアニーリングすることが可能であるような、同族の(cognate)ヌクレオチド配列(例として、標的核酸のヌクレオチド配列)に充分に相補的であるヌクレオチド配列(例として、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列)を指す。いくつかの態様において、相補性のある領域は、標的核酸の同族のヌクレオチド配列に完全に相補的である。しかしながら、いくつかの態様において、相補性のある領域は、標

30

40

50

的核酸の同族のヌクレオチド配列に部分的に相補的(例として、少なくとも80%、90%、95%、または99%相補性)である。いくつかの態様において、相補性のある領域は、標的核酸の同族のヌクレオチド配列と比較して1個、2個、3個、または4個のミスマッチを含有する。

【0061】

特異的に結合する:

本明細書に使用されるとき、用語「特異的に結合する」は、結合アッセイまたは他の結合に関する文脈(binding context)において、分子が、適切な対照から結合パートナーを区別するために使用され得る親和性または結合活性の程度での、分子の、結合パートナーへの結合能を指す。抗体に関し、用語「特異的に結合する」は、親和性または結合活性の程度で(例として、本明細書に記載のとおり、抗原への結合を通してある細胞(例として、筋細胞)への優先的な標的化を許容する程度で)、適切な参照抗原、または抗体が他の抗原から特定の抗原を区別するために使用され得る抗原と比較して、抗体が特定の抗原へ結合する能力を指す。いくつかの態様において、抗体が標的へ結合する際少なくとも約 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M、またはこれ未満の K_D を有する場合、抗体は標的へ特異的に結合する。いくつかの態様において、抗体が、トランスフェリン受容体、例として、トランスフェリン受容体の先端ドメインのエピトープへ特異的に結合する。

10

【0062】

対象:

本明細書に使用されるとき、用語「対象」は、哺乳動物を指す。いくつかの態様において、対象は、霊長目の非ヒト動物または齧歯類の動物である。いくつかの態様において、対象は、ヒトである。いくつかの態様において、対象は、疾患有するかまたは疾患有すると疑われる患者/患畜(patient)、例として、ヒト患者である。いくつかの態様において、対象は、突然変異したDMD遺伝子配列、例としてDMD遺伝子配列のエキソンにおける突然変異に起因する疾患有するかまたはそれを有すると疑われるヒト患者である。いくつかの態様において、対象は、ジストロフィン異常症、例としてデュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する。

20

【0063】

トランスフェリン受容体:

30

本明細書に使用されるとき、用語「トランスフェリン受容体」(またTFRC、CD71、p90、またはTFR1としても知られている)は、エンドサイトーシスによる鉄取り込みを容易にするためのトランスフェリンへ結合する、内在化する細胞表面受容体を指す。いくつかの態様において、トランスフェリン受容体は、ヒト(NCBI Gene ID 7037)、霊長目の非ヒト動物(例として、NCBI Gene ID 711568もしくはNCBI Gene ID 102136007)、または齧歯類の動物(例として、NCBI Gene ID 22042)を起源としていてもよい。加えて、受容体の種々のアイソフォームをコードした複数のヒト転写産物バリエントが(例として、GenBank RefSeq受託番号:NP_001121620.1、NP_003225.2、NP_001300894.1、およびNP_001300895.1の注釈付きのものであるように)特徴付けられている。

40

【0064】

II. 複合体

本明細書に提供されるのは、標的化剤、例として、分子ペイロードへ共有結合的に連結された抗体を含む複合体である。いくつかの態様において、複合体は、オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された筋標的化抗体を含む。複合体は、単一の抗原部位に特異的に結合する抗体、または同じ抗原上もしくは異なる抗原上に存在していてもよい少なくとも2つの抗原部位へ結合する抗体を含んでいてもよい。

【0065】

複合体は、少なくとも1つの遺伝子、タンパク質、および/または核酸の活性あるいは機能をモジュレートするために使用されてもよい。いくつかの態様において、複合体とともに存在する分子ペイロードは、遺伝子、タンパク質、および/または核酸のモジュレーション

50

ンを担う。分子ペイロードは、細胞中の遺伝子、タンパク質、および/または核酸の活性あるいは機能をモジュレートすることが可能な、小分子、タンパク質、核酸、オリゴヌクレオチド、あるいはいずれの分子実体であってもよい。いくつかの態様において、分子ペイロードは、筋細胞における疾患関連反復を標的にするオリゴヌクレオチドである。

【0066】

いくつかの態様において、複合体は、エキソンスキッピングを促進するために、分子ペイロード(例として、突然変異したDMDアレルを標的にするmixmerアンチセンスオリゴヌクレオチド)へ共有結合的に連結された、筋標的化剤(例として、抗トランスフェリン受容体抗体)を含む。

【0067】

A. 筋標的化剤

本開示のいくつかの側面は、筋標的化剤、例として、分子ペイロードを筋細胞へ送達するための筋標的化剤を提供する。いくつかの態様において、かかる筋標的化剤は、例として、筋細胞上の抗原への特異的な結合を介して、筋細胞へ結合すること、および結び付けられた分子ペイロードを筋細胞へ送達することが可能である。いくつかの態様において、分子ペイロードは、筋標的化剤へ結合されて(例として、共有結合的に結合されて)おり、筋標的化剤が筋細胞上の抗原へ結合した際、例としてエンドサイトーシスを介して、筋細胞中へ内在化される。様々なタイプの筋標的化剤が本開示に従い使用されてもよいことは解されるはずである。例えば、筋標的化剤は、核酸(例として、DNAまたはRNA)、ペプチド(例として、抗体)、脂質(例として、マイクロベシクル)、または糖部(例として、多糖類)を含んでいてもよく、またはこれらからなっていてもよい。例示の筋標的化剤は本明細書中さらに詳細に記載されているが、しかしながら、本明細書に提供される例示の筋標的化剤が限定されることを意図していないことは解されるはずである。

10

【0068】

本開示のいくつかの側面は、骨格筋、平滑筋、または心筋などの筋肉上の抗原へ特異的に結合する筋標的化剤を提供する。いくつかの態様において、本明細書に提供される筋標的化剤のいずれも、骨格筋細胞、平滑筋細胞、および/または心筋細胞上の抗原へ結合する(例として、特異的に結合する)。

【0069】

筋肉特異的細胞表面認識要素(例として、細胞膜タンパク質)との相互作用によって、組織局在化と筋細胞への選択的取り込みとの両方が達成され得る。いくつかの態様において、筋肉の取り込みトランスポーターの基質である分子は、分子ペイロードを筋組織中へ送達するのに有用である。筋肉表面認識要素への結合、これに続くエンドサイトーシスは、抗体などの巨大分子さえも筋細胞へ侵入できる(enter)ようにし得る。別の例として、トランスフェリンまたは抗トランスフェリン受容体抗体へ抱合された分子ペイロードは、トランスフェリン受容体への結合を介し筋細胞によって取り入れられ得、次いで、例としてクラスリン媒介エンドサイトーシスを介し、形質膜陷入され(endocytosed)てもよい。

20

【0070】

筋標的化剤の使用は、他の組織において効果に関連する毒性を低減しつつ、筋肉中の分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチド)を濃縮するのに有用なこともある。いくつかの態様において、筋標的化剤は、対象内の別の細胞型と比較して、筋細胞中の結合された分子ペイロードを濃縮させる。いくつかの態様において、筋標的化剤は、筋細胞(例として、骨格筋細胞、平滑筋細胞、または心筋細胞)中の結合された分子ペイロードを、非筋細胞(例として、肝臓細胞、神経細胞、血液細胞、または脂肪細胞)中の量より少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、または100倍多い量で濃縮する。いくつかの態様において、筋標的化剤へ結合された場合の分子ペイロードの対象における毒性は、これが対象へ送達されたとき、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%、または95%低減される。

30

40

50

【0071】

いくつかの態様において、筋肉選択性を獲得するために、筋肉認識要素(例として、筋細胞抗原)が要されることもある。一例として、筋標的化剤は、筋肉特異的取り込みトランスポーターの基質である小分子であってもよい。別の例として、筋標的化剤は、トランスポーター媒介エンドサイトーシスを介して筋細胞へ侵入する抗体であってもよい。別の例として、筋標的化剤は、筋細胞上の細胞表面受容体へ結合するリガンドであってもよい。トランスポーターをベースとしたアプローチが細胞侵入への直通路を提供するのに対し、受容体をベースとした標的化が所望の作用部位に達するために刺激されたエンドサイトーシスを伴うこともあることは解されるはずである。

【0072】

i . 筋標的化抗体

いくつかの態様において、筋標的化剤は、抗体である。一般に、それらの標的抗原に対する抗体の高い特異性は、筋細胞(例として、骨格筋細胞、平滑筋細胞、および/または心筋細胞)を選択的に標的にする潜在力を提供する。この特異性はまた、オフターゲット毒性(off-target toxicity)を限定することもある。筋細胞の表面抗原を標的にすることが可能である抗体の例は報告されており、かつ本開示の範囲内にある。例えば、筋細胞の表面を標的にする抗体は、Arahata K.,et al. " Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide " Nature 1988;333:861-3;Song K.S.,et al. " Expression of caveolin-3 in skeletal,cardiac, and smooth muscle cells.Caveolin-3 is a component of the sarc 20 olemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glyco proteins " J Biol Chem 1996;271:15160-5;およびWeisbart R.H.et al., " Cell type specific targeted intracellular delivery into muscle of a monoclonal antibody that binds myosin IIb " Mol Immunol.2003 Mar,39(13):78309に記載されている;これらの各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0073】

a . 抗トランスフェリン受容体抗体

本開示のいくつかの側面は、トランスフェリン受容体、例として抗トランスフェリン受容体抗体へ結合する剤は筋細胞を標的にすることが可能であるという認識に基づく。トランフェリン受容体は、細胞膜を越えてトランスフェリンを輸送し細胞内鉄レベルの調節およびホメオスタシスに加わる内在化する細胞表面受容体である。本開示のいくつかの側面は、トランスフェリン受容体へ結合することが可能なトランスフェリン受容体結合タンパク質を提供する。結果的に、本開示の側面は、トランスフェリン受容体へ結合する結合タンパク質(例として、抗体)を提供する。いくつかの態様において、トランスフェリン受容体へ結合する結合タンパク質は、結合されたいずれの分子ペイロードと共に、筋細胞中へ内在化される。本明細書に使用されるとき、トランスフェリン受容体へ結合する抗体は、抗トランスフェリン受容体抗体と称されることもある。トランスフェリン受容体へ結合する、例として特異的に結合する抗体は、トランスフェリン受容体へ結合した際、例として受容体媒介エンドサイトーシスを通して、細胞中へ内在化されてもよい。

【0074】

抗トランスフェリン受容体抗体が、知られている数種の方法論、例としてファージディスプレーを使用するライプラリ設計を使用して、產生、合成、および/または誘導体化されてもよいことは解されるはずである。例示の方法論は当該技術分野において特徴付けられており、参照により組み込まれる(Diez,P.et al. " High-throughput phage-display screening in array format ",Enzyme and microbial technology,2015,79,34-41.;Christoph M.H.and Stanley,J.R. " Antibody Phage Display:Technique and Applications " J Invest Dermatol.2014,134:2.;Engleman,Edgar(Ed.) " Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies. " 1985,Springer)。他の態様において、抗トランスフェリン抗体はこれまでに特徴付けられているかまたは開示されている。トランスフェリン受容体へ特異的に結合する抗体は当該技術分野において知られている(例として、米国特許第4,3 40

64,934号、12/4/1979出願、“Monoclonal antibody to a human early thymocyte antigen and methods for preparing same”;米国特許第8,409,573号、6/14/2006出願、“Anti-CD71 monoclonal antibodies and uses thereof for treating malignant tumor cells”;米国特許第9,708,406号、5/20/2014出願、“Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use”;米国特許第9,611,323号、12/19/2014出願、“Low affinity blood brain barrier receptor antibodies and uses therefor”;WO 2015/098989、12/24/2014出願、“Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier”;Schneider C. et al. “Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9.” J Biol Chem. 1982, 257:14, 8516-8522.;Lee et al. “Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse” 2000, J Pharmacol. Exp. Ther., 292:1048-1052を参照)。

【0075】

いずれの適切な抗トランスフェリン受容体抗体も、本明細書に開示の複合体に使用されてよい。抗トランスフェリン受容体抗体の例は、関連する参照エピトープおよび結合エピトープも含め、表1中に列挙されている。いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、本明細書に提供される抗トランスフェリン受容体抗体、例として、表1中に列挙された抗トランスフェリン受容体抗体のいずれの相補性決定領域(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3)をも含む。

【0076】

表1 - 関連する参照エピトープおよび結合エピトープ情報も包含する、抗トランスフェリン受容体抗体クローニングリスト

【表1 - 1】

| 抗体クローニングの名称 | 参考文献(単数または複数) | エピトープ/注記 |
|-------------|--|---|
| OKT9 | 米国特許第4,364,934号、12/4/1979出願、表題“MONOCLONAL ANTIBODY TO A HUMAN EARLY THYMOCYTE ANTIGEN AND METHODS FOR PREPARING SAME” Schneider C.ら “Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9.” J Biol Chem. 1982, 257: 14, 8516-8522。 | TfRの先端ドメイン(ヒト TfR 配列 XM_052730.3 の残基 305~366、GenBankにおいて入手可能) |
| (JCR から) | • WO 2015/098989、12/24/2014出願、 | 先端ドメイン(TfR の残渣 230~244 |

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

| | | |
|--|---|---|
| クローン M11 クローン M23 クローン M27 クローン B84 | <p>“Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier”</p> <ul style="list-style-type: none"> 米国特許第 9,994,641 号、12/24/2014 出願、“Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier” | および 326～347) およびプロテアーゼ様ドメイン(残基 461～473) |
| (Genentech から) 7A4、8A2、15D2、 10D11、7B10、 15G11、16G5、 13C3、16G4、 16F6、7G7、4C2、 1B12、および 13D4 | <ul style="list-style-type: none"> WO 2016/081643、5/26/2016 出願、表題 “ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS OF USE” 米国特許第 9,708,406、5/20/2014 出願、“Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use” | 先端ドメインおよび非先端領域 |
| (Armagen から) 8D3 | <ul style="list-style-type: none"> Lee ら “Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse” 2000, J Pharmacol. Exp. Ther., 292: 1048–1052。 米国特許出願第 2010/077498 号、9/11/2008 出願、表題 “COMPOSITIONS AND METHODS FOR BLOOD-BRAIN BARRIER DELIVERY IN THE MOUSE” | 20 |
| OX26 | <ul style="list-style-type: none"> Haobam, B. ら 2014. Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A Streptococcus invasion. Cellular microbiology. 16: 1806–21。 | |
| DF1513 | <ul style="list-style-type: none"> Ortiz-Zapater E ら Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. Plant J 48:757–70 (2006)。 | 30 |
| 1A1B2、66IG10、 MEM-189、 JF0956、29806、 1A1B2、 TFRC/1818、1E6、 66Ig10、 TFRC/1059、 Q1/71、23D10、 13E4、 | <ul style="list-style-type: none"> 市販の抗トランスフェリン受容体抗体。 | Novus Biologicals 8100 Southpark Way, A-8 Littleton CO 80120 |

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

| | | |
|---|--|--|
| TFRC/1149、ER- MP21、YTA74.4、 BU54、2B6、RI7 217 | | |
| (INSERM から) BA120g | <ul style="list-style-type: none"> 米国特許出願第 2011/0311544A1 号、 6/15/2005 出願、表題 “ANTI-CD71 MONOCLONAL ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR TREATING MALIGNANT TUMOR CELLS” | OKT9 とは競合し ない |
| LUCA31 | <ul style="list-style-type: none"> 米国特許第 7,572,895 号、6/7/2004 出 願、表題 “TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES” | “LUCA31 エピトー ズ” |
| (Salk Institute) B3/25 T58/30 | <ul style="list-style-type: none"> Trowbridge, I. S.ら “Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin- antibody conjugates affect growth of human tumour cells.” Nature, 1981, 294 卷, 171 ~173 頁 | |
| R17 217.1.3, 5E9C11, OKT9(BE0023 クロ ーン) | <ul style="list-style-type: none"> 市販の抗トランスフェリン受容体抗体。 | BioXcell 10 Technology Dr., Suite 2B West Lebanon, NH 03784-1671 USA |
| BK19.9、B3/25、 T56/14 および T58/1 | <ul style="list-style-type: none"> Gatter, K. C.ら “Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance.” J Clin Pathol. 1983 May; 36(5): 539-45. | |

10

20

30

【0077】

いくつかの態様において、筋標的化剤は、抗トランスフェリン受容体抗体である。いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、本明細書に開示のとおりのアミノ酸配列を有するトランスフェリンタンパク質へ特異的に結合する。いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、トランスフェリン受容体のいずれの細胞外エピトープまたは抗体へ晒されるようになるエピトープ(先端ドメイン、トランスフェリン結合ドメイン、およびプロテアーゼ様ドメインを包含する)へ特異的に結合してもよい。いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、アミノ酸C89 ~ F760の範囲にある配列番号1 ~ 3に提供されるとおりの、ヒトまたは靈長目の非ヒト動物のトランスフェリン受容体のアミノ酸セグメントへ結合する。いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、少なくとも約 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M、またはこれ未満の結合親和性で特異的に結合する。本明細書において使用される抗トランスフェリン受容体抗体は、結合について、トランスフェリン受容体へ 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、またはこれ未満で結合する他の抗トランスフェリン受容体抗体(例として、OKT9、8D3)と競合することが可能であってもよい。

40

【0078】

NCBI配列NP_003225.2(トランスフェリン受容体タンパク質1アイソフォーム1、*homosapiens*)に対応する、ヒトトランスフェリン受容体アミノ酸配列の例は、以下のとおり

50

である:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFLSLARQVDGDNSHVEMLAVDEEENADNNNTKANVTK
 PKRCGGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAAR
 RLYWDDLKRKLSEKLDSTDFTGTLKLLNENSYVPREAGSQKDENCALYVENQFREFKLSK
 VWRDQHFVVKIQVKDSAQNVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGT
 KKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGH
 AHLGTGDPYTPGFPFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTD
 STCRMVTSESKNVKLTVSNLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAKSG
 VGTALLLKLAQMFSDMVLKDGFPQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFT
 YINLDKAVLGTTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDN
 AAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIK
 LTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDF
 GNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLPALLENLKLR
 KQNNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF(配列番号1)。

【 0 0 7 9 】

NCBI配列NP_001244232.1(トランスフェリン受容体タンパク質1、*Macaca mulatta*
 a)に対応する、靈長目の非ヒト動物トランスフェリン受容体アミノ酸配列の例は、以下の
 とおりである:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFLSLARQVDGDNSHVEMLGVDEEENTDNNTKPN GTK
 PKRCGGNICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFPAAP
 RLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENCALYIENQFREFKLSKV
 WRDQHFVVKIQVKDSAQNVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTK
 KDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLSFFGHA
 HLGTGDPYTPGFPFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTD
 TCKMVTSENKSVKLTVSNLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAKSSV
 GTALLLKLAQMFSDMVLKDGFPQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTY
 INLDKAVLGTTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSNWASKVEKLTLDNA
 AFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKL
 THDTELNLDYERYNSQLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDF
 RNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLSALLESLKLR
 RQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF(配列番号2)。

【 0 0 8 0 】

NCBI配列XP_005545315.1(トランスフェリン受容体タンパク質1、*Macaca fascicul*
aris)に対応する、靈長目の非ヒト動物トランスフェリン受容体アミノ酸配列の例は、以下の
 とおりである:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFLSLARQVDGDNSHVEMLGVDEEENTDNNTKANGTK
 PKRCGGNICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFPAAP
 RLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENCALYIENQFREFKLSKV
 WRDQHFVVKIQVKDSAQNVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTK
 KDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKADLSFFGHA
 HLGTGDPYTPGFPFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTD
 TCKMVTSENKSVKLTVSNLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAKSSV
 GTALLLKLAQMFSDMVLKDGFPQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTY
 INLDKAVLGTTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSNWASKVEKLTLDNA
 AFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKVARAAAEVAGQFVIKL
 THDTELNLDYERYNSQLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDF
 RNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLSALLESLKLR
 RQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF(配列番号3)。

【 0 0 8 1 】

NCBI配列NP_001344227.1(トランスフェリン受容体タンパク質1、*mus musculus*)

10

20

30

40

50

に対応する、マウストランスフェリン受容体アミノ酸配列の例は、以下のとおりである:
MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFLSLARQVDGDNSHVEMKLADEEENADNNMKASVRK
PKRFNGRLCFAAIALVIFFLIGFMMSGYLGYCKRVEQKEECVKLAETEETDKSETMETEDVP
TSSRLYWADLKTLSEKLNSIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYIENQFHEFKF
SKVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPTEVSGKLVHANF
GTTKKDFEELSYSVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKFPVVEADLALF
GHAHLGTDGYTPGFPNFNTQFPPSQQGLPNIPVQTISRAAAEKLFGKMEGSCPARWN
IDSSCKLELSQNQNQNVKLIVKNVLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVGAQRDALGAGVAAK
SSVGTGLLLKLAQVFSDMISKDGFRPSRSIIIFASWTAGDFGAVGATEWLEGYLSSLHLKAF
TYINLDKVVLGTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSLYRDSNWISKVEKLSFDN
AAYPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVPQLNQMVRTAAEVAGQLII
KLTHDVELNLDYEMYN SKLLSFMKDLNQFKTDIRD MGLSLQWLYSARGDYFRATSRLTT
DFHNAEKTNRFVMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPFRHIFWGSGSHTLSALVENLKL
RQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNIDNEF(配列番号4)。

いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、以下のとおりの受容体のアミノ酸セグメント:

FVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDL
YTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGH AHLGTD
PYTPGFPNFNTQFPPSQQGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKT DSTCRMVT
SESKNVKLT VSNVLKE(配列番号5)へ結合し、トランスフェリン受容体とトランスフェリンおよび/またはヒトヘモクロマトーシスタンパク質(またHFEとしても知られている)との間の結合相互作用を阻害しない。

【0082】

適切な方法論は、例として、組換えDNAプロトコルの使用を通じて、抗体、抗体フラグメント、もしくは抗原結合剤を得るか、および/または産生するために使用されてもよい。いくつかの態様において、抗体はまた、ハイブリドーマの生成を通しても産生されてよい(例として、Kohler, G and Milstein, C. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity" Nature, 1975, 256:495-497を参照)。関心のある抗原は、いずれの型または実体の、例として、組換え型もしくは天然に存在する型または実体の免疫原として使用されてもよい。ハイブリドーマは、標準的な方法、例としてELISAスクリーニングを使用してスクリーニングされることで、具体的な抗原を標的にする抗体を産生する少なくとも1個のハイブリドーマが見出される。抗体はまた、抗体を発現するタンパク質発現ライブラリ(例として、ファージディスプレーライブラリ)のスクリーニングを通しても産生されてよい。ファージディスプレーライブラリ設計はまた、いくつかの態様において使用されてもよい(例として、米国特許第5,223,409号、3/1/1991出願、"Directed evolution of novel binding proteins"; WO 1992/18619、4/10/1992出願、"Heterodimeric receptor libraries using phagemids"; WO 1991/17271、5/1/1991出願、"Recombinant library screening methods"; WO 1992/20791、5/15/1992出願、"Methods for producing members of specific binding pairs"; およびWO 1992/15679、2/28/1992出願、"Improved epitope displaying phage"を参照)。いくつかの態様において、関心のある抗原は、非ヒト動物、例として、齧歯類の動物またはヤギを免疫するために使用されてもよい。いくつかの態様において、次いで抗体が非ヒト動物から得られたら、任意に数多の方法論を使用し、例として組換えDNA技法を使用し、修飾してもよい。抗体産生および方法論の追加の例も当該技術分野において知られている(例として、Harlow et al. "Antibodies:A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照)。

【0083】

いくつかの態様において、抗体は修飾されている(例として、グリコシル化、リン酸化、SUMO化、および/またはメチル化を介して修飾されている)。いくつかの態様において、抗体は、1個以上の糖または炭水化物分子へ抱合されたグリコシル化抗体である。いくつ

10

20

30

40

50

かの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、N-グリコシル化、O-グリコシル化、C-グリコシル化、グリピエーション(GPIアンカー付着)、および/またはホスホグリコシル化を介して、抗体へ抱合されている。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、またはグリカンである。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、分枝オリゴ糖類または分枝グリカンである。いくつかの態様において、1個以上の糖または炭水化物分子は、マンノース単位、グルコース単位、N-アセチルグルコサミン単位、N-アセチルガラクトサミン単位、ガラクトース単位、フコース単位、またはホスホ脂質単位を包含する。いくつかの態様において、糖分子は、約1～10個、約1～5個、約5～10個、約1～4個、約1～3個、または約2個存在する。いくつかの態様において、グリコシル化抗体は、全体的にまたは部分的にグリコシル化されている。いくつかの態様において、抗体は、化学反応によって、または酵素的な手段によってグリコシル化されている。いくつかの態様において、抗体は、in vitroでまたは細胞(任意にN-またはO-グリコシル化経路中の酵素(例として、グリコシルトランسفエラーゼ)を欠乏していてもよい)内部でグリコシル化される。いくつかの態様において、抗体は、“Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof”という表題の2014年5月1日に公開された国際特許出願刊行物WO2014065661に記載のとおりの糖または炭水化物分子で官能化されている。

【0084】

本開示のいくつかの側面は、トランスフェリン受容体(例として、トランスフェリン受容体の細胞外部分)へ結合するタンパク質を提供する。いくつかの態様において、本明細書に提供される抗トランスフェリン受容体抗体は、トランスフェリン受容体(例として、ヒトトランスフェリン受容体)へ特異的に結合する。トランスフェリン受容体は、細胞膜を越えてトランスフェリンを輸送する、内在化する細胞表面受容体であって、細胞内鉄レベルの調節およびホメオスタシスに加わる。いくつかの態様において、本明細書に提供される抗トランスフェリン受容体抗体は、ヒト、靈長目の非ヒト動物、マウス、ラット等々からのトランスフェリン受容体へ特異的に結合する。いくつかの態様において、本明細書に提供される抗トランスフェリン受容体抗体は、ヒトトランスフェリン受容体へ結合する。いくつかの態様において、本明細書に提供される抗トランスフェリン受容体抗体は、ヒトトランスフェリン受容体へ特異的に結合する。いくつかの態様において、本明細書に提供される抗トランスフェリン受容体抗体は、ヒトトランスフェリン受容体の先端ドメインへ結合する。いくつかの態様において、本明細書に提供される抗トランスフェリン受容体抗体は、ヒトトランスフェリン受容体の先端ドメインへ特異的に結合する。

【0085】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つからのCDR-H(例として、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3)アミノ酸配列の1個以上を包含する。いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つに提供されるとおり、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を包含する。いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つに提供されるとおり、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を包含する。いくつかの態様において、抗トランスフェリン抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つに提供されるとおり、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を包含する。本開示はまた、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つに提供されるとおり、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、またはCDR-L3を含む分子をコードするいずれの核酸配列も包含する。いくつかの態様において、抗体重鎖および軽鎖CDR3ドメインは、抗体の抗原への結合特異性/親和性において具体的に重要な役割を果たすこともある。結果的に、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つの少なくとも重鎖および/または軽鎖CDR3を包含していてよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 6 】

いくつかの例において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体のいずれも、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のうち1つからのCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、および/またはCDR-L3配列のいずれかと実質的に同様の1以上のCDR(例として、CDR-HまたはCDR-L)配列を有する。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗体のVH(例として、CDR-H1、CDR-H2、もしくはCDR-H3)領域、および/またはVL(例として、CDR-L1、CDR-L2、もしくはCDR-L3)領域に沿う1以上のCDRの位置は、トランスフェリン受容体(例として、ヒトトランスフェリン受容体)への免疫特異的結合が維持される(例として、実質的に維持される、例えば、それが由来する元の抗体の結合に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%維持される)限り、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのアミノ酸位置によって変動し得る。例えば、いくつかの態様において、本明細書に記載のいずれの抗体のCDRを定義する位置は、トランスフェリン受容体(例として、ヒトトランスフェリン受容体)への免疫特異的結合が維持される(例として、実質的に維持される、例えば、それが由来する元の抗体の結合に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%維持される)限り、CDRのN末および/またはC末の境界をシフトすることによって、本明細書に記載の抗体のいずれか1つのCDR位置と比べ1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのアミノ酸位置によって変動し得る。別の態様において、本明細書に記載の抗体のVH(例として、CDR-H1、CDR-H2、もしくはCDR-H3)領域、および/またはVL(例として、CDR-L1、CDR-L2、もしくはCDR-L3)領域に沿う1以上のCDRの長さは、トランスフェリン受容体(例として、ヒトトランスフェリン受容体)への免疫特異的結合が維持される(例として、実質的に維持される、例えば、それが由来する元の抗体の結合に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%維持される)限り、1、2、3、4、5アミノ酸、またはそれより多くのアミノ酸によって変動し(例として、より短くまたはより長くなり)得る。

【 0 0 8 7 】

結果的に、いくつかの態様において、本明細書に記載のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、および/またはCDR-H3は、トランスフェリン受容体(例として、ヒトトランスフェリン受容体)への免疫特異的結合が維持される(例として、実質的に維持される、例えば、それが由来する元の抗体の結合に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%維持される)限り、本明細書に記載のCDR(例として、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれかからのCDR)の1以上より、1、2、3、4、5アミノ酸、またはそれより多くのアミノ酸の差で短くてもよい。いくつかの態様において、本明細書に記載のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、および/またはCDR-H3は、トランスフェリン受容体(例として、ヒトトランスフェリン受容体)への免疫特異的結合が維持される(例として、実質的に維持される、例えば、それが由来する元の抗体の結合に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%維持される)限り、本明細書に記載のCDR(例として、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれかからのCDR)の1以上より、1、2、3、4、5アミノ酸、またはそれより多くのアミノ酸の差で短くてもよい。いくつかの態様において、本明細書に記載のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、および/またはCDR-H3のアミノ部分は、トランスフェリン受容体(例として、ヒトトランスフェリン受容体)への免疫特異的結合が維持される(例として、実質的に維持される、例えば、それが由来する元の抗体の結合に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%維持される)限り、本明細書に記載のCDR(例として、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれかからのCDR)の1以上と比較して1、2、3、4、5アミノ酸、またはそれより多くのアミノ酸の差で伸長され得る。CDR-H2、および/またはCDR-H3のカルボキシ部分は、トランスフェリン受容体(例として、ヒトト

10

20

30

40

50

ランスフェリン受容体)への免疫特異的結合が維持される(例として、実質的に維持される、例えば、それが由来する元の抗体の結合に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%維持される)限り、本明細書に記載のCDR(例として、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれかからのCDR)の1以上と比較して1、2、3、4、5アミノ酸、またはそれより多くのアミノ酸の差で伸長され得る。いくつかの態様において、本明細書に記載のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、および/またはCDR-H3のアミノ部分は、トランスフェリン受容体(例として、ヒトトランスフェリン受容体)への免疫特異的結合が維持される(例として、実質的に維持される、例えば、それが由来する元の抗体の結合に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%維持される)限り、本明細書に記載のCDR(例として、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれかからのCDR)の1以上と比較して1、2、3、4、5アミノ酸、またはそれより多くのアミノ酸の差で短縮され得る。いくつかの態様において、本明細書に記載のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、および/またはCDR-H3のカルボキシ部分は、トランスフェリン受容体(例として、ヒトトランスフェリン受容体)への免疫特異的結合が維持される(例として、実質的に維持される、例えば、それが由来する元の抗体の結合に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%維持される)限り、本明細書に記載のCDR(例として、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれかからのCDR)の1以上と比較して1、2、3、4、5アミノ酸、またはそれより多くのアミノ酸の差で短縮され得る。いずれの方法も使用されて、トランスフェリン受容体(例として、ヒトトランスフェリン受容体)への免疫特異的結合が、例えば、結合アッセイおよび当該技術分野において記載されている条件を使用して、維持されるかどうかが解明され得る。

【0088】

いくつかの例において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体のいずれも、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つと実質的に同様の1以上のCDR(例として、CDR-HまたはCDR-L)配列を有する。例えば、抗体は、トランスフェリン受容体(例として、ヒトトランスフェリン受容体)への免疫特異的結合が維持される(例として、実質的に維持される、例えば、それが由来する元の抗体の結合に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%維持される)限り、本明細書に提供されるCDR(例として、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれかからのCDR)のいずれか1つにおいて対応するCDR領域と比較して、最大5、4、3、2、または1アミノ酸残基バリエーションまでを含有する表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれかからの1以上のCDR配列(単数または複数)を包含していてもよい。いくつかの態様において、本明細書に提供されるCDRのいずれかにおけるアミノ酸バリエーションのいずれも、保存的なバリエーションであってもよい。保存的なバリエーションは、その残基が、例えば結晶構造に基づき決定されるとおりの、トランスフェリン受容体タンパク質(例として、ヒトトランスフェリン受容体タンパク質)との相互作用に関与しなさそうな位置にて、CDR中へ導入され得る。本開示のいくつかの側面は、本明細書に提供される重鎖可変(VH)および/または軽鎖可変(VL)ドメインの1以上を含む抗トランスフェリン受容体抗体を提供する。いくつかの態様において、本明細書に提供されるVHドメインのいずれも、本明細書に提供されるCDR-H配列(例として、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3)の(例えば、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つにおいて提供されるCDR-H配列のいずれか)1以上を包含する。いくつかの態様において、本明細書に提供されるVLドメインのいずれも、本明細書に提供されるCDR-L配列(例として、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3)の(例えば、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つにおいて提供されるCDR-L配列のいずれか)1以上を包含する。

【0089】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択さ

10

20

30

40

50

れる抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つなどのいずれの抗トランスフェリン受容体抗体の重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインも包含するいずれの抗体も包含する。いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つなどのいずれの抗トランスフェリン受容体抗体の重鎖可変および軽鎖可変の対も包含するいずれの抗体も包含する。

【 0 0 9 0 】

本開示の側面は、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体のいずれかと相同的重鎖可変(VH)および/または軽鎖可変(VL)ドメインアミノ酸配列を有する抗トランスフェリン受容体抗体を提供する。いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つなどのいずれの抗トランスフェリン受容体抗体の重鎖可変配列および/またはいずれの軽鎖可変配列と少なくとも75%(例として、80%、85%、90%、95%、98%、または99%)同一の重鎖可変配列または軽鎖可変配列を含む。いくつかの態様において、相同的重鎖可変および/または軽鎖可変アミノ酸配列は、本明細書に提供されるCDR配列のいずれかの範囲内での変動はない。例えば、いくつかの態様において、配列バリエーションの程度(例として、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%)は、本明細書に提供されるCDR配列のいずれも除外する重鎖可変および/または軽鎖可変配列の範囲内で生じてもよい。いくつかの態様において、本明細書に提供される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれも、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つなどのいずれの抗トランスフェリン受容体抗体のフレームワーク配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一のフレームワーク配列を含む重鎖可変配列および軽鎖可変配列を含む。

【 0 0 9 1 】

いくつかの態様において、トランスフェリン受容体(例として、ヒトトランスフェリン受容体)へ特異的に結合する抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれかのCDR-Lドメイン(CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3)のいずれもまたは本明細書に提供されるCDR-Lドメインバリエントを含む、軽鎖可変VLドメインを含む。いくつかの態様において、トランスフェリン受容体(例として、ヒトトランスフェリン受容体)へ特異的に結合する抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つなどのいずれの抗トランスフェリン受容体抗体のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む、軽鎖可変VLドメインを含む。いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つなどのいずれの抗トランスフェリン受容体抗体の軽鎖可変領域配列のフレームワーク領域の1つ、2つ、3つ、または4つを含む、軽鎖可変(VL)領域配列を含む。いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つなどのいずれの抗トランスフェリン受容体抗体の軽鎖可変領域配列のフレームワーク領域の1つ、2つ、3つ、または4つと少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、または100%同一の軽鎖可変領域配列のフレームワーク領域の1つ、2つ、3つ、または4つを含む。いくつかの態様において、該アミノ酸配列に由来する軽鎖可変フレームワーク領域は、最大10アミノ酸までの置換、欠失、および/または挿入、好ましくは最大10アミノ酸までの置換の存在を別にした該アミノ酸配列からなる。いくつかの態様において、該アミノ酸配列に由来する軽鎖可変フレームワーク領域は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10アミノ酸残基が、対応する靈長目の非ヒト動物またはヒトの軽鎖可変フレームワーク領域中の類似した位置に見出されるアミノ酸と置換された該アミノ酸配列からなる。

【 0 0 9 2 】

いくつかの態様において、トランスフェリン受容体へ特異的に結合する抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つなどのいずれの抗トランスフェリン受容体抗体のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む。いくつかの態様において、抗体はさらに、ヒトもしくは靈長目の動物の抗体のVLに由来する1つ、2つ、3つ、または4つすべてのVLフレームワーク領域を含む。本明細書に記載の

10

20

30

40

50

軽鎖CDR配列との併用のための選択される抗体の靈長目の動物またはヒトの軽鎖フレームワーク領域は、例えば、非ヒト親抗体の軽鎖フレームワーク領域と、少なくとも70%(例として、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%、または少なくとも99%)の同一性を有し得る。選択される靈長目の動物またはヒトの抗体は、その軽鎖相補性決定領域において、本明細書に提供される抗体のいずれか(例として、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか)の軽鎖相補性決定領域のアミノ酸に対し、同じ数または実質的に同じ数のアミノ酸を有し得る。いくつかの態様において、靈長目の動物またはヒトの軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸残基は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つなどのいずれの抗トランスフェリン受容体抗体の軽鎖フレームワーク領域と少なくとも75%同一性、少なくとも80%同一性、少なくとも85%同一性、少なくとも90%同一性、少なくとも95%同一性、少なくとも98%同一性、少なくとも99%(またはこれを超える)同一性を有する、天然の靈長目の動物またはヒトの抗体軽鎖フレームワーク領域からのものである。いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体はさらに、ヒト軽鎖可変カッパサブファミリーに由来する1つ、2つ、3つ、または4つすべてのVLフレームワーク領域を含む。いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体はさらに、ヒト軽鎖可変ラムダサブファミリーに由来する1つ、2つ、3つ、または4つすべてのVLフレームワーク領域を含む。

【0093】

いくつかの態様において、本明細書に提供される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれも、軽鎖定常領域をさらに含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの態様において、軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダ軽鎖定常領域である。いくつかの態様において、カッパまたはラムダ軽鎖定常領域は、哺乳動物から、例として、ヒト、サル、ラット、またはマウスからのものである。いくつかの態様において、軽鎖定常領域は、ヒトカッパ軽鎖定常領域である。いくつかの態様において、軽鎖定常領域は、ヒトラムダ軽鎖定常領域である。本明細書に提供される軽鎖定常領域のいずれも、本明細書に提供される軽鎖定常領域のいずれかのバリエントであってもよいことは解されるはずである。いくつかの態様において、軽鎖定常領域は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つなどのいずれの抗トランスフェリン受容体抗体の軽鎖定常領域のいずれかと少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一のアミノ酸配列を含む。

【0094】

いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つなどの、いずれの抗トランスフェリン受容体抗体でもある。

【0095】

いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、表1から選択される抗トランスフェリン受容体抗体のいずれか1つなどのいずれの抗トランスフェリン受容体抗体のアミノ酸配列を含むVLドメインを含み、ここで定常領域は、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、もしくはIgY免疫グロブリン分子、またはヒトIgG、IgE、IgM、IgD、IgA、もしくはIgY免疫グロブリン分子の定常領域のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、VLドメイン、またはVLドメインのバリエントのいずれか、およびVHドメイン、またはVHドメインバリエントのいずれかを含み、ここでVLおよびVHドメイン、またはそれらのバリエントは、同じ抗体クローンからものであり、ここで定常領域は、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、もしくはIgY免疫グロブリン分子、いずれのクラス(例として、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2)またはいずれのサブクラス(例として、IgG2aおよびIgG2b)の免疫グロブリン分子の定常領域のアミノ酸配列を含む。ヒト定常領域の非限定例は当該技術分野において記載されており、例として、上記のKabat E Aら(1991)を参照。

【0096】

いくつかの態様において、本開示の抗体は、相対的に高い親和性で、例として、 $10^{-6} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $10^{-8} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $10^{-11} M$ 、またはこれより低いKDで、標的抗原(

例として、トランスフェリン受容体)に結合し得る。例えば、抗トランスフェリン受容体抗体は、5pMと500nMとの間の、例として50pMと100nMとの間の、例として500pMと50nMとの間の親和性で、トランスフェリン受容体タンパク質(例として、ヒトトランスフェリン受容体)へ結合し得る。本開示はまた、トランスフェリン受容体タンパク質(例として、ヒトトランスフェリン受容体)への結合について、本明細書に記載の抗体のいずれかと競合し、かつ50nM以下(例として、20nM以下、10nM以下、500pM以下、50pM以下、または5pM以下)の親和性を有する抗体も包含する。抗トランスフェリン受容体抗体の親和性および結合速度論は、これらに限定されないがバイオセンサ技術(例として、OCTETまたはBIACORE)を包含するいずれか好適な方法を使用して試験され得る。

【0097】

いくつかの態様において、本開示の抗体は、相対的に高い親和性で、例として、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、またはこれより低いKDで、標的抗原(例として、トランスフェリン受容体)へ結合し得る。例えば、抗トランスフェリン受容体抗体は、5pMと500nMとの間の、例として50pMと100nMとの間の、例として500pMと50nMとの間の親和性で、トランスフェリン受容体タンパク質(例として、ヒトトランスフェリン受容体)へ結合し得る。本開示はまた、トランスフェリン受容体タンパク質(例として、ヒトトランスフェリン受容体)への結合について、本明細書に記載の抗体のいずれかと競合し、かつ50nM以下(例として、20nM以下、10nM以下、500pM以下、50pM以下、または5pM以下)の親和性を有する抗体も包含する。抗トランスフェリン受容体抗体の親和性および結合速度論は、これらに限定されないがバイオセンサ技術(例として、OCTETまたはBIACORE)を包含するいずれか好適な方法を使用して試験され得る。

10

【0098】

いくつかの態様において、筋標的化剤は、抗トランスフェリン受容体抗体(例として、国際出願刊行物WO 2016/081643(参照により本明細書に組み込まれる)に記載のとおりの抗体およびそのバリエント)である。

【0099】

いくつかの態様において、種々の定義系に従う抗体の重鎖および軽鎖CDRは、表1.1中に提供される。種々の定義系、例として、Kabat定義、Chothia定義、および/またはContact定義は記載されている。例として、(例として、Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242, Chothia et al., (1989) Nature 342:877; Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, Al-Laziki et al (1997) J. Molec. Biol. 273: 927-948; およびAlmagro, J. Mol. Recognit. 17:132-143 (2004)。またhgmp.mrc.ac.ukおよびbioinf.org.uk/absも参照)を参照。

表1.1 マウス抗トランスフェリン受容体抗体の重鎖および軽鎖CDR

20

30

40

50

【表 2】

| CDRs | Kabat | Chothia | Contact |
|--------|---------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| CDR-H1 | SYWMH (配列番号 267) | GYTFTSY (配列番号 273) | TSYWMH (配列番号 275) |
| CDR-H2 | EINPTNGRTNYIEKFKS (配列番号 268) | NPTNGR (配列番号 274) | WIGEINPTNGRTN (配列番号 276) |
| CDR-H3 | GTRAYHY (配列番号 269) | GTRAYHY (配列番号 269) | ARGTRA (配列番号 277) |
| CDR-L1 | RASDNLYSNLA (配列番号 270) | RASDNLYSNLA (配列番号 270) | YSNLAWY (配列番号 278) |
| CDR-L2 | DATNLAD (配列番号 271) | DATNLAD (配列番号 271) | LLVYDATNLA (配列番号 279) |
| CDR-L3 | QHFWGTPLT (配列番号 272) | QHFWGTPLT (配列番号 272) | QHFWGTPL (配列番号 280) |

10

20

30

【0100】

重鎖可変ドメイン(VH)および軽鎖可変ドメイン配列の例もまた提供される:

【0101】

VH

QVQLQQPGAEVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGRT
NYIEKFKSATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSVTVSS(配
列番号 283)

【0102】

VL

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQGKSPQLLVYDATNLADGVP
SRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFWTPLTFGAGTKLELK(配列番号 284)

【0103】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、表1.1中に示さ
れるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3と同じCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含
む。代替的にまたは加えて、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、表1.1中に示さ
れるCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3と同じCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含
む。

【0104】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、表1.1に示され
るとおりのCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3と比較したとき、合わせてわずか5アミノ

40

50

酸バリエーション(例として、わずか5、4、3、2、または1アミノ酸バリエーション)を含有するCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む。「合わせて」は、3つの重鎖CDRすべてにおけるアミノ酸バリエーションの総数が、定義された範囲内にあることを意味する。代替的にまたは加えて、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、表1.1に示されるとおりのCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3と比較したとき、合わせてわずか5アミノ酸バリエーション(例として、わずか5、4、3、2または1アミノ酸バリエーション)を含有するCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含んでいてもよい。

【0105】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含むが、これらのうち少なくとも1つは、表1.1に示されるとおりの相当する(counterpart)重鎖CDRと比較したとき、わずか3アミノ酸バリエーション(例として、わずか3、2、または1アミノ酸バリエーション)を含有する。代替的にまたは加えて、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含んでいてもよいが、これらのうち少なくとも1つは、表1.1に示されるとおりの相当する軽鎖CDRと比較したとき、わずか3アミノ酸バリエーション(例として、わずか3、2、または1アミノ酸バリエーション)を含有する。

【0106】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、CDR-L3を含むが、これは、表1.1に示されるとおりのCDR-L3と比較したとき、わずか3アミノ酸バリエーション(例として、わずか3、2、または1アミノ酸バリエーション)を含有する。いくつかの態様において、本開示のトランスフェリン受容体抗体は、表1.1に示されるとおりのCDR-L3と比較したとき、1アミノ酸バリエーションを含有するCDR-L3を含む。いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、QHFAGTPLT(配列番号281、KabatおよびChothiaの定義系に従う)またはQHFAGTPL(配列番号282、Contact定義系に従う)のCDR-L3を含む。いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、表1.1中に示されるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3と同じCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、およびCDR-L2を含み、かつQHFAGTPLT(配列番号281、KabatおよびChothiaの定義系に従う)またはQHFAGTPL(配列番号282、Contact定義系に従う)のCDR-L3を含む。

【0107】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、合わせて、表1.1に示されるとおりの重鎖CDRと少なくとも80%(例として、80%、85%、90%、95%、または98%)同一の重鎖CDRを含む。代替的にまたは加えて、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、合わせて、表1.1に示されるとおりの軽鎖CDRと少なくとも80%(例として、80%、85%、90%、95%、または98%)同一の軽鎖CDRを含む。

【0108】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号283のアミノ酸配列を含むVHを含む。代替的にまたは加えて、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号284のアミノ酸配列を含むVLを含む。

【0109】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号283で表されるとおりのVHと比較したとき、わずか20アミノ酸バリエーション(例として、わずか20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸バリエーション)を含有するVHを含む。代替的にまたは加えて、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号284で表されるとおりのVLと比較したとき、わずか15アミノ酸バリエーション(例として、わずか20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸バリエーション)を含有するVLを含む。

【0110】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号283で

10

20

30

40

50

表されるとおりのVHと少なくとも80%(例として、80%、85%、90%、95%、または98%)同一のアミノ酸配列を含むVHを含む。代替的にまたは加えて、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号284で表されるとおりのVLと少なくとも80%(例として、80%、85%、90%、95%、または98%)同一のアミノ酸配列を含むVLを含む。

【0111】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、ヒト化抗体(例として、ヒト化されたバリアント)である。いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、表1.1中に示されるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3と同じCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、かつヒト化された重鎖可変領域および/またはヒト化された軽鎖可変領域を含む。10

【0112】

ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)からのその残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、またはウサギなどの非ヒト種(ドナー抗体)のCDRからの残基によって置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。いくつかの態様において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられている。さらにまた、ヒト化抗体は、レシピエント抗体から見出されない残基も、移入された(imported)CDRまたはフレームワーク配列から見出されない残基も含んでいてもよいが、抗体の性能をさらに洗練および最適化するために包含される残基を含むこともある。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインのすべてを実質的に含むであろうが、前記可変ドメインにおいて、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、かつFR領域のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン(典型的には、ヒト免疫グロブリンの)定常領域またはドメイン(Fc)の少なくとも一部も含むであろう。抗体は、WO 99/58572に記載のとおりに修飾されたFc領域を有していてもよい。ヒト化抗体の他の形態は、元の抗体に関して変更された1以上のCDR(1、2、3、4、5、6)を有しており、これらはまた、元の抗体からの1以上のCDRに由来する1以上のCDRとも呼ばれる。ヒト化抗体はまた、親和性成熟も伴うことがある。20

【0113】

いくつかの態様において、ヒト化は、CDR(例として、表1.1に示されるとおりの)をIGKV1-NL1*01およびIGHV1-3*01ヒト可変ドメイン中へ接合させることによって達成される。いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、位置9、13、17、18、40、45、および70での1以上のアミノ酸置換(配列番号284で表されるとおりのVLと比較したとき)、および/または位置1、5、7、11、12、20、38、40、44、66、75、81、83、87、および108での1以上のアミノ酸置換(配列番号283で表されるとおりのVHと比較したとき)を含むヒト化されたバリアントである。いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、位置9、13、17、18、40、45、および70のすべてでのアミノ酸置換(配列番号284で表されるとおりのVLと比較したとき)、および/または位置1、5、7、11、12、20、38、40、44、66、75、81、83、87、および108のすべてでのアミノ酸置換(配列番号283で表されるとおりのVHと比較したとき)を含むヒト化されたバリアントである。3040

【0114】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、ヒト化抗体であって、配列番号284で表されるとおりのVLの位置43および48での残基を含有する。代替的にまたは加えて、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、ヒト化抗体であって、配列番号283で表されるとおりのVHの位置48、67、69、71、および73での残基を含有する。

【0115】

本開示に従い使用されてもよいヒト化抗体の例の、VHおよびVLアミノ酸配列は、以下に提供される：

10

20

30

40

50

【 0 1 1 6 】

ヒト化されたVH

EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINPTNGRT
NYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMVTVSS(配列番号285)

【 0 1 1 7 】

ヒト化されたVL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLA WYQQKPGKSPKLLVYDATNLADGVPS
RFSGSGSGTDYSLKINS LQSEDFGTYYCQHF WGTP LTFGAGTKLELK(配列番号286)

【 0 1 1 8 】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号285のアミノ酸配列を含むVHを含む。代替的にまたは加えて、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号286のアミノ酸配列を含むVLを含む。

【 0 1 1 9 】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号285で表されるとおりのVHと比較したとき、わずか20アミノ酸バリエーション(例として、わずか20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸バリエーション)を含有するVHを含む。代替的にまたは加えて、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号286で表されるとおりのVLと比較したとき、わずか15アミノ酸バリエーション(例として、わずか20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸バリエーション)を含有するVLを含む。

【 0 1 2 0 】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号285で表されるとおりのVHと少なくとも80%(例として、80%、85%、90%、95%、または98%)同一のアミノ酸配列を含むVHを含む。代替的にまたは加えて、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号286で表されるとおりのVLと少なくとも80%(例として、80%、85%、90%、95%、または98%)同一のアミノ酸配列を含むVLを含む。

【 0 1 2 1 】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、位置43および48の1以上でのアミノ酸置換(配列番号284で表されるとおりのVLと比較したとき)、および/または位置48、67、69、71、および73の1以上でのアミノ酸置換(配列番号283で表されるとおりのVHと比較したとき)を含むヒト化されたバリエントである。いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、S43Aおよび/またはV48L突然変異(配列番号284で表されるとおりのVLと比較したとき)、および/またはA67V、L69I、V71R、およびK73T突然変異の1以上(配列番号283で表されるとおりのVHと比較したとき)を含むヒト化されたバリエントである。

【 0 1 2 2 】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、位置9、13、17、18、40、43、48、45、および70の1以上でのアミノ酸置換(配列番号284で表されるとおりのVLと比較したとき)、および/または位置1、5、7、11、12、20、38、40、44、48、66、67、69、71、73、75、81、83、87、および108の1以上でのアミノ酸置換(配列番号283で表されるとおりのVHと比較したとき)を含むヒト化されたバリエントである。

【 0 1 2 3 】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、ヒト抗体からの重鎖定常領域および軽鎖定常領域を包含し得るキメラ抗体である。キメラ抗体は、第1の種からの可変領域または一部の可変領域、および第2の種からの定常領域を有する抗体を指す。典型的には、これらのキメラ抗体において、軽鎖と重鎖との両方の可変領域は、ある種の哺乳動物(例として、マウス、ウサギ、およびラットなどの非ヒト哺乳動物)に由来

10

20

30

40

50

する抗体の可変領域を模倣する一方で、定常部は、ヒトなどの別の哺乳動物に由来する抗体中の配列と相同である。いくつかの態様において、アミノ酸修飾は、可変領域および/または定常領域においてなされ得る。

【0124】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、ヒト抗体からの重鎖定常領域および軽鎖定常領域を包含し得るキメラ抗体である。キメラ抗体は、第1の種からの可変領域または一部の可変領域、および第2の種からの定常領域を有する抗体を指す。典型的には、これらのキメラ抗体において、軽鎖と重鎖との両方の可変領域は、ある種の哺乳動物(例として、マウス、ウサギ、およびラットなどの非ヒト哺乳動物)に由来する抗体の可変領域を模倣する一方で、定常部は、ヒトなどの別の哺乳動物に由来する抗体中の配列と相同である。いくつかの態様において、アミノ酸修飾は、可変領域および/または定常領域においてなされ得る。

10

【0125】

いくつかの態様において、本明細書に記載のとおりの抗トランスフェリン受容体抗体のいずれの重鎖も、重鎖定常領域(CH)またはこの一部(例として、CH1、CH2、CH3、またはそれらの組み合わせ)を含んでいてもよい。重鎖定常領域は、いずれの好適な起源、例として、ヒト、マウス、ラット、またはウサギに属し得る。特定の一例において、重鎖定常領域は、ヒトIgG(ガンマ重鎖)、例として、IgG1、IgG2、またはIgG4からのものである。例示のヒトIgG1定常領域は、下に与えられる：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSS
GLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLmisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号287)。

20

【0126】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体のいずれの軽鎖も、軽鎖定常領域(CL)をさらに含んでいてもよいが、これは当該技術分野において知られているいずれのCLでもあり得る。いくつかの例において、CLは、カッパ軽鎖である。他の例において、CLは、ラムダ軽鎖である。いくつかの態様において、CLはカッパ軽鎖であって、その配列は下に与えられる：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSS
GLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP(配列番号288)
。

30

【0127】

他の抗体の重鎖および軽鎖定常領域は当該技術分野において周知であり、例として、IMGTデータベース([www.imgt.org](http://www/imgt.org))において、またはwww.vbase2.org/vbstat.phpにて提供されるものであるが、これらの両方とも、参照により本明細書に組み込まれる。

【0128】

記載される抗トランスフェリン受容体抗体の、例示の重鎖および軽鎖アミノ酸配列は、下に提供される：

40

【0129】

重鎖(VH+ヒトIgG1定常領域)
QVQLQQPGAEVLKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGRT
NYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYCARGTRAYHYWGQGTSVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGL
YSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLmisRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW

50

QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号289)

【0130】

軽鎖(VL+カッパ軽鎖)

QVQLQQPGAEVLVPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGRT
NYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLSEDASAVYYCARGTRAYHYWGQGTSVTVSSA
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP(配列番号290)

【0131】

重鎖(ヒト化VH+ヒトIgG1定常領域)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINPTNGRT
NYIEKFKS RATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGP
SVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号291)

10

【0132】

軽鎖(ヒト化VL+カッパ軽鎖)

DIQM TQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNLADGVPS
RFSGSGSGTDYSLKINS LQSEDFGTYYCQHF WGTPLTGAGTKLELKASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP(配列番号292)

20

【0133】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号289と少なくとも80%(例として、80%、85%、90%、95%、または98%)同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。代替的にまたは加えて、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号290と少なくとも80%(例として、80%、85%、90%、95%、または98%)同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号289のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。代替的にまたは加えて、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号290のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

30

【0134】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号289で表されるとおりの重鎖と比較したとき、わずか20アミノ酸バリエーション(例として、わずか20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸バリエーション)を含有する重鎖を含む。代替的にまたは加えて、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号290で表されるとおりの軽鎖と比較したとき、わずか15アミノ酸バリエーション(例として、わずか20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸バリエーション)を含有する軽鎖を含む。

40

【0135】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号291と少なくとも80%(例として、80%、85%、90%、95%、または98%)同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。代替的にまたは加えて、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号292と少なくとも80%(例として、80%、85%、90%、95%、または98%)同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号291のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。代替的にまたは加えて、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号292のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

50

【0136】

いくつかの態様において、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号289で表されるとおりのヒト化抗体の重鎖と比較したとき、わずか20アミノ酸バリエーション(例として、わずか20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸バリエーション)を含有する重鎖を含む。代替的にまたは加えて、本開示の抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号290で表されるとおりのヒト化抗体の軽鎖と比較したとき、わずか15アミノ酸バリエーション(例として、わずか20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸バリエーション)を含有する軽鎖を含む。

【0137】

10

いくつかの態様において、抗トランスフェリン受容体抗体は、無傷の抗体(完全長抗体)の抗原結合性フラグメント(FAB)である。無傷の抗体(完全長抗体)の抗原結合性フラグメントは、定型的な方法を介して調製され得る。例えば、F(ab')2フラグメントは、抗体分子のペプシン消化によって產生され得、Fabフラグメントは、F(ab')2フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成され得る。本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体の例示のFABアミノ酸配列は、下に提供される:

【0138】

重鎖FAB(VH+一部のヒトIgG1定常領域)

QVQLQQPGAEVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGRT
NYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP(配列番号293)

20

【0139】

重鎖FAB(ヒト化VH+一部のヒトIgG1定常領域)

EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINPTNGRT
NYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP(配列番号294)

30

【0140】

本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、これらに限定されないが、無傷の(すなわち、完全長)抗体、それらの抗原結合性フラグメント(Fab、Fab'、F(ab')2、Fvなどの)、単一鎖抗体、二重特異性抗体、またはナノボディーを包含する、いずれの抗体の形態でもあり得る。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、scFvである。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、scFv-Fab(例として、一部の定常領域と縮合されたscFv)である。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、定常領域(例として、配列番号289で表されるとおりのヒトIgG1定常領域)と縮合されたscFvである。

【0141】

b . 他の筋標的化抗体

いくつかの態様において、筋標的化抗体は、ヘモジュベリン(hemojuvelin)、カベオリン-3、デュシェンヌ型筋ジストロフィーペプチド、ミオシンlib、またはCD63に特異的に結合する抗体である。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、筋原性前駆体タンパク質に特異的に結合する抗体である。例示の筋原性前駆体タンパク質は、限定せずに、ABC G2、M-カドヘリン/カドヘリン-15、カベオリン-1、CD34、FoxK1、インテグリンアルファ7、インテグリンアルファ7ベータ1、MYF-5、MyoD、ミオゲニン、NCAM-1/CD56、Pax3、Pax7、およびPax9を包含する。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、骨格筋タンパク質に特異的に結合する抗体である。例示の骨格筋タンパク質は、限定せずに、アルファ-サルコグリカン、ベータ-サルコグリカン、カルバインインヒビター、クリアチンキナーゼMM/CKMM、eIF5A、エノラーゼ2/ニューロン特異的エノラーゼ、イプシロン-サルコグリカン、FABP3/H-FABP、GDF-8/ミオスタチン、GDF-11/GDF-8、イン

40

50

テグリンアルファ7、インテグリンアルファ7ベータ1、インテグリンベータ1/CD29、MC AM/CD146、MyoD、ミオゲニン、ミオシン軽鎖キナーゼインヒビター、NCAM-1/CD56、およびトロポニンIを包含する。いくつかの態様において、筋標的化抗体は、平滑筋タンパク質に特異的に結合する抗体である。例示の平滑筋タンパク質は、限定せずに、アルファ-平滑筋アクチン、VE-カドヘリン、カルデスモン/CALD1、カルポニン1、デスミン、ヒスタミンH2 R、モチリンR/GPR38、トランスジェリン(Transgelin)/TAGLN、およびビメンチンを包含する。しかしながら、追加の標的への抗体が本開示の範囲内であること、および本明細書に提供される標的の例示のリストが限定することを意図していないことは解されるはずである。

【0142】

10

c . 抗体特色/変更

いくつかの態様において、保存的突然変異は、例えば結晶構造に基づき決定されるとき、その残基が標的抗原(例として、トランスフェリン受容体)との相互作用に関与しそうにない位置にて、抗体配列(例として、CDRまたはフレームワーク配列)中へ導入され得る。いくつかの態様において、1、2個以上の突然変異(例として、アミノ酸置換)は、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、および/または細胞への抗原依存的細胞傷害性などの、抗体の1以上の機能特性を変更させるために、本明細書に記載の筋標的化抗体のFc領域中(例として、Kabatナンバリング系(例として、KabatのEUインデックス)に従うナンバリングで、CH2ドメイン(ヒトIgG1の残基231～340)中、および/またはCH3ドメイン(ヒトIgG1の残基341～447)中、および/またはヒンジ領域中)へ導入される。

【0143】

20

いくつかの態様において、1、2個以上の突然変異(例として、アミノ酸置換)は、ヒンジ領域中のシステイン残基の数が、例として米国特許第5,677,425号に記載のとおり変動(例として、増大または減少)され得るように、Fc領域(CH1ドメイン)のヒンジ領域中へ導入される。CH1ドメインのヒンジ領域中のシステイン残基の数は、例として、軽鎖および重鎖の会合(assembly)を容易にさせるため、または抗体の安定性を変更(例として、増大もしくは減少)するため、またはリンカー抱合を容易にさせるため、変更され得る。

【0144】

30

いくつかの態様において、1、2個以上の突然変異(例として、アミノ酸置換)は、抗体の、エフェクター細胞表面上のFc受容体(例として、活性化されたFc受容体)への親和性を増加または減少させるため、本明細書に記載の筋標的化抗体のFc領域中(例として、Kabatナンバリング系(例として、KabatのEUインデックス)に従うナンバリングで、CH2ドメイン(ヒトIgG1の残基231～340)中、および/またはCH3ドメイン(ヒトIgG1の残基341～447)中、および/またはヒンジ領域中)へ導入される。抗体のFc受容体への親和性を増大または減少させる抗体のFc領域中の突然変異、およびかかる突然変異をFc受容体中またはそのフラグメント中へ導入するための技法は、当業者に知られている。抗体のFc受容体への親和性を変更するためになされ得る、抗体のFc受容体中の突然変異の例は、例として、Smith P et al.,(2012)PNAS 109:6181-6186、米国特許第6,737,056号、ならびに国際刊行物第WO 02/060919号;第WO 98/23289号;および第WO 97/34631号(これらは参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。

【0145】

40

いくつかの態様において、1、2個以上のアミノ酸突然変異(すなわち、置換、挿入、または欠失)は、in vivoでの抗体の半減期を変更(例として、増加または減少)させるため、IgG定常領域またはそのFcRn-結合フラグメント(好ましくは、Fcまたはヒンジ-Fcドメインフラグメント)中へ導入される。例えば、in vivoでの抗体の半減期を変更(例として、増加または減少)させるであろう突然変異について、例として、国際刊行物第WO 02/060919号;第WO 98/23289号;および第WO 97/34631号;ならびに米国特許第5,869,046号、第6,121,022号、第6,277,375号、および第6,165,745号を参照。

【0146】

50

いくつかの態様において、1、2個以上のアミノ酸突然変異(すなわち、置換、挿入、ま

たは欠失)は、*in vivo*での抗トランスフェリン受容体抗体の半減期を減少させるため、Ig G定常領域またはそのFcRn-結合フラグメント(好ましくは、Fcまたはヒンジ-Fcドメインフラグメント)中へ導入される。いくつかの態様において、1、2個以上のアミノ酸突然変異(すなわち、置換、挿入、または欠失)は、*in vivo*での抗体の半減期を増加させるため、IgG定常領域またはそのFcRn-結合フラグメント(好ましくは、Fcまたはヒンジ-Fcドメインフラグメント)中へ導入される。いくつかの態様において、抗体は、KabatのEUインデックス(上記のKabat E Aら(1991))に従うナンバリングで第2定常(CH2)ドメイン(ヒトIg G1の残基231～340)中および/または第3定常(CH3)ドメイン(ヒトIg G1の残基341～447)中に、1個以上のアミノ酸突然変異(例として、置換)を有し得る。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗体のIg G1定常領域は、KabatにあるようなEUインデックスに従ってナンバリングされた位置252におけるメチオニン(M)からチロシン(Y)への置換、位置254におけるセリン(S)からトレオニン(T)への置換、および位置256におけるトレオニン(T)からグルタミン酸(E)への置換を含む。米国特許第7,658,921(これは、参照により本明細書に組み込まれる)を参照。「YTE突然変異体」と称されるこのタイプの突然変異Ig Gは、同じ抗体の野生型バージョンと比較して4倍増大した半減期を発揮したことが示されている(Dall'Acqua W F et al.,(2006)J Biol Chem 281:23514-24を参照)。いくつかの態様において、抗体は、KabatにあるようなEUインデックスに従ってナンバリングされた位置251～257、285～290、308～314、385～389、および428～436でのアミノ酸残基の、1、2、3以上のアミノ酸置換を含むIg G定常領域を含む。

【0147】

いくつかの態様において、1、2以上のアミノ酸置換は、抗トランスフェリン受容体抗体のエフェクター機能(単数または複数)を変更するため、Ig G定常領域Fc領域中へ導入される。自身への親和性が変更されたエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1構成要素であり得る。このアプローチは、米国特許第5,624,821号および第5,648,260号においてさらに詳細に記載される。いくつかの態様において、定常領域ドメインの欠失または不活化(点突然変異または他の手段を通して)は、循環抗体のFc受容体への結合を低減し、それによって腫瘍局在化を増大し得る。定常領域を欠失または不活化し、それによって腫瘍局在化を増大させる突然変異の記載については、例として、米国特許第5,585,097号および第8,591,886号を参照。いくつかの態様において、1以上のアミノ酸置換は、Fc領域上の潜在的なグリコシル化部位を除去するため(これによってFc受容体への結合が低減されることもある)、本明細書に記載の抗体のFc領域中へ導入されてもよい(例として、Shields R L et al.,(2001)J Biol Chem 276:6591-604を参照)。

【0148】

いくつかの態様において、本明細書に記載の筋標的化抗体の定常領域中の1以上のアミノ酸残基は、抗体が変更されたCIq結合および/または低減もしくは消失された補体依存性細胞傷害性(CDC)を有し得るように、異なるアミノ酸残基に置き換えられ得る。このアプローチは、米国特許第6,194,551号(Idusogieら)においてさらに詳細に記載されている。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗体のCH2ドメインのN末領域中の1以上のアミノ酸残基は変更されて、それによって抗体の補体結合能を変更する。このアプローチは、国際刊行物第WO 94/29351号においてさらに記載されている。いくつかの態様において、本明細書に記載の抗体のFc領域は、抗体の、細胞への抗体依存性細胞傷害性(ADCC)の媒介能を増大させるため、および/または抗体のFc受容体への親和性を増大させるため、修飾されている。このアプローチは、国際刊行物第WO 00/42072号においてさらに記載されている。

【0149】

いくつかの態様において、本明細書に提供される抗体の重鎖および/または軽鎖可変ドメイン(単数または複数)配列(単数または複数)は、本明細書の他の箇所に記載されるとおり、例えば、CDR接合抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、もしくは複合ヒト抗体、または抗原結合性フラグメントを生成するために使用され得る。当業者によって理解されるとおり、本明細書に提供される抗体のいずれかに由来するいずれのバリエント、CDR接合抗体、キ

10

20

30

40

50

メラ抗体、ヒト化抗体、または複合抗体は、本明細書に記載の組成物および方法に有用であってもよく、バリアント、CDR接合抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または複合抗体が、これが由来する元の抗体と比べて、トランスフェリン受容体への少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%以上の結合を有し得るように、トランスフェリン受容体への特異的結合能を維持するであろう。

【 0 1 5 0 】

いくつかの態様において、本明細書に提供される抗体は、所望の特性を抗体へ付与する突然変異を含む。例えば、ネイティブな IgG4 mAb に生じることが知られている Fab アーム交換(Fab-arm exchange)に起因する潜在的合併症を回避するため、本明細書に提供される抗体は、安定化「Adair」突然変異を含んでいてもよく(Angal S., et al., "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody", Mol Immunol 30, 105-108; 1993)、ここでセリン228(EUナンバリング; 残基241 Kabatナンバリング)は、IgG1様ヒンジ配列をもたらすプロリンへ変換されている。結果的に、抗体のいずれも、安定化「Adair」突然変異を包含していてもよい。

10

【 0 1 5 1 】

本明細書に提供されるとおり、本開示の抗体は、任意に、定常領域またはその一部を含んでいてもよい。例えば、VLドメインは、そのC末端にて、軽鎖定常領域様C またはC へ付着されていてもよい。同様に、VHドメインまたはその一部は、すべてのまたは一部の重鎖様IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、およびいずれのアイソタイプのサブクラスへ付着されていてもよい。抗体は、好適な定常領域を包含していてもよい(例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991) を参照)。したがって、本開示の範囲内の抗体は、いずれの好適な定常領域と組み合わされて、VHおよびVLドメイン、またはその抗原結合部を包含していてもよい。

20

【 0 1 5 2 】

ii . 筋標的化ペプチド

本開示のいくつかの側面は、筋標的化ペプチドを筋標的化剤として提供する。特定の細胞型へ結合する短いペプチド配列(例として、長さが5~20アミノ酸のペプチド配列)は記載されている。例えば、細胞標的化ペプチドは、Vines e., et al., A. "Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery" Biochim Biophys Acta 2008; 1786: 126-38; Jarver P., et al., "In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery" Trends Pharmacol Sci 2010; 31: 528-35; Samoylova T.I., et al., "Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening" Muscle Nerve 1999; 22: 460-6; 米国特許第6,329,501号、2001年12月11日発行、表題 "METHODS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING COMPOUNDS TO MUSCLE"; および Samoylov A.M., et al., "Recognition of cell-specific binding of phage display derived peptides using an acoustic wave sensor." Biomol Eng 2002; 18: 269-72 に記載されている; これら各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。特定の細胞表面抗原(例として、受容体)と相互作用するようにペプチドを設計することによって、所望される組織、例として、筋肉への選択性が獲得され得る。骨格筋標的化が調査されており、広範な分子ペイロードが送達することができる。巨大な抗体またはウイルス粒子についての実際上の不利な点の多くが存在しないこれらのアプローチは、筋組織への高選択性を有してもよい。結果的に、いくつかの態様において、筋標的化剤は、長さが4アミノ酸から50アミノ酸までの筋標的化ペプチドである。いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは、長さが4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸である。筋標的化ペプチドは、ファージディスプレーなどの数種の方法のいずれかを使用して生成され得る。

30

40

50

【0153】

いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは、他のある細胞と比較して、筋細胞において過剰発現されているかまたは相対的に高度に発現されている、内在化する細胞表面受容体(例として、トランスフェリン受容体)へ結合してもよい。いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは、トランスフェリン受容体を標的にしてもよい(例として、トランスフェリン受容体へ結合してもよい)。いくつかの態様において、トランスフェリン受容体を標的にするペプチドは、天然に存在するリガンド、例として、トランスフェリンのセグメントを含んでいてもよい。いくつかの態様において、トランスフェリン受容体を標的にするペプチドは、米国特許第6,743,893号、11/30/2000出願、「RECEPTOR-MEDIATED UPTAKE OF PEPTIDES THAT BIND THE HUMAN TRANSFERRIN RECEPTOR」に記載のとおりである。いくつかの態様において、トランスフェリン受容体を標的にするペプチドは、Kawamoto, M. et al, "A novel transferrin receptor-targeted hybrid peptide disintegrates cancer cell membrane to induce rapid killing of cancer cells ." BMC Cancer. 2011 Aug 18;11:359に記載のとおりである。いくつかの態様において、トランスフェリン受容体を標的にするペプチドは、米国特許第8,399,653号、5/20/2011出願、「TRANSFERRIN/TRANSFERRIN RECEPTOR-MEDIATED SIRNA DELIVERY」に記載のとおりである。

10

【0154】

上述のとおり、筋標的化ペプチドの例は報告されている。例えば、筋肉特異的ペプチドは、表面ヘプタペプチドを提示するファージディスプレーライブライアリを使用して同定された。一例として、アミノ酸配列ASSLNIA(配列番号6)を有するペプチドは、*in vitro*でC2C12マウス筋管へ結合し、かつ*in vivo*でマウス筋組織へ結合した。結果的に、いくつかの態様において、筋標的化剤は、アミノ酸配列ASSLNIA(配列番号6)を含む。このペプチドは、肝臓、腎臓、および脳への結合が低減された、マウスへの静脈内注射後的心筋組織および骨格筋組織への結合について改善された特異性を発揮した。追加の筋肉特異的ペプチドがファージディスプレーを使用して同定されている。例えば、DMDへの処置という文脈において、12アミノ酸ペプチドが、筋標的化のためのファージディスプレーライブライアリによって同定された。Yoshida D.,et al., "Targeting of salicylate to skin and muscle following topical injections in rats." Int J Pharm 2002;231:177-84を参照;この内容全体はこれによって参照により組み込まれる。ここで、配列SKTFNTHPQSTP(配列番号7)を有する12アミノ酸ペプチドが同定され、この筋標的化ペプチドは、ASSLNIA(配列番号6)ペプチドと比べてC2C12細胞への改善された結合を示した。

20

【0155】

他の細胞型より筋肉(例として、骨格筋)に対して選択的なペプチドを同定するためのいずれの追加の方法は*in vitro*での選択を包含し、これはGhosh D.,et al., "Selection of muscle-binding peptides from context-specific peptide-presenting phage libraries for adenoviral vector targeting" J Virol 2005;79:13667-72に記載されている;この内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。ランダム12-merペプチドファージディスプレーライブライアリを非筋細胞型の混合物とプレインキュベートすることによって、非特異的細胞バインダーが選出された。選択ラウンド(rounds of selection)を受けて、12アミノ酸ペプチドTARGETHKEELI(配列番号8)が最も頻繁に現れた。結果的に、いくつかの態様において、筋標的化剤は、アミノ酸配列TARGETHKEELI(配列番号8)を含む。

30

【0156】

筋標的化剤は、アミノ酸含有分子またはペプチドであってもよい。筋標的化ペプチドは、筋細胞から見出されたタンパク質受容体へ優先的に結合するタンパク質の配列に対応していてもよい。いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは、ペプチドが筋細胞を優先的に標的にし得るように、疎水性アミノ酸(例として、バリン)の性質(propensity)を高く含有する。いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは、これまでに特徴付けも開示もされていない。これらのペプチドは、数種の方法論のいずれか、例として、ファージディスプレードペプチドライブライアリ、1ビーズ・1化合物(one-bead one-compound)ペプチ

40

50

ドライブラリ、または位置走査性(positional scanning)合成ペプチドコンビナトリアルライブラリを使用して、想起、產生、合成、および/または誘導体化されてもよい。例示の方法論は当該技術分野において特徴付けされており、参照により組み込まれる(Gray,B.P. and Brown,K.C. " Combinatorial Peptide Libraries:Mining for Cell-Binding Peptides " Chem Rev.2014,114:2,1020-1081.;Samoylova,T.I.and Smith,B.F. " Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening. " Muscle Nerve,1999,22:4.460-6)。いくつかの態様において、筋標的化ペプチドはこれまでに開示されている(例として、Writer M.J.et al. " Targeted gene delivery to human airway epithelial cells with synthetic vectors incorporating novel targeting peptides selected by phage display. " J. Drug Targeting. 2004;12:185;Cai,D. " BDNF-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart. " Physiol Genomics. 2006,24:3,191-7.;Zhang,L. " Molecular profiling of heart endothelial cells. " Circulation,2005,112:11,1601-11.;McGuire,M.J.et al. " In vitro selection of a peptide with high selectivity for cardiomyocytes in vivo. " J Mol Biol.2004,342:1,171-82を参照)。例示の筋標的化ペプチドは、以下の群のアミノ酸配列を含む:CQAQGQLV C(配列番号9)、CSERSMNFC(配列番号10)、CPKTRRVPC(配列番号11)、WLSEAGPVV TVRALRGTSW(配列番号12)、ASSLNIA(配列番号6)、CMQHSMRVC(配列番号13)、およびDDTRHWG(配列番号14)。いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは、約2~25アミノ酸、約2~20アミノ酸、約2~15アミノ酸、約2~10アミノ酸、または約2~5アミノ酸を含んでいてもよい。筋標的化ペプチドは、天然に存在するアミノ酸、例として、システイン、アラニン、または天然に存在しないアミノ酸、もしくは修飾アミノ酸を含んでいてもよい。天然に存在しないアミノ酸は、-アミノ酸、ホモ-アミノ酸、プロリン誘導体、3-置換アラニン誘導体、線形コアアミノ酸(linear core amino acids)、N-メチルアミノ酸、および当該技術分野において知られているその他のアミノ酸を包含する。いくつかの態様において、筋標的化ペプチドは線状であってもよい;他の態様において、筋標的化ペプチドは環状(例として、二環式)であってもよい(例として、Silvana,M.G.et al.Mol.Therapy,2018,26:1,132-147を参照)。

【0157】

iii . 筋標的化受容体リガンド

筋標的化剤は、リガンド、例として、受容体タンパク質へ結合するリガンドであってもよい。筋標的化リガンドは、筋細胞によって発現される内在化する細胞表面受容体へ結合するタンパク質、例として、トランスフェリンであってもよい。結果的に、いくつかの態様において、筋標的化剤は、トランスフェリン、またはトランスフェリン受容体へ結合するその誘導体である。筋標的化リガンドは、代替的に、小分子、例として、他の細胞型と比べて優先的に筋細胞を標的にする親油性小分子であってもよい。筋細胞を標的にしてもよい例示の親油性小分子は、コレステロール、コレステリル、ステアリン酸、パルミチン酸、オレイン酸、オレイル、リノレン酸、リノール酸、ミリスチン酸、ステロール、ジヒドロテストステロン、テストステロン誘導体、グリセリン、アルキル鎖、トリチル基、およびアルコキシ酸を含む化合物を包含する。

【0158】

iv . 筋標的化アプタマー

筋標的化剤は、他の細胞型と比べて優先的に筋細胞を標的にするアプタマー、例としてRNAアプタマーであってもよい。いくつかの態様において、筋標的化アプタマーはこれまでに特徴付けも開示もされていない。これらのアプタマーは、数種のmethod論のいずれか、例として、指数関数的濃縮によるリガンドの体系的進化(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)を使用して、想起、產生、合成、および/または誘導体化されてもよい。例示のmethod論は当該技術分野において特徴付けされており、参照により組み込まれる(Yan,A.C. and Levy,M. " Aptamers and aptamer targeted delivery " RNA biology,2009,6:3,316-20.;Germer,K.et al. " RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications. " Int.J.Biochem.Mol.Biol.2013;4:27-40)。いく

10

20

30

40

50

つかの態様において、筋標的化アプタマーはこれまでに開示されている(例として、Phillipou,S.et al. "Selection and Identification of Skeletal-Muscle-Targeted RNA Aptamers." Mol Ther Nucleic Acids.2018;10:199-214.;Thiel,W.H.et al. "Smooth Muscle Cell-targeted RNA Aptamer Inhibits Neointimal Formation." Mol Ther.2016;24:4,779-87を参照)。例示の筋標的化アプタマーは、A01B RNAアプタマーおよびRNA Apt 14を包含する。いくつかの態様において、アプタマーは、核酸をベースとしたアプタマー、オリゴヌクレオチドアプタマー、またはペプチドアプタマーである。いくつかの態様において、アプタマーは、約5~15kDa、約5~10kDa、約10~15kDa、約1~5Da、約1~3kDa、またはこれより小さいものであってもよい。

【0159】

10

v . 他の筋標的化剤

筋細胞(例として、骨格筋細胞)を標的にするための1つのストラテジーは、筋線維鞘上に発現されたトランスポータータンパク質などの筋肉トランスポータータンパク質の基質を使用することである。いくつかの態様において、筋標的化剤は、筋組織に特異的な流入トランスポーターの基質である。いくつかの態様において、流入トランスポーターは、骨格筋組織に特異的である。骨格筋の筋線維鞘上に発現されるトランスポーターの二大クラスは、(1)骨格筋組織からの流出に容易にさせる、アデノシン三リン酸(ATP)結合力セット(ABC)スーパーファミリー、および(2)基質の骨格筋中への流入を容易にし得る、溶質輸送体(solute carrier)(SLC)スーパーファミリーである。いくつかの態様において、筋標的化剤は、トランスポーターのABCスーパーファミリーまたはSLCスーパーファミリーへ結合する基質である。いくつかの態様において、トランスポーターのABCまたはSLCスーパーファミリーへ結合する基質は、天然に存在する基質である。いくつかの態様において、トランスポーターのABCまたはSLCスーパーファミリーへ結合する基質は、天然に存在しない基質、例えば、トランスポーターのABCまたはSLCスーパーファミリーへ結合するその合成誘導体である。

【0160】

20

いくつかの態様において、筋標的化剤は、トランスポーターのSLCスーパーファミリーの基質である。SLCトランスポーターは、平衡型であるか、または基質の輸送を駆動させる膜にわたって創出されたプロトンもしくはナトリウムのイオン勾配を使用するかのいずれかである。骨格筋への高発現を有する例示のSLCトランスポーターは、限定せずに、SATTトランスポーター(ASCT1;SLC1A4)、GLUT4トランスポーター(SLC2A4)、GLUT7トランスポーター(GLUT7;SLC2A7)、ATRC2トランスポーター(CAT-2;SLC7A2)、LAT3トランスポーター(KIAA0245;SLC7A6)、PHT1トランスポーター(PTR4;SLC15A4)、OATP-Jトランスポーター(OATP5A1;SLC21A15)、OCT3トランスポーター(EMT;SLC22A3)、OCTN2トランスポーター(FLJ46769;SLC22A5)、ENTトランスポーター(ENT1;SLC29A1およびENT2;SLC29A2)、PAT2トランスポーター(SLC36A2)、およびSAT2トランスポーター(KIAA1382;SLC38A2)を包含する。これらのトランスポーターは、基質の骨格筋中への流入を容易にすることで、筋標的化のための好機を提供し得る。

30

【0161】

40

いくつかの態様において、筋標的化剤は、平衡型ヌクレオシドトランスポーター2(ENT2)トランスポーターの基質である。他のトランスポーターと比べて、ENT2は、骨格筋において最高発現するmRNAの1つを有する。ヒトENT2(hENT2)は、脳、心臓、胎盤、胸腺、脾臓、前立腺、および腎臓などのほとんどの体器官に発現されるものの、とくに骨格筋に豊富である。ヒトENT2は、その基質の取り込みを、それらの濃度勾配に応じて容易にさせる。ENT2は、広範なプリンおよびピリミジン核酸塩基を輸送することによってヌクレオシドホメオスタシスを維持する役割を果たす。hENT2トランスポーターは、イノシンを除くすべてのヌクレオシド(アデノシン、グアノシン、ウリジン、チミジン、およびシチジン)に対して低親和性を有する。結果的に、いくつかの態様において、筋標的化剤は、ENT2基質である。例示のENT2基質は、限定せずに、イノシン、2',3'-ジデオキシイノシン、およびクロファラビンを包含する。いくつかの態様において、本明細書に提供される筋

50

標的化剤のいずれも、分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチドペイロード)に関連する。いくつかの態様において、筋標的化剤は、分子ペイロードへ共有結合的に連結されている。いくつかの態様において、筋標的化剤は、分子ペイロードへ非共有結合的に連結されている。

【0162】

いくつかの態様において、筋標的化剤は、ナトリウムイオン依存性の高親和性カルニチントランスポーターである有機カチオン/カルニチントランスポーター(OCTN2)の基質である。いくつかの態様において、筋標的化剤は、カルニチン、ミルドロネート、アセチルカルニチン、またはOCTN2へ結合するそのいずれかの誘導体である。いくつかの態様において、カルニチン、ミルドロネート、アセチルカルニチン、またはそれらの誘導体は、分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチドペイロード)へ共有結合的に連結されている。

10

【0163】

筋標的化剤は、筋細胞を標的にする少なくとも1つの可溶性形態で存在するタンパク質であるタンパク質であってもよい。いくつかの態様において、筋標的化タンパク質は、鉄過剰およびホメオスタシスに関するタンパク質ヘモジュベリン(またrepulsive guidance molecule Cまたはヘモクロマトーシスタイプ2タンパク質としても知られている)であってもよい。いくつかの態様において、ヘモジュベリンは、完全長もしくはフラグメントであっても、または機能的ヘモジュベリンタンパク質と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%配列同一性をもつ突然変異体であってもよい。いくつかの態様において、ヘモジュベリン突然変異体は、可溶性フラグメントであってもよく、N末シグナリングを欠いていてもよく、および/またはC末アンカーダメイン(anchoring domain)を欠いていてもよい。いくつかの態様において、ヘモジュベリンは、GenBank RefSeq受託番号NM_001316767.1、NM_145277.4、NM_202004.3、NM_213652.3、またはNM_213653.3の注釈付きのものであってもよい。ヘモジュベリンがヒト、靈長目の非ヒト動物、または齧歯類の動物を起源とするものであってもよいことは解されるはずである。

20

【0164】

B . 分子ペイロード

本開示のいくつかの側面は、分子ペイロード、例として、生物学的結果(例として、DNA配列の転写、RNA配列のスプライシングおよびプロセシング、タンパク質の発現、またはタンパク質の活性)をモジュレートするための分子ペイロードを提供する。いくつかの態様において、分子ペイロードは、筋標的化剤へ連結されているか、または別様に結び付けられている。いくつかの態様において、かかる分子ペイロードは、例として、結び付けられた筋標的化剤による筋細胞への送達を受けた筋細胞中の核酸またはタンパク質への特異的結合を介して、筋細胞を標的にすることが可能である。様々なタイプの筋標的化剤が本開示に従って使用されてもよいことは解されるはずである。例えば、分子ペイロードは、オリゴヌクレオチド(例として、アンチセンスオリゴヌクレオチド)、ペプチド(例として、疾患に関連する筋細胞中の核酸もしくはタンパク質に結合するペプチド)、タンパク質(例として、疾患に関連する筋細胞中の核酸もしくはタンパク質に結合するタンパク質)、または小分子(例として、疾患に関連する筋細胞中の核酸もしくはタンパク質の機能をモジュレートする小分子)を含んでいてもよく、またはこれらからなっていてもよい。いくつかの態様において、分子ペイロードは、突然変異したDMDアレルに相補性のある領域を有する鎖を含むオリゴヌクレオチドである。例示の分子ペイロードは本明細書にさらに詳細に記載されているが、しかしながら、本明細書に提供される例示の分子ペイロードが限定されることを意図していないことは解されるはずである。

30

【0165】

i . オリゴヌクレオチド

いずれの好適なオリゴヌクレオチドも、分子ペイロードとして、本明細書に記載のとおり使用されてよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、エキソンスキッピングを誘導するよう設計されていてもよい、例として配列番号195(CUCCAACAUCAAGG

40

50

AAGAUGGCAUUUCUAG)を含むEXONDYS 51オリゴヌクレオチド(Sarepta Therapeutics, Inc.);配列番号186(UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU)を含むWVE-210201(Wave Life Sciences);配列番号159(CAAUGCCAUCGUCCUGAGUUCUG)を含むCasimersen(Sarepta Therapeutics, Inc.);または配列番号231(GUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUC)を含むGolodirsen(Sarepta Therapeutics, Inc.)。

【0166】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、mRNAの分解を引き起こすよう設計されていてもよい(例として、オリゴヌクレオチドは、分解を引き起こすgapmer、siRNA、リボザイム、またはアプタマーであってもよい)。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、mRNAの翻訳を遮断するよう設計されていてもよい(例として、オリゴヌクレオチドは、翻訳を遮断するmixmer、siRNA、またはアプタマーであってもよい)。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、mRNAの分解を引き起こして、その翻訳を遮断するよう設計されていてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、mRNAの安定性を促進するよう設計されていてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、mRNAの翻訳を促進するよう設計されていてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、mRNAの安定性を促進し、その翻訳を促進するよう設計されていてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、酵素(例として、遺伝子編集酵素)の活性を指向するためのガイド核酸(例として、ガイドRNA)であってもよい。いくつかの態様において、ガイド核酸は、突然変異したDMDアレルの全体または一部を欠失するように(例として、インフレームエキソンスキッピングを容易にするように)酵素を指向してもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、DMD発現の抑制性調節因子、例として、miR-31を標的とするように設計されていてもよい。オリゴヌクレオチドの他の例は本明細書に提供されている。いくつかの態様において、一方のフォーマット(format)からの機能的配列(例として、アンチセンス鎖配列)を他方のフォーマットへ組み込むことによって、あるフォーマットのオリゴヌクレオチド(例として、アンチセンスオリゴヌクレオチド)が、別のフォーマット(例として、siRNAオリゴヌクレオチド)へ好適に適応されてもよいことは解されるはずである。
10
20

【0167】

DMDを標的にするための有用なオリゴヌクレオチドの例は、「MULTIPLE EXON SKIPPING COMPOSITIONS FOR DMD」という表題の2010年5月27日に公開された米国特許出願刊行物US20100130591A1号;「MEANS AND METHOD FOR INDUCING EXON-SKIPPING」という表題の2013年1月29日に登録された米国特許第8,361,979号;「METHOD FOR EFFICIENT EXON (44) SKIPPING IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY AND ASSOCIATED MEANS」という表題の2012年3月8日に公開された米国特許出願刊行物20120059042号;「EXON SKIPPING COMPOSITIONS FOR TREATING MUSCULAR DYSTROPHY」という表題の2014年11月6日に公開された米国特許出願刊行物20140329881号;「ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES FOR INDUCING EXON SKIPPING AND METHODS OF USE THEREOF」という表題の2012年7月31日に登録された米国特許第8,232,384;「METHODS AND MEANS FOR EFFICIENT SKIPPING OF EXON 45 IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY PRE-MRNA」という表題の2012年1月26日に公開された米国特許出願刊行物20120022134A1;「ADENO-ASSOCIATED VIRAL VECTOR FOR EXON SKIPPING IN A GENE ENCODING A DISPENSABLE DOMAIN PROTEIN」という表題の2012年3月29日に公開された米国特許出願刊行物20120077860;「OLIGOMERS」という表題の2012年12月4日に登録された米国特許第8,324,371号;「ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES」という表題の2015年7月14日に登録された米国特許第9,078,911号;「ANTISENSE NUCLEIC ACIDS」という表題の2015年7月14日に登録された米国特許第9,079,934号;「MIR-31 IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY THERAPY」という表題の2015年5月19日に登録された米国特許第9,034,838号;および「OLIGONUCLEOTIDE COMPOSITIONS AND METHODS THEREOF」という表題の2017年4月13日に公開された国際特許刊行物WO2017062862A3
30
40
50

に提供され、これらの各々の内容全体は本明細書に組み込まれる。

【0168】

表2はDMDを標的にするのに(例としてエキソンスキッピングに)有用であるオリゴヌクレオチドの配列の非限定例を提供する。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、表2に提供されるいずれかの配列を含んでいてもよい。

【0169】

表2 - DMDを標的にするためのオリゴヌクレオチド配列

【表3 - 1】

| エキソン | 配列番号 | 配列 |
|------|------|----------------------------------|
| 8 | 15 | CUUCCUGGAUGGCUUCAAU |
| 8 | 16 | GUACAUUAAGAUGGACUUC |
| 8 | 17 | UAUCUGGAUAGGUGGUAUCAAGAUCUGUAA |
| 8 | 18 | AUGUAACUGAAAAUGUUUCUUCUUUA |
| 8 | 19 | UGGAUAGGUGGUAUCAACACUUGUAAGCAC |
| 8 | 20 | GAUAGGUGGUAUCAACACUUCUGU |
| 8 | 21 | UAUCUGGAUAGGUGGUAUCAACACUUCUGUAA |
| 8 | 22 | AAACUUGGAAGAGUGAUGUGAUGUA |
| 8 | 23 | GCUCACUUGUUGAGGCAAAACUUGGAA |
| 8 | 24 | GCCUUGGCAACAUUUCACUUCUG |
| 8 | 25 | UACACACUUUACCUGUUGAGAAUAG |
| 8 | 26 | GAUAGGUGGUAUCAACACUUCUGUAA |
| 8 | 27 | GAUAGGUGGUAUCAACACUUCUG |
| 8 | 28 | GAUAGGUGGUAUCAACACUUCUGUAG |
| 8 | 29 | GGUGGUAUCAACACUUCUGUAA |
| 8 | 30 | GUAUCAACACUUCUGUAGCAC |
| 23 | 31 | CGGCUAUUUCAGAGGGCGCUUUCUUNGAC |
| 23 | 32 | ACAGUGGUGCUGAGAUAGUAUAGGCC |
| 23 | 33 | UAGGCCACUUUGUUGCUCUUGC |

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

| | | |
|----|-----|---------------------------------|
| 23 | 34 | UUCAGAGGGCGCUUUUCUUC |
| 23 | 253 | GGCCAAACCUCGGCUUACCUGAAAU |
| 23 | 254 | GGCCAAACCUCGGCUUACCU |
| 35 | 35 | UCUUCAGGUGCACCUUCUGUUUCUCAUCU |
| 35 | 36 | UCUGUGAUACUCUUCAGGUGCACCUUCUGU |
| 35 | 37 | UCUUCUGCUCGGGAGGUGACA |
| 35 | 38 | CCAGUUACAUUCAGAAGAC |
| 35 | 39 | UCUUCAGGUGCACCUUCUGU |
| 43 | 40 | UGCUGCUGCUUCUUGC |
| 43 | 41 | UUGUUAACUUUUUCCCAUU |
| 43 | 42 | UGUUAACUUUUUCCAUUGG |
| 43 | 43 | CAUUUUGUUAACUUUUUCCC |
| 43 | 44 | CUGUAGCUUCACCCUUUCC |
| 43 | 45 | GAGAGCUUCCUGUAGCUUCACCCUUU |
| 43 | 46 | UCCUGUAGCUUCACCCUUUCCACAGGCG |
| 43 | 47 | UGUGUUACCUACCCUUGUCG |
| 43 | 48 | UAGACUAUCUUUAUAAUCUGUAAUAU |
| 43 | 49 | GAGAGCUUCCUGUAGCUUCACCCUUUCCA |
| 43 | 50 | UUCCUGUAGCUUCACCCUUUCCACAGGCGUU |
| 43 | 51 | AGCUUCCUGUAGCUUCACCCUUU |
| 43 | 52 | GGAGAGAGCUUCCUGUAGCUUCACCCUUU |
| 43 | 53 | GAGAGCUUCCUGUAGCUUCACCC |
| 43 | 54 | UAUGUGUUACCUACCCUUGUCGGUC |
| 43 | 55 | GGAGAGAGCUUCCUGUAGCU |
| 43 | 56 | UCACCCUUUCCACAGGCGUUGCA |
| 43 | 57 | GCUGGGAGAGAGCUUCCUGUAGCUUCAC |
| 43 | 58 | UGUUACCUACCCUUGUCGGGUCCUUGUAC |
| 43 | 59 | CUGCUGCUUCUUGCUAUGAAUAAUGUC |
| 43 | 60 | GGCGUUGCACUUUGCAAUGCUGCUGUCU |
| 43 | 61 | UUGGAAAUAAGCUGGGAGAGAGCUCC |
| 43 | 62 | CUACCCUUGUCGGGUCCUUGUACAUUUUG |
| 43 | 63 | GUCAAUCCGACCUGAGCUUUGUUGUAGA |
| 43 | 64 | CUUGCUAUGAAUAAUGUCAAUCCGACC |
| 43 | 65 | UAUAUGUGUUACCUACCCUUGUCGGGUCC |

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

| | | |
|----|-----|----------------------------------|
| 43 | 255 | AAUCAGCUGGGAGAGAGCUUCCUGUAGCU |
| 43 | 256 | UCGUUCUUCUGUCGUCGUACGUUUC |
| 44 | 66 | UUUGUGUCUUUCUGAGAAC |
| 44 | 67 | AAAGACUUACCUUAAGAUAC |
| 44 | 68 | AUCUGUCAAAUCGCCUGCAG |
| 44 | 69 | CGCCGCCAUUUCUCAACAG |
| 44 | 70 | UUUGUAUUUAGCAUGUCC |
| 44 | 71 | CCGCCAUUUCUCAACAG |
| 44 | 72 | UUCUCAGGAUUUUGUGUCUU |
| 44 | 73 | GACAACUCUUU |
| 44 | 74 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUG |
| 44 | 75 | UGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA |
| 44 | 76 | CUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU |
| 44 | 77 | UUCUCAACAGAACUGUCAAAUCGCCUGCAG |
| 44 | 78 | GCCACUGAUAAAUAUCUUUAUAUC |
| 44 | 79 | UCUGUUAGCCACUGAUAAAUAUCUUUAUA |
| 44 | 80 | GAGAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA |
| 44 | 81 | UCUUUCUGAGAACUGUUACGUUCUGUUAG |
| 44 | 82 | CAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGGU |
| 44 | 83 | CAACAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAG |
| 44 | 84 | AAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUAAA |
| 44 | 85 | GAAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU |
| 44 | 86 | AAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA |
| 44 | 87 | UGAGAACUGUUACGUUCAGCUUCUGUUAGCCA |
| 44 | 88 | UUCUGAGAACUGUUACGUUCAGCUUCUGUU |
| 44 | 89 | UUCUGAGAACUGUUACGUUCAGCUUCUGUU |
| 44 | 90 | GAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGGUAA |
| 44 | 91 | AUAAUGAAAACGCCGCCAUUUCUCA |
| 44 | 92 | AAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCAC |
| 44 | 93 | UUGUGUCUUUCUGAGAACUGUUCA |
| 44 | 94 | CCAAUUCAGGAAUUUGUGUCUUU |
| 44 | 95 | AUCGCCUGCAGGUAAAAGCAUAUGG |
| 44 | 96 | UGAAAACGCCGCCAUUUCUCAACAGAUCUG |
| 44 | 97 | CAUAUGAAAACGCCGCCAUUUCUCAACAG |

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

| | | |
|----|-----|---------------------------------|
| 44 | 98 | UGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUAAAUAU |
| 44 | 99 | CAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGG |
| 44 | 100 | CAACAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGG |
| 44 | 101 | CUAACACAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGG |
| 44 | 102 | GAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGGU |
| 44 | 103 | GAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGG |
| 44 | 104 | GAUCUGUCAAAUCGCCUGCAG |
| 44 | 105 | CAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGGU |
| 44 | 106 | CAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAG |
| 44 | 107 | GUGUCUUUCUGAGAACUGUUUCAGC |
| 44 | 108 | GAGAACUGUUUCAGCUUCUGUUAGCCAC |
| 44 | 109 | GAAACUGUUUCAGCUUCUGUUAGCCACUG |
| 44 | 110 | CUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUG |
| 44 | 111 | AUCUGUCAAAUCGCCUGCAGGUAAAAG |
| 44 | 112 | GAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGGUAAAAGC |
| 44 | 257 | CACCGAUUGUCUUCGA |
| 44 | 258 | CCCUUGUACGAUUUAUG |
| 44 | 259 | UCUGUGUUUAAGGACUCU |
| 45 | 113 | GCUGAAUUAUUUUCUUC |
| 45 | 114 | UUUUUCUGUCUGACAGCUG |
| 45 | 115 | UCUGUUUUUGAGGAUUGC |
| 45 | 116 | CCACCGCAGAUUCAGGC |
| 45 | 117 | GCCCAAUGCCAUC |
| 45 | 118 | UUUGCAGACCUC |
| 45 | 119 | CAGUUUGCCG |
| 45 | 120 | GUUGCAUCAAU |
| 45 | 121 | UUUUUCCUGUAGAAUACUGG |
| 45 | 122 | GCUGCCCAAUGCGAUCC |
| 45 | 123 | GCUGCCCAAUGCCAUC |
| 45 | 124 | GCUGCCCAAUGCCAUC |
| 45 | 125 | CAAUGCCAUC |
| 45 | 126 | GCUGCCCAAUGCCAUC |
| 45 | 127 | CCAAUGCCAUC |
| 45 | 128 | UUGCCG |

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

| | | |
|----|-----|--|
| 45 | 129 | GCUGCCCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAAGAU |
| 45 | 130 | CAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAAGA |
| 45 | 131 | CAGUUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUC |
| 45 | 132 | CUUCCCCAGUUGCAUUCAAUGUUC |
| 45 | 133 | CUGGCAUCUGUUUUUGAGGAUUG |
| 45 | 134 | UUAGAUCUGUCGCCUACCU |
| 45 | 135 | GCUGCCCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAAGAUACCA |
| 45 | 136 | GCCCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAAGAUACC |
| 45 | 137 | CAUCCUGGAGUUCCUGUAAGAUACC |
| 45 | 138 | UGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAAGAUACC |
| 45 | 139 | UGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAAGAU |
| 45 | 140 | CAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAAGAU |
| 45 | 141 | GCCCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAAGAU |
| 45 | 142 | GCCCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAA |
| 45 | 143 | GCCGCUGCCCAAUGACAUCUCCUGGAGUUCCUGUAA |
| 45 | 144 | GCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAAGAUAA |
| 45 | 145 | CCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUA |
| 45 | 146 | CUGACAAACAGUUUGCCGCUGCCCAA |
| 45 | 147 | UUUGAGGAUUGCUGAAUUAUUUCUU |
| 45 | 148 | CAGUUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCUCCUGGA |
| 45 | 149 | UUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUC |
| 45 | 150 | UUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCUCCUG |
| 45 | 151 | CCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCU |
| 45 | 152 | CCCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAAGA |
| 45 | 153 | CCGCUGCCCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCC |
| 45 | 154 | CCCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAAGAU |
| 45 | 155 | CCGCUGCCCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUG |
| 45 | 156 | UGCCCCAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAAG |
| 45 | 157 | CCCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUAAG |
| 45 | 158 | UGCCCCAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUGUA |
| 45 | 159 | CAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUG |
| 45 | 260 | GCCGCUGCCCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCCUG |
| 45 | 261 | AUUAGAUCUGUCGCCUACCUUUUUUCUGUCUG |
| 45 | 262 | UGUCGCCUACCUUUUUUCUGUCUG |

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

| | | |
|----|-----|------------------------------------|
| 45 | 263 | GCCCCAAUGCCAUCUCCUGGAGGUUCCUG |
| 55 | 160 | AGCCUCUCGCUCACUCACCCUGCAAAGGA |
| 50 | 161 | CCACUCAGAGCUCAGAUCUUUAACUUC |
| 50 | 162 | CUUCCACUCAGAGCUCAGAUCUUUAAC |
| 50 | 163 | GGGAUCCAGUAUACUUACAGGCCUCC |
| 50 | 164 | CUCAGAGCUCAGAUCUU |
| 50 | 165 | GGCUGCUUUGCCCUC |
| 50 | 166 | CUCAGAUUCUAACUUCUCCUUUAAC |
| 50 | 167 | CUCAGAGCUCAGAUCUUUAACUUCU |
| 50 | 168 | CGCCUUUCCACUCAGAGCUCAGAUCU |
| 50 | 169 | UCAGCUCUUGAAGUAAAACGGUUUACCG |
| 50 | 170 | UUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAAAACGG |
| 50 | 171 | GGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGAAGU |
| 50 | 172 | CAGGAGCUAGGUUCAGGCUGCUUUGCC |
| 50 | 173 | UCCAAUAGUGGUUCAGUCCAGGAGCU |
| 50 | 174 | AAAGAGAAUGGGAUCCAGUAUACUUAC |
| 50 | 175 | AAAUAGCUAGAGCCAAAGAGAAUGGGA |
| 50 | 176 | GGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAAAACGG |
| 50 | 177 | AGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAA |
| 50 | 178 | GUCAGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGAAG |
| 50 | 179 | AGGUUCAGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGA |
| 50 | 180 | CAGAGCUCAGAUCUUUAACUUCU |
| 50 | 181 | CUUACAGGCUCCAAUAGUGGUUCAGU |
| 50 | 182 | AUGGGAUCCAGUAUACUUACAGGC |
| 50 | 183 | AGAGAAUGGGAUCCAGUAUACUUAC |
| 50 | 184 | AACUUCCUCUUUAACAGAAAAGCAUAC |
| 50 | 264 | GAGCCUCUCGCUCACUCACCCUGCAAAGGA |
| 51 | 185 | CUCAUACCUUCUGCUUGAUGC |
| 51 | 186 | UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU |
| 51 | 187 | GAAAGCCAGUCGGUAAGUUC |
| 51 | 188 | CACCCACCAUCACCC |
| 51 | 189 | CCUCUGUGAUUUUAACUUGAU |
| 51 | 190 | UGAUUAUCCUCAAGGUACCC |
| 51 | 191 | GGUACCUCCAACAUCAGGAAGAUGGCAUU |

10

20

30

40

50

【表 3 - 7】

| | | |
|----|-----|---------------------------------------|
| 51 | 192 | AUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUUUC |
| 51 | 193 | CAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUU |
| 51 | 194 | GAGCAGGUACCUCCAACAUCAGGAA |
| 51 | 195 | CUCCAACAUCAGGAAGAUGGCAUUUCUAG |
| 51 | 196 | ACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGAG |
| 51 | 197 | CACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGA |
| 51 | 198 | UCACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGG |
| 51 | 199 | GUCACCAGAGUAACAGUCUGAGUAG |
| 51 | 200 | ACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGAGC |
| 51 | 201 | UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUC |
| 51 | 202 | ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG |
| 51 | 203 | ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG |
| 51 | 204 | AUCAUUUUUUUCUCAUACCUUCUGCU |
| 51 | 205 | CACCCACCAUCACCCUCUGUG |
| 51 | 206 | AUCAUCUCGUUGAUAUCCUCAA |
| 51 | 207 | CUCCAACAUCAGGAAGAUGGCAUUUCU |
| 51 | 208 | CAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGU |
| 51 | 265 | AUCAUUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGCUAAAA |
| 52 | 209 | UUGCUGGUUCUUGUUUUUC |
| 52 | 210 | CCGUAAUGAUUGUUCU |
| 52 | 211 | GCUGGGUCUUGUUUUUCAA |
| 52 | 212 | UGGUCUUGUUUUUCAAUUU |
| 52 | 213 | GUCUUGUUUUUCAAUUUUG |
| 52 | 214 | CUUGUUUUUCAAUUUUGGG |
| 52 | 215 | UGUUUUUCAAUUUUGGGC |
| 52 | 216 | UCCAACUGGGGACGCCUCUGUUCACAAUCCUGC |
| 52 | 217 | UCCUGCAUUGUUGCCUGUAAG |
| 52 | 218 | UCCAACUGGGGACGCCUCUGUUCACAAUCC |
| 52 | 219 | ACUGGGGACGCCUCUGUCCA |
| 52 | 220 | CCGUAAUGAUUGUUCUAGCC |
| 52 | 221 | UGUAAAAAACUUACUUUCGA |
| 53 | 222 | CUGUUGCCUCCGGUUCUG |
| 53 | 223 | UUGGCUCUGGCCUGGUCCU |
| 53 | 224 | UUCAACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUCU |

10

20

30

40

50

【表3-8】

| | | |
|----|-----|---------------------------------|
| 53 | 225 | UACUUCAUCCCACUGAUUCUGAAUU |
| 53 | 226 | CUGAAGGUGUUCUUGUACUUCAUCC |
| 53 | 227 | CUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGU |
| 53 | 228 | CUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUCUUG |
| 53 | 229 | CAACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUC |
| 53 | 230 | UUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUCUUGUAC |
| 53 | 231 | GUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUC |
| 53 | 232 | CUCCGGUUCUGAAGGUGUUCUUG |
| 53 | 233 | CUCCGGUUCUGAAGGUGUUCUU |
| 53 | 234 | CUCCGGUUCUGAAGGUGUUCU |
| 53 | 235 | CUCCGGUUCUGAAGGUGUUC |
| 53 | 236 | CUCCGGUUCUGAAGGUGUU |
| 53 | 237 | CAUUCAACUGUUGCCUCCGGUUCUG |
| 53 | 238 | CUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG |
| 53 | 239 | CAUUCAACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG |
| 53 | 240 | UACUAACCUUGGUUUCUGUGA |
| 53 | 241 | UGUAUAGGGACCCUCCUCCAUGACUC |
| 53 | 242 | CUAACCUUGGUUUCUGUGAUUUUCU |
| 53 | 243 | GGUAUCUUUGAUACUAACCUUGGUUUC |
| 53 | 244 | AUUCUUCAACUAGAAUAAAAG |
| 53 | 245 | GAUUCUGAAUUCUUCAACUAGAAU |
| 53 | 246 | AUCCCACUGAUUCUGAAUUC |
| 53 | 247 | AACCGAGACCGGACAGGAUUCU |
| 53 | 266 | GGAAGCUAAGGAAGAACUGAGCAGG |
| 55 | 248 | CUGUUGCAGUAACUAUGAG |
| 55 | 249 | UGCCAUUGUUUCAUCAGCUCUUU |
| 55 | 250 | UGCAGUAACUAUGAGUUUC |
| 55 | 251 | UCCUGUAGGACAUUGGCAGU |
| 55 | 252 | GAGUCUUCUAGGAGCCU |

10

20

30

40

【0170】

DMD遺伝子編集を促進するためのオリゴヌクレオチドの例は、「METHODS OF MODIFYING THE DYSTROPHIN GENE AND RESTORING DYSTROPHIN EXPRESSION AND USES THEREOF」という表題の2018年3月29日に公開された国際特許刊行物WO2018053632A1；「MODIFICATION OF THE DYSTROPHIN GENE AND USES THEREOF」という表題の2017年3月30日に公開された国際特許刊行物WO2017049407A1；「CRISPR/CAS-RELATED METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY AND BECKER MUSCULAR DYSTROPHY」という表題の2016年10月6日に公開された国際特許刊行物WO2016161380A1；「THERAPEUTIC

50

TARGETS FOR THE CORRECTION OF THE HUMAN DYSTROPHIN GENE BY GENE EDITING AND METHODS OF USE」という表題の2017年6月8日に公開された国際特許刊行物WO2017095967;「MATERIALS AND METHODS FOR TREATMENT OF DU CHENNE MUSCULAR DYSTROPHY」という表題の2017年5月4日に公開された国際特許刊行物WO2017072590A1;「PREVENTION OF MUSCULAR DYSTROPHY BY CRISPR/CPF1-MEDIATED GENE EDITING」という表題の2018年5月31日に公開された国際特許刊行物WO2018098480A1;、「RNA-Guided Systems for In Vivo Gene Editing」という表題の2017年9月21日に公開された米国特許出願刊行物US20170266320A1;「PREVENTION OF MUSCULAR DYSTROPHY BY CRISPR/CAS9-MEDIATED GENE EDITING」という表題の2016年2月18日に公開された国際特許刊行物WO2016025469A1;「RNA-GUIDED GENE EDITING AND GENE REGULATION」という表題の2016年7月14日に公開された米国特許出願刊行物2016/0201089;および「MEGANUCLEASE VARIANTS CLEAVING A DNA TARGET SEQUENCE FROM THE DYSTROPHIN GENE AND USES THEREOF」という表題の2013年6月6日に公開された米国特許出願刊行物2013/0145487を包含し、これらの各々の内容全体は本明細書に組み込まれる。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、例として、ヒト、マウスおよび非ヒト種から選択される、複数の種のDMD遺伝子配列と相補性のある領域を有してもよい。10

【0171】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、突然変異体DMDアレル、例えば、フレームシフトおよび不適当なRNAスプライシング/プロセシングに繋がるヒト中DMDのエキソン1~79のいずれかにおける少なくとも1個の突然変異を伴うDMDアレル、と相補性のある領域を有してもよい。20

【0172】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、lncRNAまたはmRNAを、例として分解のために、標的にしてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、例として分解のために、ミスマッチ修復経路に関するタンパク質をコードする核酸、例として、MSH2、MutLアルファ、MutSベータ、MutLアルファを標的にしてもよい。ミスマッチ修復経路に関するタンパク質(かかるタンパク質をコードするmRNAは、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドによって標的にされてもよい)の非限定例は、Iyer,R.R.et al., "DNA triplet repeat expansion and mismatch repair" Annu Rev Biochem.2015; 84:199-226;およびSchmidt M.H. and Pearson C.E., "Disease-associated repeat instability and mismatch repair" DNA Repair(Amst).2016 Feb;38:117-26に記載されている。30

【0173】

a. オリゴヌクレオチドサイズ/配列

オリゴヌクレオチドは、例としてフォーマットに応じて、様々な異なる長さのものであってもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、長さが7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75ヌクレオチドであるか、またはこれより長い。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、長さが8~50ヌクレオチド、長さが8~40ヌクレオチド、長さが8~30ヌクレオチド、長さが10~15ヌクレオチド、長さが10~20ヌクレオチド、長さが15~25ヌクレオチド、長さが21~23ヌクレオチド等々である。40

【0174】

いくつかの態様において、本開示の目的上オリゴヌクレオチドの相補的な核酸配列は、前記配列の標的分子(例として、mRNA)への結合が標的(例として、mRNA)の機能に干渉して活性の変化(例として、翻訳の阻害、スプライシングの変更、エキソンスキッピング)または発現の喪失(例として、標的mRNAの分解)を引き起こしたとき、かつ非特異的結合の回避が所望される条件下、例として、in vivoアッセイまたは治療処置のケースおよびin vitroアッセイのケースにおける生理学的な条件下、アッセイがストリンジエンシー(stringency)の好適な条件下で実施される条件下で、前記配列の非標的配列への非特異的結合を50

回避するのに充分な程度の相補性があるとき、標的核酸に特異的にハイブリダイズ可能であるか、または標的核酸に特異的である。よって、いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、標的核酸の連続したヌクレオチドに少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相補的であってもよい。いくつかの態様において、相補的なヌクレオチド配列は、標的核酸に特異的にハイブリダイズ可能であるか、または標的核酸に特異的であるその標的の配列に100%相補的である必要はない。

【0175】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、長さが8~15、8~30、8~40、または10~50、または5~50、または5~40ヌクレオチドの範囲にある標的核酸と相補性のある領域を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドの、標的核酸と相補性のある領域は、長さが5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50ヌクレオチドである。いくつかの態様において、相補性のある領域は、標的核酸の少なくとも連続した8ヌクレオチドと相補的である。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、標的核酸の一部の連続したヌクレオチドと比較して1、2または3塩基ミスマッチを含有していてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、15塩基にわたり最大3ミスマッチまで、または10塩基にわたり最大2ミスマッチまで有していてもよい。

10

【0176】

b . オリゴヌクレオチド修飾:

本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは、修飾されていてもよく、例として、修飾された糖部、修飾されたヌクレオシド間連結、修飾ヌクレオチド、および/またはそれらの組み合わせを含む。加えて、いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、以下の特性の1以上を呈してもよい:選択的スプライシングを媒介しない;免疫刺激性ではない;ヌクレアーゼ抵抗性である;非修飾オリゴヌクレオチドと比較して改善された細胞取り込みを有する;細胞または哺乳動物への毒性がない;改善されたエンドソームの内部への出口(exit)を細胞中に有する;TLR刺激を最小限に抑える;または、パターン認識受容体を回避する。本明細書に記載のオリゴヌクレオチドの修飾された化学的性質またはフォーマットのいずれも、互いに組み合わせられ得る。例えば、1、2、3、4、5、またはこれより多くの異なるタイプの修飾が、同じオリゴヌクレオチド内に包含され得る。

20

【0177】

いくつかの態様において、修飾が組み込まれるオリゴヌクレオチドを、ネイティブなオリゴデオキシヌクレオチド分子またはオリゴリボヌクレオチド分子よりヌクレアーゼ消化に耐性があるようにさせる、特定のヌクレオチド修飾が使用されてもよい;これらの修飾されたオリゴヌクレオチドは、非修飾オリゴヌクレオチドより長時間無傷で存続する。修飾されたオリゴヌクレオチドの特定例は、修飾された主鎖、例えば、ホスホロチオアート、ホスホトリエステル、メチルホスホナート、短鎖アルキルもしくはシクロアルキル糖間連結、または短鎖ヘテロ原子のもしくは複素環式の糖間連結などの修飾されたヌクレオシド間連結を含むものを包含する。結果的に、本開示のオリゴヌクレオチドは、修飾、例として、ヌクレオチド修飾の組み込みなどによる核酸分解に対して安定化され得る。

30

【0178】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの2~10、2~15、2~16、2~17、2~18、2~19、2~20、2~25、2~30、2~40、2~45ヌクレオチド、またはこれより多いヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、長さが最大50ヌクレオチドまでまたは最大100ヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチドであってもよい。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの2~10、2~15、2~16、2~17、2~18、2~19、2~20、2~25、2~30ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、長さが8~30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドであってもよい。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌク

40

50

レオチドの2～4、2～5、2～6、2～7、2～8、2～9、2～10、2～11、2～12、2～13、2～14ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、長さが8～15ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドであってもよい。任意に、オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10ヌクレオチドを除き、どのヌクレオチドも修飾されていてもよい。オリゴヌクレオチド修飾は本明細書にさらに記載されている。

【0179】

c . 修飾ヌクレオチド

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、2'-修飾ヌクレオチド、例として、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、または2'-O--N-メチルアセトアミド(2'-O--NMA)を包含する。10

【0180】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは少なくとも1個の2'-O-メチル-修飾ヌクレオチドを包含し得、いくつかの態様において、ヌクレオチドのすべてが2'-O-メチル修飾を包含する。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、リボース環が環中2原子を接続する(例として、2'-O原子を4'-C原子へ接続する)架橋部分を含む、修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは「ロックド」されており、例として、リボース環が2'-O原子と4'-C原子とを接続するメチレン架橋によって「ロックド」されている修飾ヌクレオチドを含む。LNAの例は、2008年4月17日に公開され「RN A Antagonist Compounds For The Modulation Of PCSK9」という表題の国際特許出願刊行物WO/2008/043753(この内容は、その全体が参照されることによって本明細書に組み込まれる)に記載されている。20

【0181】

本明細書に開示のオリゴヌクレオチドに使用されてもよい他の修飾は、エチレン架橋核酸(ENA)を包含する。ENAは、これらに限定されないが、2'-O,4'-C-エチレン架橋核酸を包含する。ENAの例は、2005年5月12日に公開され「APP/ENA Antisense」という表題の国際特許刊行物第WO 2005/042777号;Morita et al., Nucleic Acid Res., Suppl 1:241-242, 2001;Surono et al., Hum. Gene Ther., 15:749-757, 2004;Koizumi, Cur r. Opin. Mol. Ther., 8:144-149, 2006;およびHorie et al., Nucleic Acids Symp. Ser (Oxf), 49:171-172, 2005に提供されており、これらの開示はそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。30

【0182】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ロックド核酸(LNA)ヌクレオチド、拘束エチル(cEt)ヌクレオチド、またはエチレン架橋核酸(ENA)ヌクレオチドなどの架橋ヌクレオチドを含んでいてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、以下の米国特許または特許出願刊行物のうち1つに開示された修飾ヌクレオチドを含む:米国特許7,399,845、2008年7月15日発行、表題「6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs」;米国特許7,741,457、2010年6月22日発行、表題「6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs」;米国特許8,022,193、2011年9月20日発行、表題「6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs」;米国特許7,569,686、2009年8月4日発行、表題「Compounds And Methods For Synthesis Of Bicyclic Nucleic Acid Analogs」;米国特許7,335,765、2008年2月26日発行、表題「Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues」;米国特許7,314,923、2008年1月1日発行、表題「Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues」;米国特許7,816,333、2010年10月19日発行、表題「Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same」および米国刊行物第2011/0009471号、現在米国特許8,957,201、2015年2月17日発行、表題「Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same」、すべての用途において(for all purposes)、これら各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。40

【0183】

50

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、糖の2'位置にて修飾された少なくとも1ヌクレオチド、好ましくは2'-O-アルキル、2'-O-アルキル-O-アルキル、または2'-フルオロ-修飾ヌクレオチドを含む。他の好ましい態様において、RNA修飾は、ピリミジン、脱塩基残基、またはRNAの3'末端での逆方向(*inverted*)塩基のリボース上に2'-フルオロ、2'-アミノ、および2'0-メチル修飾を包含する。

【0184】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の修飾ヌクレオチドも有さないオリゴヌクレオチドと比較して、1、2、3、4、または5の範囲にあるオリゴヌクレオチドのTmの増大をもたらす少なくとも1個の修飾ヌクレオチドを有していてもよい。オリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドを有さないオリゴヌクレオチドと比較して、合計で2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、またはこれを超える温度の範囲にあるオリゴヌクレオチドのTmの増大をもたらす複数の修飾ヌクレオチドを有していてもよい。

10

【0185】

オリゴヌクレオチドは、異なる種類のヌクレオチドを互い違いにさせることを含んでもよい。例えば、オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドと2'-フルオロ-デオキシリボヌクレオチドとを互い違いにさせることを含んでもよい。オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドとを互い違いにさせることを含んでもよい。オリゴヌクレオチドは、2'-フルオロヌクレオチドと2'-O-メチルヌクレオチドとを互い違いにさせることを含nでもよい。オリゴヌクレオチドは、架橋ヌクレオチドと2'-フルオロまたは2'-O-メチルヌクレオチドとを互い違いにさせることを含んでもよい。

20

【0186】

d. ヌクレオチド間連結/主鎖

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオアートまたは他の修飾ヌクレオチド間連結を含有していてもよい。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオアートヌクレオシド間連結を含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオアートヌクレオシド間連結を、少なくとも2個のヌクレオチド間に含む。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオアートヌクレオシド間連結を、すべてのヌクレオチド間に含む。例えば、いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド間連結を、ヌクレオチド配列の5'または3'末端の、第1の、第2の、および/または第3のヌクレオシド間連結にて含む。

30

【0187】

使用されてもよい、リンを含有する連結は、これらに限定されないが、正常な3'-5'連結、これらの2'-5'連結類似体を有する、ホスホロチオアート、キラルのホスホロチオアート、ホスホジチオアート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルおよび他のアルキルホスホナート(3'アルキレンホスホナートおよびキラルのホスホナートを含む)、ホスフィナート、ホスホロアミダート(3'-アミノホスホロアミダートおよびアミノアルキルホスホロアミダートを含む)、チオノホスホロアミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルホスホトリエステル、ならびにボラノホスファートと、逆方向の極性を有するこれら(ここでヌクレオシド単位の隣接する対は3'-5'から5'-3'へまたは2'-5'から5'-2'へ連結されている)とを包含する;米国特許第3,687,808号;第4,469,863号;第4,476,301号;第5,023,243号;第5,177,196号;第5,188,897号;第5,264,423号;第5,276,019号;第5,278,302号;第5,286,717号;第5,321,131号;第5,399,676号;第5,405,939号;第5,453,496号;第5,455,233号;第5,466,677号;第5,476,925号;第5,519,126号;第5,536,821号;第5,541,306号;第5,550,111号;第5,563,253号;第5,571,799号;第5,587,361号;および第5,625,050号を参照。

40

【0188】

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、メチレン(メチルイミノ)またはMMI主鎖;アミド主鎖(De Mesmaeker et al. Ace.Chem.Res.1995,28:366-374を参照);モ

50

ルホリノ主鎖(SummertonおよびWeller、米国特許第5,034,506号を参照);またはペプチド核酸(PNA)主鎖(ここでオリゴヌクレオチドのホスホジエステル主鎖がポリアミド主鎖に置き換えられており、ヌクレオチドがポリアミド主鎖のアザ窒素原子へ直接的または間接的に結合されている、Nielsen et al., Science 1991, 254, 1497を参照)などのヘテロ原子主鎖を有していてもよい。

【0189】

e . 立体特異的オリゴヌクレオチド

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間のリン原子はキラルであり、およびオリゴヌクレオチドの特性はキラルのリン原子の立体配置に基づき調整される。いくつかの態様において、適切な方法は、立体制御されたやり方(例として、Oka N, Wada T, Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms. Chem Soc Rev. 2011 Dec; 40(12):5829-43に記載のとおりの)でP-キラルオリゴヌクレオチド類似体を合成するために使用されてもよい。いくつかの態様において、実質的にすべてのSpホスホチオアート糖間連結または実質的にすべてのRpホスホチオアート糖間連結のいずれかによって一緒に結び合わされたヌクレオシド単位を含む、ホスホチオアート含有オリゴヌクレオチドが提供される。いくつかの態様において、実質的にキラル純粋な糖間連結を有するかかるホスホチオアートオリゴヌクレオチドは、例えば、1996年12月12日に発行された米国特許5,587,261(この内容は全体が参照されることによって本明細書に組み込まれる)に記載されるとおり、酵素合成または化学合成によって調製される。いくつかの態様において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、標的核酸の選択的切断パターンを提供する。例えば、いくつかの態様において、キラル制御されたオリゴヌクレオチドは、例えば、2017年2月2日に公開された表題「CHIRAL DESIGN」の米国特許出願刊行物20170037399 A1(この内容は全体が参照されることによって本明細書に組み込まれる)に記載のとおり、核酸の相補的な配列内に单一の切断部位を提供する。

【0190】

f . モルホリノ

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、モルホリノをベースとした化合物であってもよい。モルホリノをベースとしたオリゴマー化合物は、Dwaine A.Braasch and David R.Corey, Biochemistry, 2002, 41(14), 4503-4510; Genesis, volume 30, issue 3, 2001; Heasman, J., Dev. Biol., 2002, 243, 209-214; Nasevicius et al., Nat. Genet., 2000, 26, 216-220; Lacerra et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2000, 97, 9591-9596; および1991年7月23日発行の米国特許第5,034,506号に記載されている。いくつかの態様において、モルホリノをベースとしたオリゴマー化合物は、ホスホジアミダートモルホリノオリゴマー(PMO)(例として、Iverson, Curr. Opin. Mol. Ther., 3:235-238, 2001; およびWang et al., J. Gene Med., 12:354-364, 2010に記載のとおり;これらの開示はこれら全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0191】

g . ペプチド核酸(PNA)

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド単位の糖とヌクレオシド間連結(主鎖)との両方とも、新規な基に置き換えられている。いくつかの態様において、塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持されている。かかるオリゴマー化合物の1つである、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているオリゴヌクレオチド模倣物は、ペプチド核酸(PNA)と称される。PNA化合物中のオリゴヌクレオチドの糖-主鎖は、アミド含有主鎖、例えば、アミノエチルグリシン主鎖に置き換えられている。核酸塩基は保持されており、主鎖のアミド部分のアザ窒素原子へ直接的または間接的に結合されている。PNA化合物の調製を報告する代表的な刊行物は、これらに限定されないが、米国特許第5,539,082号; 第5,714,331号; および第5,719,262号(これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)を包含する。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500から見出され得る。

10

20

30

40

50

【0192】

h . Gapmer

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、gapmerである。gapmerオリゴヌクレオチドは一般に、式5'-X-Y-Z-3'を有し、gap領域Yを囲む両脇の(flanking)領域としてXおよびZをもつ。いくつかの態様において、Y領域は、連続した一続きのヌクレオチド、例として、少なくとも6DNAヌクレオチドの領域であって、RNase HなどのRNaseを動員することが可能である。いくつかの態様において、gapmerは、RNaseが動員され次いで標的核酸を切断し得るポイントにて、標的核酸へ結合する。いくつかの態様において、Y領域は、高親和性修飾ヌクレオチド、例として、1~6個の修飾ヌクレオチドを含む領域XおよびZによって、5' と 3' の両方から挟まれている(flanked)。修飾ヌクレオチドの例は、これらに限定されないが、2'MOEまたは2'OMe、またはロックド核酸塩基(LNA)を包含する。両脇の配列XおよびZは、いくつかの態様において、長さが1~20ヌクレオチド、1~8ヌクレオチド、または1~5ヌクレオチドであってもよい。両脇の配列XおよびZは、同様の長さであってもよく、または同様の長さでなくてもよい。gapセグメントYは、いくつかの態様において、長さが5~20ヌクレオチド、6~12ヌクレオチド、または6~10ヌクレオチドのヌクレオチド配列であってもよい。

10

【0193】

いくつかの態様において、gapmerオリゴヌクレオチドのgap領域は、C4'-置換ヌクレオチド、非環式ヌクレオチド、およびアラビノから構成される(arabino-configured)ヌクレオチドなどのDNAヌクレオチドに加えて、効率的なRNase H作用を及ぼす条件を満たす(acceptable)ことが知られている修飾ヌクレオチドを含有していてもよい。いくつかの態様において、gap領域は、1以上の非修飾ヌクレオシド間を含む。いくつかの態様において、片脇または両脇の(one or both flanking)領域は、各々独立して、1以上のホスホロチオアートヌクレオシド間連結(例として、ホスホロチオアートヌクレオシド間連結または他の連結)を、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個の、またはこれより多いヌクレオチド間に含む。いくつかの態様において、gap領域および2つの脇の(two flanking)領域は、各々独立して、修飾ヌクレオシド間連結(例として、ホスホロチオアートヌクレオシド間連結または他の連結)を、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個の、またはこれより多いヌクレオチド間に含む。

20

【0194】

gapmerは、適切な方法を使用して産生されてもよい。gapmerの調製を教示する代表的な米国特許、米国特許刊行物、およびPCT刊行物は、これらに限定されないが、米国特許第5,013,830号;第5,149,797号;第5,220,007号;第5,256,775号;第5,366,878号;第5,403,711号;第5,491,133号;第5,565,350号;第5,623,065号;第5,652,355号;第5,652,356号;第5,700,922号;第5,898,031号;第7,432,250号;および第7,683,036号;米国特許刊行物第US20090286969号、第US20100197762号、および第US20110112170号;およびPCT刊行物第WO2008049085号および第WO2009090182号を包含し、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0195】

i . Mixmer

いくつかの態様において、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは、mixmerであってもよく、またはmixmer配列パターンを含んでいてもよい。一般に、mixmerは、天然に存在するヌクレオチドと天然に存在しないヌクレオチドとの両方を含むオリゴヌクレオチドであるか、または2つの異なるタイプの天然に存在しないヌクレオチドを、典型的には互い違いなパターンで含むオリゴヌクレオチドである。Mixmerは一般に、非修飾オリゴヌクレオチドより高い結合親和性を有し、標的分子に特異的に結合する、例として、標的分子上の結合部位を遮断するために使用されてもよい。一般に、mixmerは、RNaseを標的分子へ動員させず、よって標的分子の切断を促進しない。RNase Hを動員することが可能ではない、かかるオリゴヌクレオチドは記載されており、例えば、WO2007/112754またはWO2007/112753を参照。

40

50

【0196】

いくつかの態様において、mixmerは、ヌクレオチド類似体と天然に存在するヌクレオチドとの繰り返しパターン、もしくは1タイプのヌクレオチド類似体ともう1タイプのヌクレオチド類似体との繰り返しパターンを含むか、またはこれらからなる。しかしながら、mixmerは、繰り返しパターンを含む必要がなく、その代わりに、修飾ヌクレオチドと天然に存在するヌクレオチドとのいずれの配置も、または1タイプの修飾ヌクレオチドともう1タイプの修飾ヌクレオチドとのいずれの配置も含むことができる。繰り返しパターンは、実例として、2ヌクレオチド每または3ヌクレオチド毎に、LNAなどの修飾ヌクレオチドであってもよく、残りのヌクレオチドは、DNAなどの天然に存在するヌクレオチドであるか、あるいは2'MOEもしくは2'フルオロ類似体などの2'置換ヌクレオチド類似体、または本明細書に記載のいずれの他の修飾ヌクレオチドである。LNA単位などの修飾ヌクレオチドの繰り返しパターンが、固定された位置にて - 例として5'末または3'末にて、修飾ヌクレオチドと組み合わされてもよいことは認識されている。

10

【0197】

いくつかの態様において、mixmerは、5個より多く、4個より多く、3個より多く、または2個より多く連続した、DNAヌクレオチドなどの天然に存在するヌクレオチドの領域を含まない。いくつかの態様において、mixmerは、少なくとも2個連続したLNAなどの、少なくとも2個連続した修飾ヌクレオチドからなる領域を少なくとも含む。いくつかの態様において、mixmerは、少なくとも3個連続したLNAなどの、少なくとも3個連続した修飾ヌクレオチドからなる領域を少なくとも含む。

20

【0198】

いくつかの態様において、mixmerは、7個より多く、6個より多く、5個より多く、4個より多く、3個より多く、または2個より多く連続した、LNAなどのヌクレオチド類似体の領域を含まない。いくつかの態様において、LNA単位は、本明細書に言及されたヌクレオチド類似体などの他のヌクレオチド類似体に置き換えられていてよい。

【0199】

Mixmerは、非限定例におけるLNAヌクレオチドおよび2'-O-メチルヌクレオチドなどの親和性増強修飾ヌクレオチドの混合物を含むよう設計されていてよい。いくつかの態様において、mixmerは、修飾ヌクレオシド間連結(例として、ホスホロチオアートヌクレオシド間連結または他の連結)を、少なくとも2個の、少なくとも3個の、少なくとも4個の、少なくとも5個の、またはこれより多くのヌクレオチド間に含む。

30

【0200】

mixmerは、いずれの好適な方法を使用しても產生されてよい。mixmerの調製を教示する代表的な米国特許、米国特許刊行物、およびPCT刊行物は、米国特許刊行物第US20060128646号、第US20090209748号、第US20090298916号、第US20110077288号、および第US20120322851号、および米国特許第7687617号を包含する。

【0201】

いくつかの態様において、mixmerは、1以上のモルホリノヌクレオチドを含む。例えば、いくつかの態様において、mixmerは、1以上の他のヌクレオチド(例として、DNA、RNAヌクレオチド)または修飾ヌクレオチド(例として、LNA、2'-O-メチルヌクレオチド)と(例として、互い違いなやり方で)混合されたモルホリノヌクレオチドを含んでいてよい。

40

【0202】

いくつかの態様において、mixmerは、例えば、Touznik A.,et al.,LNA/DNA mixmer-based antisense oligonucleotides correct alternative splicing of the SMN2 gene and restore SMN protein expression in type 1 SMA fibroblasts Scientific Reports,volume 7,Article number:3672(2017), Chen S.et al.,Synthesis of a Morpholino Nucleic Acid (MNA)-Uridine Phosphoramidite, and Exon Skipping Using MNA/2'-O-Methyl Mixmer Antisense Oligonucleotide,Molecules 2016,21,1582(これら各々の内容は参照により本明細書に組み込まれる)に報告されるとおり、スプライス修正(splice correcting)またはエキソンスキッピングに有用である。

50

【0203】

j . RNA干渉(RNAi)

いくつかの態様において、本明細書に提供されるオリゴヌクレオチドは、低分子干渉RNAまたはサイレンシングRNAとしても知られている、低分子干渉RNA(siRNA)の形態であつてもよい。siRNAは、二本鎖RNA分子の類であって、細胞中のRNA干渉(RNAi)経路を介した分解のために核酸(例として、mRNA)を標的にする、典型的には長さが約20～25塩基対である。siRNA分子の特異性は、アンチセンス鎖分子のその標的RNAへの結合によって決定されてもよい。有効なsiRNA分子は一般に、より長いsiRNAもまた有効であり得るが、細胞中の非特異的なRNA干渉経路の引き金を、インターフェロン応答を介して引くことを防止するため、長さが30～35個未満の塩基対である。

10

【0204】

適切な標的RNA配列の選択を受けて、すべてのまたは一部の標的配列に相補的なヌクレオチド配列、すなわちアンチセンス配列を含むsiRNA分子は、適切な方法(例として、PCT刊行物第WO2004/016735号;および米国特許刊行物第2004/0077574号および第2008/0081791号を参照)を使用して設計および調製され得る。

【0205】

siRNA分子は、二本鎖(すなわち、アンチセンス鎖および相補的センス鎖を含むdsRNA分子)または一本鎖(すなわち、アンチセンス鎖だけを含むssRNA分子)であり得る。siRNA分子は、自己相補的センスおよびアンチセンス鎖を有する、二重鎖、非対称二重鎖、ヘアピン、または非対称ヘアピン2次構造を含み得る。

20

【0206】

二本鎖siRNAは、同じ長さまたは異なる長さのRNA鎖を含んでいてもよい。二本鎖siRNA分子はまた、ステムループ構造の單一オリゴヌクレオチド(ここでsiRNA分子の自己相補的センスおよびアンチセンス領域は、核酸ベースのまたは非核酸ベースのリンカー(単数または複数)を用いて連結されている)、ならびに2以上のループ構造と自己相補的センスおよびアンチセンス鎖を含むステムとを有する環状一本鎖RNA(ここで環状RNAは、in vivoまたはin vitroのいずれかで処理されてRNAiを媒介することが可能な活性siRNA分子を生成し得る)からも会合され得る。よって小さいヘアピンRNA(shRNA)分子もまた、本明細書に企図される。これらの分子は、逆相補的(センス)配列に加えて、特定のアンチセンス配列を含み、典型的にはスペーサーまたはループ配列によって分離されている。スペーサーまたはループの切断は、(任意に、片鎖または両鎖の3'末端および/または5'末端から1、2、3個以上のヌクレオチドの付加または除去をもたらすこともある追加のプロセシングステップにより)一本鎖RNA分子およびその逆相補体を、それらがアニールしてdsRNA分子を形成し得るように提供する。スペーサーは、スペーサーの切断(および任意に、これに続く、片鎖または両鎖の3'末端および/または5'末端から1、2、3、4、もしくはこれより多いヌクレオチドの付加または除去をもたらすこともあるプロセシングステップ)に先立ちアンチセンス配列とセンス配列とをアニールさせて二本鎖構造体(またはステム)を形成させるのに充分な長さであり得る。スペーサー配列は、2つの相補的ヌクレオチド配列領域間に置かれた無関係なヌクレオチド配列であってもよく、前記領域はアニールして二本鎖核酸になったらshRNAを含むことになる。

30

【0207】

siRNA分子の全体的な長さは、設計されたsiRNA分子のタイプに応じて、約14ヌクレオチドから約100ヌクレオチドまで変動し得る。一般に、これらのヌクレオチドの約14個と約50個との間は、RNA標的配列に相補的である、すなわちsiRNA分子の特定のアンチセンス配列を構成する。例えば、siRNAが二本鎖siRNAまたは一本鎖siRNAであるとき、長さは約14ヌクレオチドから約50ヌクレオチドまで変動し得るが一方、siRNAがshRNAまたは環状分子であるとき、長さは約40ヌクレオチドから約100ヌクレオチドまで変動し得る。

40

【0208】

siRNA分子は、分子の一方の末端にて3'突出を含んでいてもよく、他方の末端は平滑末

50

端であっても、または突出(5'または3')も有していてよい。siRNA分子が分子の両末端にて突出を含むとき、突出の長さは、同じであっても、または異なっていてもよい。一態様において、本開示のsiRNA分子は、分子の両末端上に約1～約3ヌクレオチドの3'突出を含む。

【0209】

k . マイクロRNA(miRNA)

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、マイクロRNA(miRNA)であってよい。マイクロRNA(「miRNA」と称される)は、標的RNA転写産物上の相補的な部位へ結合することによって遺伝子発現を制御する調節性分子の類に属する、小さいノンコーディングRNAである。典型的には、miRNAは、巨大なRNA前駆体(pri-miRNAと呼ばれる)から生成されるが、前記前駆体は核中で処理されておよそ70ヌクレオチドpre-miRNAになり、これが折り畳まれて不完全なステムループ構造体になる。これらのpre-miRNAは、典型的には、細胞質内で追加のプロセシングステップを経るが、前記細胞質内の長さが18～25ヌクレオチドの成熟miRNAは、RNase III酵素であるDicerによってpre-miRNAヘアピンの片側から切除される。

10

【0210】

本明細書に使用されるとき、miRNAは、pri-miRNA、pre-miRNA、成熟miRNA、または成熟miRNAの生物活性を保持するそのバリエントのフラグメントを包含する。一態様において、miRNAのサイズ範囲は、21ヌクレオチドから170ヌクレオチドまであり得る。一態様において、miRNAのサイズ範囲は、長さが70ヌクレオチドから170ヌクレオチドまでである。別の態様において、長さが21ヌクレオチドから25ヌクレオチドまでの成熟miRNAが使用され得る。

20

【0211】

1 . アプタマー

いくつかの態様において、本明細書に提供されるオリゴヌクレオチドは、アプタマーの形態であってよい。一般に、分子ペイロードの文脈において、アプタマーは、細胞中の小分子、タンパク質、核酸などの標的へ特異的に結合するいずれの核酸でもある。いくつかの態様において、アプタマーは、DNAアプタマーまたはRNAアプタマーである。いくつかの態様において、核酸アプタマーは、一本鎖のDNAまたはRNA(ssDNAまたはssRNA)である。一本鎖核酸アプタマーが、ヘリックスおよび/またはループ構造を形成してもよいことは理解されるべきである。核酸アプタマーを形成する核酸は、天然に存在するヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、炭化水素リンカー(例として、アルキレン)もしくはポリエーテルリンカー(例として、PEGリンカー)が1以上のヌクレオチド間に挿入された天然に存在するヌクレオチド、炭化水素もしくはPEGリンカーが1以上のヌクレオチド間に挿入された修飾ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを含んでいてよい。アプタマーおよびアプタマーを產生する方法を記載する例示の刊行物および特許は、例として、Lorsch and Szostak, 1996; Jayasena, 1999; 米国特許第5,270,163号; 第5,567,588号; 第5,650,275号; 第5,670,637号; 第5,683,867号; 第5,696,249号; 第5,789,157号; 第5,843,653号; 第5,864,026号; 第5,989,823号; 第6,569,630号; 第8,318,438号およびPCT出願WO 99/31275を包含するが、これら各々は参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0212】

m . リボザイム

いくつかの態様において、本明細書に提供されるオリゴヌクレオチドは、リボザイムの形態であってよい。リボザイム(リボ核酸酵素)は、タンパク質酵素の作用と同様の特定の生化学的反応を実施することが可能な分子、典型的にはRNA分子である。リボザイムは、これらがハイブリダイズしているRNA分子(mRNA、RNA含有基質、lncRNA、およびリボザイム自体など)中の特定のホスホジエステル連結での切断能を包含する酵素活性をもつ分子である。

40

【0213】

リボザイムは、数種の物理的構造の1つを取り得、これらの1つが「ハンマーヘッド」と

50

呼ばれる。ハンマーへッド型リボザイムは、保存された9塩基を含有する触媒コア、二本鎖システムおよびループ構造(ステムループII)、ならびに触媒コアを囲む両脇の標的RNA領域に相補的な2つの領域から構成される。両脇の領域によって、リボザイムは、二本鎖システムIおよびIIIを形成することで標的RNAへ特異的に結合することができる。切断は、3', 5'-リン酸ジエステルから2', 3'-環状リン酸ジエステルへのエステル交換反応による特定のリボヌクレオチド三塩基(triplet)の次に、*cis*(すなわち、ハンマーへッドモチーフを含有する同じRNA分子の切断)で、または*trans*(リボザイムを含有するもの以外のRNA基質の切断)で生じる。理論によって拘束されることは望まないが、この触媒活性は、リボザイムの触媒領域中に高度に保存された特定の配列が存在することを要すると考えられている。

【0214】

10

リボザイム構造中の修飾はまた、様々な分子の非コア部分の、非ヌクレオチド分子との置換または置き換えも包含する。例えば、Benselerら(J.Am.Chem.Soc.(1993)115:84 83-8484)は、ハンマーへッド様分子を開示しており、ここでステムIIの2塩基対およびループIIの4ヌクレオチドすべてが、ヘキサエチレンギリコール、プロパンジオール、ビス(トリエチレンギリコール)ホスファート、トリス(プロパンジオール)ビスホスファート、またはビス(プロパンジオール)ホスファートを基にする非ヌクレオシドリンカーに置き換えられていた。Maら(Biochem.(1993)32:1751-1758; Nucleic Acids Res.(1993)21:2 585-2589)は、TARリボザイムヘアピンの6ヌクレオチドループを、エチレンギリコールに関する非ヌクレオチドリンカーに置き換えた。Thomsonら(Nucleic Acids Res.(1993)21:5600-5603)は、ループIIを、長さが13、17、および19原子の線状の非ヌクレオチドリンカーに置き換えた。

【0215】

20

リボザイムオリゴヌクレオチドは、周知の方法(例として、PCT刊行物WO9118624; WO9413688; WO9201806; およびWO92/07065; ならびに米国特許5436143および565 0502を参照)を使用して調製され得るか、または商業的供給源(例として、US Biochemicals)から購入され得、所望の場合、細胞中ヌクレアーゼによる分解に対するオリゴヌクレオチドの耐性を増大させるためにヌクレオチド類似体を組み込み得る。リボザイムは、例として、市販の合成機(例として、Applied Biosystems, Inc. または Milligenによって製造された)の使用による、いずれの知られているやり方で合成されてもよい。リボザイムはまた、従来の手段によって、組換えベクターにおいても産生されてよい。Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(Current edition)を参照。リボザイムRNA配列は、例えば、T7またはSP6などのRNAポリメラーゼを使用することによる従来法で、合成されてもよい。

【0216】

30

n . ガイド核酸

いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、ガイド核酸、例として、ガイドRNA(gRNA)分子である。一般に、ガイドRNAは、(1)Cas9などの、核酸をプログラムできるDNA結合タンパク質(napDNAbp)へ結合する骨格(scaffold)配列、および(2)gRNAが、核酸をプログラムできるDNA結合タンパク質をDNA標的配列に近づけるために結合するDNA標的配列(例として、ゲノムDNA標的)を定義するヌクレオチドスペーサー部分から構成される低分子合成RNAである。いくつかの態様において、napDNAbpは、核酸をプログラムできるタンパク質に、標的DNA配列(例として、標的ゲノムDNA配列)を標的にさせる1以上のRNA(単数または複数)と(例として、これと結合して、またはこれと結び付いて)複合体を形成する、核酸をプログラムできるタンパク質である。いくつかの態様において、核酸プログラム可能なヌクレアーゼは、RNAとの複合体にあるとき、ヌクレアーゼ:RNA複合体と称されることもある。ガイドRNAは、2以上のRNAの複合体として、または単一のRNA分子として存在し得る。

【0217】

40

単一のRNA分子として存在するガイドRNA(gRNA)は、単一のガイドRNA(sgRNA)と称されることもあるが、gRNAはまた、单一分子または2以上の分子の複合体のいずれかとし

50

て存在するガイドRNAを指すためにも使用される。典型的には、単一のRNA種として存在するgRNAは、2つのドメインを含む:(1)標的核酸(すなわち、Cas9複合体の標的への結合を指向する)との相同性を共有するドメイン;および(2)Cas9タンパク質に結合するドメイン。いくつかの態様において、ドメイン(2)は、tracrRNAとして知られている配列に対応し、ステムループ構造を含む。いくつかの態様において、ドメイン(2)は、Jinek et al., *Science* 337:816-821(2012)(この内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる)に提供されるとおり、tracrRNAと同一または相同である。

【0218】

いくつかの態様において、gRNAは、ドメイン(1)および(2)の2以上を含み、伸長(extended)gRNAと称されることもある。例えば、伸長gRNAは、本明細書に記載のとおり、2以上のCas9タンパク質に結合し、および2以上の別個の領域での標的核酸に結合するであろう。gRNAは、ヌクレアーゼ/RNA複合体の該標的部位への結合を媒介する標的部位に相補的なヌクレオチド配列を含み、ヌクレアーゼ:RNA複合体の配列特異性を提供する。いくつかの態様において、RNAをプログラムできるヌクレアーゼは、(CRISPR関連系)Cas9エンドヌクレアーゼ、例えば、*Streptococcus pyogenes*からのCas9(Csn1)である(例として、“Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*.” Ferretti J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L., White J., Yuan X., Clifton S.W., Roe B.A., McLaughlin R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663(2001); “CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III.” Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., *Nature* 471:602-607(2011);および“A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.” Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. *Science* 337:816-821(2012)(これら各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる)を参照。

【0219】

o . マルチマー

いくつかの態様において、分子ペイロードは、リンカーによって接続された2以上のオリゴヌクレオチドのマルチマー(例として、コンカテマー)を含んでいてもよい。このように、いくつかの態様において、複合体のオリゴヌクレオチドの負荷/loading)は、標的化剤上の利用可能な連結部位(例として、抗体上の利用可能なチオール部位)を超えて増大され得るか、または具体的なペイロード負荷量に達するよう別様に整え得る。マルチマー中のオリゴヌクレオチドは、同じかまたは異なり得る(例として、異なる遺伝子、もしくは同じ遺伝子上の異なる部位、またはそれらの産物を標的にする)。

【0220】

いくつかの態様において、マルチマーは、切断可能なリンカーによって一緒に連結された2以上のオリゴヌクレオチドを含む。しかしながら、いくつかの態様において、マルチマーは、切断不能なリンカーによって一緒に連結された2以上のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、マルチマーは、一緒に連結された2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはこれより多くのオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、マルチマーは、一緒に連結された2~5、2~10、または4~20オリゴヌクレオチドを含む。

【0221】

いくつかの態様において、マルチマーは、(線状配置において)末端間(end-to-end)で連結された2以上のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、マルチマーは、オリゴヌクレオチドベースのリンカー(例として、ポリ-dTリンカー、塩基性リンカー)を介して、末端間で連結された2以上のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、マルチマーは、あるオリゴヌクレオチドの3'末端へ連結された、別のオリゴヌクレオチドの5'末端を含む。いくつかの態様において、マルチマーは、あるオリゴヌクレオチドの

10

20

30

40

50

3'末端へ連結された、別のオリゴヌクレオチドの3'末端を含む。いくつかの態様において、マルチマーは、あるオリゴヌクレオチドの5'末端へ連結された、別のオリゴヌクレオチドの5'末端を含む。またさらに、いくつかの態様において、マルチマーは、分枝リンカーによって一緒に連結された複数のオリゴヌクレオチドを含む分枝構造を含み得る。

【0222】

本明細書に提供される複合体に使用されてもよいマルチマーのさらなる例は、例えば、2015年11月5日に公開され、Methods of delivering multiple targeting oligonucleotides to a cell using cleavable linkersという表題の米国特許出願第2015/0315588 A1号;2015年9月3日に公開され、Multimeric Oligonucleotide Compoundsという表題の米国特許出願第2015/0247141 A1号;2011年6月30日に公開され、Immunostimulatory Oligonucleotide Multimersという表題の米国特許出願第US 2011/0158937 A1号;および1997年12月2日に発行され、Triplex-Forming Antisense Oligonucleotides Having Abasic Linkers Targeting Nucleic Acids Comprising Mixed Sequences Of Purines And Pyrimidinesという表題の米国特許第5,693,773号に開示されており、これら各自の内容はそれら全体が参照されることにより本明細書に組み込まれる。

【0223】

ii. 小分子:

いずれの好適な小分子も、本明細書に記載のとおり、分子ペイロードとして使用されてもよい。いくつかの態様において、小分子は、DMD突然変異体配列のエキソンスキッピングを増強する。いくつかの態様において、小分子は、「IDENTIFICATION OF SMALL MOLECULES THAT FACILITATE THERAPEUTIC EXON SKIPPING」という表題の2014年3月20日に公開された米国特許出願刊行物US20140080896A1に記載されたとおりである。小分子ペイロードのさらなる例は、「Identification of structurally similar small molecules that enhance therapeutic exon skipping」という表題の2018年5月29日に登録された米国特許第9,982,260号に提供されている。例えば、いくつかの態様において、小分子は、ペルフェナジン、フルベンチキソール、ズクロベンチキソールまたはコリナンテイン(corynanthine)などのエキソンスキッピングのエンハンサーである。いくつかの態様において、エキソンスキッピングの小分子エンハンサーは、リアノジン受容体またはカルモジュリンを阻害する。いくつかの態様において、小分子は、マニュマイシンAなどのH-Ras経路インヒビターである。いくつかの態様において、小分子は、終止コドンのサプレッサーであり、およびリボソームを未熟終止コドンに脱感作させる。いくつかの態様において、小分子は、2013年6月25日に公開されたMcElroy S.P. et al. “A Lack of Premature Termination Codon Read Through Efficacy of PTC124 (Ataluren) in a Diverse Array of Reporter Assays.” PLOS Biologyに記載されたとおり、アタルレンである。いくつかの態様において、小分子は、例として、Manzur, A.Y. et al. “Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy”に記載されたとおり、コルチコステロイドである。いくつかの態様において、小分子は、ユートロフィンなどのジストロフィンの機能を置き換える遺伝子の発現および/または活性を上方調節する。いくつかの態様において、ユートロフィンモジュレーターは、「TREATMENT OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY」という表題の2007年8月16日に公開された国際刊行物番号WO2007091106および/または、「COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY」という表題の2017年10月5日に公開された国際刊行物番号WO/2017/168151に記載されたとおりである。

【0224】

iii. ペプチド/タンパク質

いずれの好適なペプチドまたはタンパク質も、本明細書に記載のとおりの分子ペイロードとして使用されてもよい。いくつかの態様において、タンパク質は、酵素である。いくつかの態様において、これらのペプチドまたはタンパク質は、数種の方法論、例として、ファージディスプレードペプチドライブリ、1ビーズ・1化合物ペプチドライブリ、ま

10

20

30

40

50

たは位置走査性合成ペプチドコンビナトリアルライブラリを使用して產生、合成、および/または誘導体化されてもよい。例示の方法論は、当該技術分野において特徴づけられてきており、参考により組み込まれる(Gray, B.P. and Brown, K.C. "Combinatorial Peptide Libraries: Mining for Cell-Binding Peptides" Chem Rev. 2014, 114:2, 1020-1081.; Samoylova, T.I. and Smith, B.F. "Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening." Muscle Nerve, 1999, 22:4. 460-6.)。

【0225】

いくつかの態様において、ペプチドは、突然変異したDMDアレルから発現されたmRNAにおけるエキソンスキッピングを容易にしてもよい。いくつかの態様において、ペプチドは、機能的ジストロフィンの発現および/またはジストロフィンの代わりに機能することができるタンパク質の発現を促進してもよい。いくつかの態様において、ペイロードは、ジストロフィンの機能的フラグメント、例として、機能的ジストロフィンタンパク質のアミノ酸セグメントであるタンパク質である。

10

【0226】

いくつかの態様において、ペプチドまたはタンパク質は、少なくとも1つのジンクフィンガーを含む。

【0227】

いくつかの態様において、ペプチドまたはタンパク質は、約2~25アミノ酸、約2~20アミノ酸、約2~15アミノ酸、約2~10アミノ酸、または約2~5アミノ酸を含んでいてよい。ペプチドまたはタンパク質は、天然に存在するアミノ酸、例として、システイン、アラニン、または非天然に存在しないか、もしくは修飾されたアミノ酸を含んでいてよい。天然に存在しないアミノ酸は、-アミノ酸、ホモ-アミノ酸、プロリン誘導体、3-置換アラニン誘導体、線形コアアミノ酸、N-メチルアミノ酸、および当該技術分野において知られているその他のアミノ酸を包含する。いくつかの態様において、ペプチドは、線状であってもよい;他の態様において、ペプチドは、環状、例として二環式であってもよい。

20

【0228】

iv. 核酸構築物

いずれの好適な遺伝子発現コンストラクトも、本明細書に記載のとおりの分子ペイロードとして使用されてもよい。いくつかの態様において、遺伝子発現コンストラクトは、ベクターまたはcDNAフラグメントであってもよい。いくつかの態様において、遺伝子発現コンストラクトは、メッセンジャーRNA(mRNA)であってもよい。いくつかの態様において、本明細書に使用されるmRNAは、修飾されたmRNA、例として、2014年4月24日に発行の米国特許8,710,200、表題「Engineered nucleic acids encoding a modified erythropoietin and their expression」に記載されるとおりのものであってもよい。いくつかの態様において、mRNAは、5'メチルcapを含んでいてもよい。いくつかの態様において、mRNAは、ポリAテール、任意に長さが最大160ヌクレオチドまでのものを含んでいてよい。遺伝子発現コンストラクトは、ジストロフィンタンパク質、ジストロフィンフラグメント、ミニ-ジストロフィン、ユートロフィンタンパク質、またはジストロフィンと共に機能を共有するいずれのタンパク質の配列をコードしてもよい。いくつかの態様において、遺伝子発現コンストラクトは、筋細胞の核内で発現、例として、過剰発現、されてもよい。いくつかの態様において、遺伝子発現コンストラクトは、少なくとも1のジンクフィンガーを含むタンパク質をコードする。いくつかの態様において、遺伝子発現コンストラクトは、ジストロフィン、またはジストロフィンと機能を共有するタンパク質、例として、ユートロフィン、の発現を促進するタンパク質をコードする。いくつかの態様において、遺伝子発現コンストラクトは、遺伝子編集酵素をコードする。いくつかの態様において、遺伝子発現コンストラクトは、「Optimized mini-dystrophin genes and expression cassettes and their use」という表題の2017年12月28日に公開された米国特許出願刊行物US20170368198A1; Duan D. "Myodys, a full-length dystrophin plasmid vector for Duchenne and Becker muscular dystrophy gene therapy."

30

"Curr Opin Mol Ther 2008;10:86-94;およびTang, Y. et al., "AAV-directed mus

40

50

cular dystrophy gene therapy " Expert Opin Biol Ther. 2010 Mar;10(3):395-408に開示された発現力セットに記載されたとおりであり、これらの各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0229】

C. リンカー

本明細書に記載の複合体は一般に、筋標的化剤を分子ペイロードへ接続するリンカーを含む。リンカーは、少なくとも1つの共有結合を含む。いくつかの態様において、リンカーニーは、筋標的化剤を分子ペイロードへ接続する単結合、例として、ジスルフィド結合またはジスルフィド架橋であってもよい。しかしながら、いくつかの態様において、リンカーニーは、複数の共有結合を通して、筋標的化剤を分子へ接続していてもよい。いくつかの態様において、リンカーニーは、切断可能なリンカーニーであってもよい。しかしながら、いくつかの態様において、リンカーニーは、切断不能なリンカーニーであってもよい。リンカーニーは一般に、*in vitro*および*in vivo*で安定しており、ある細胞環境において安定していてもよい。加えて、一般にリンカーニーは、筋標的化剤または分子ペイロードのいずれかの機能特性に負の影響を及ぼさない。リンカーニー合成の例および方法は、当該技術分野において知られている(例として、Kline,T.et al. "Methods to Make Homogenous Antibody Drug Conjugates." Pharmaceutical Research,2015,32:11,3480-3493.;Jain,N.et al. "Current ADC Linker Chemistry" Pharm Res.2015,32:11,3526-3540.;McCombs,J.R. and Owen,S.C. "Antibody Drug Conjugates:Design and Selection of Linker,Payload and Conjugation Chemistry" AAPS J.2015,17:2,339-351.を参照)。

【0230】

リンカーニーの前駆体は、典型的には、筋標的化剤と分子ペイロードとの両方へ付着できる2つの異なる反応性の高い種を含有しているであろう。いくつかの態様において、2つの異なる反応性の高い種は、求核試薬および/または求電子試薬であってもよい。いくつかの態様において、リンカーニーは、筋標的化剤のリシン残基またはシステイン残基への抱合を介して、筋標的化剤へ接続されている。いくつかの態様において、リンカーニーは、マレイミド含有リンカーニーを介して筋標的化剤のシステイン残基へ接続されており、ここで任意に、マレイミド含有リンカーニーは、マレイミドカプロイルまたはマレイミドメチルシクロヘキサン-1-カルボキシラート基を含む。いくつかの態様において、リンカーニーは、3-アリールプロピオニトリル官能基を介して、筋標的化剤のシステイン残基またはチオール官能化分子ペイロードへ接続されている。いくつかの態様において、リンカーニーは、アミド結合、ヒドラジド、トリアゾール、チオエーテル、またはジスルフィド結合を介して、筋標的化剤および/または分子ペイロードへ接続されている。

【0231】

i. 切断可能なリンカーニー

切断可能なリンカーニーは、プロテアーゼ感受性リンカーニー、pH感受性リンカーニー、またはグルタチオン感受性リンカーニーであってもよい。これらのリンカーニーは一般に、細胞内のみで切断可能であって、好ましくは、細胞外環境において、例として、筋細胞の細胞外において安定している。

【0232】

プロテアーゼ感受性リンカーニーは、プロテアーゼ酵素活性によって切断可能である。これらのリンカーニーは、典型的にはペプチド配列を含んでおり、長さが2~10アミノ酸、約2~5アミノ酸、約5~10アミノ酸、約10アミノ酸、約5アミノ酸、約3アミノ酸、または約2アミノ酸であってもよい。いくつかの態様において、ペプチド配列は、天然に存在するアミノ酸、例として、システイン、アラニン、または天然に存在しないかもしくは修飾されたアミノ酸を含んでいてもよい。天然に存在しないアミノ酸は、D-アミノ酸、ホモ-アミノ酸、プロリン誘導体、3-置換アラニン誘導体、線形コアアミノ酸、N-メチルアミノ酸、および当該技術分野において知られているその他のアミノ酸を包含する。いくつかの態様において、プロテアーゼ感受性リンカーニーは、バリン-シトルリンまたはアラニン-シトルリンのジペプチド配列を含む。いくつかの態様において、プロテアーゼ感受性リンカーニーは、リ

10

20

30

40

50

ソソームのプロテアーゼ、例として、カテプシンB、および/またはエンドソームのプロテアーゼによって切断され得る。

【0233】

pH感受性リンカーは、高または低pH環境において容易に分解される共有結合の連結である。いくつかの態様において、pH感受性リンカーは、4~6の範囲にあるpHにて切断されてもよい。いくつかの態様において、pH感受性リンカーは、ヒドラゾンまたは環状アセタールを含む。いくつかの態様において、pH感受性リンカーは、エンドソームまたはリソソーム内で切断される。

【0234】

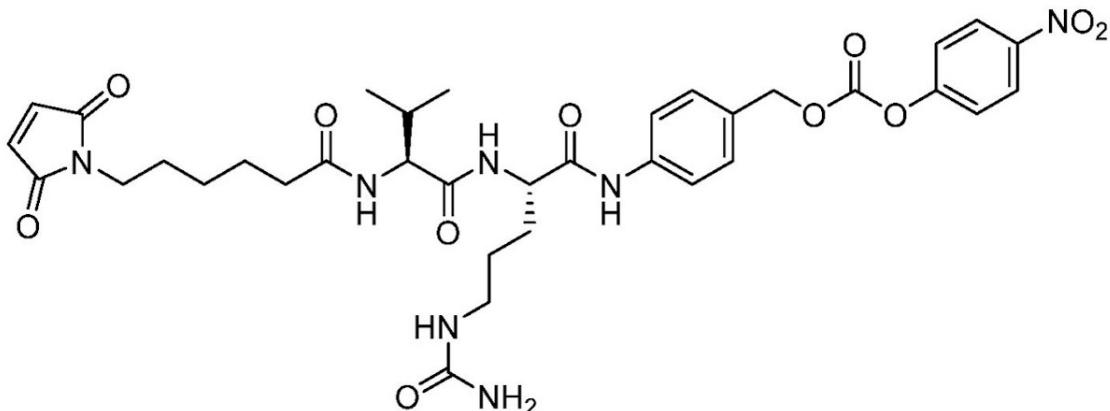
いくつかの態様において、グルタチオン感受性リンカーは、ジスルフィド部を含む。いくつかの態様において、グルタチオン感受性リンカーは、細胞内部でのグルタチオン種とのジスルフィド交換反応によって切断される。いくつかの態様において、ジスルフィド部はさらに、少なくとも1アミノ酸、例としてシステイン残基を含む。

10

【0235】

いくつかの態様において、リンカーは、Val-citリンカー(例として、US米国特許6,214,345(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるとおり)である。いくつかの態様において、抱合前のval-citリンカーは、以下の構造を有する:

【化1】

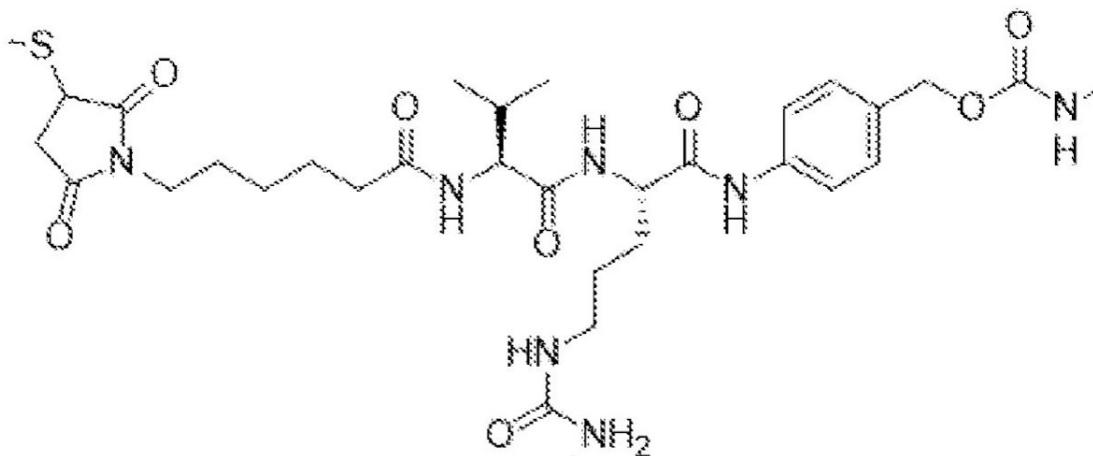


20

【0236】

いくつかの態様において、抱合後のval-citリンカーは、以下の構造を有する:

【化2】



30

【0237】

ii. 切断不能リンカー

40

50

いくつかの態様において、切断不能なリンカーが使用されてもよい。一般に、切断不能なリンカーは、細胞環境または生理環境において容易に分解され得ない。いくつかの態様において、切断不能なリンカーは、任意に置換されていてもよいアルキル基を含むが、ここで置換は、ハロゲン、ヒドロキシル基、酸素種、および他の一般的な置換を包含してもよい。いくつかの態様において、リンカーは、任意に置換されていてもよいアルキル、任意に置換されていてもよいアルキレン、任意に置換されていてもよいアリーレン、ヘテロアリーレン、少なくとも1個の非天然アミノ酸を含むペプチド配列、トランケートされたグリカン、酵素的に分解され得ない糖(单数もしくは複数)、アジド、アルキン-アジド、LPXT配列を含むペプチド配列、チオエーテル、ビオチン、ビフェニル、繰り返し単位のポリエチレングリコールもしくは等価な化合物、酸エステル、酸アミド、スルファミド、および/またはアルコキシ-アミンリンカーを含んでいてもよい。いくつかの態様において、ソルターゼ媒介ライゲーションは、LPXT配列を含む筋標的化剤を(G)_n配列を含む分子ペイロードへ連結するために利用されるであろう(例として、Proft T. Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilization. Biotechnol Lett. 2010, 32(1):1-10を参照)。

【0238】

いくつかの態様において、リンカーは、置換されたアルキレン、任意に置換されていてもよいアルケニレン、任意に置換されていてもよいアルキニレン、任意に置換されていてもよいシクロアルキレン、任意に置換されていてもよいシクロアルケニレン、任意に置換されていてもよいアリーレン、N、O、およびSから選択される少なくとも1個のヘテロ原子をさらに含む任意に置換されていてもよいヘテロアリーレン; N、O、およびSから選択される少なくとも1個のヘテロ原子をさらに含む任意に置換されていてもよいヘテロシクリレン; イミノ、任意に置換されていてもよい窒素種、任意に置換されていてもよい酸素種O、任意に置換されていてもよい硫黄種、またはポリ(アルキレンオキシド)、例として、ポリエチレンオキシドまたはポリプロピレンオキシドを含んでいてもよい。

【0239】

iii. リンカー抱合

いくつかの態様において、リンカーは、ホスファート、チオエーテル、エーテル、炭素-炭素、もしくはアミド結合を介して筋標的化剤および/または分子ペイロードへ接続されている。いくつかの態様において、リンカーは、リン酸塩またはホスホロチオアート基、例として、オリゴヌクレオチド主鎖の末端のホスファートを通してオリゴヌクレオチドへ接続されている。いくつかの態様において、リンカーは、筋標的化剤上に存在するリシン残基またはシステイン残基を通して、筋標的化剤、例として抗体へ接続されている。

【0240】

いくつかの態様において、リンカーは、トリアゾールを形成するアジドとアルキンとの間のシクロ付加反応によって、筋標的化剤および/または分子ペイロードへ接続されており、ここでアジドおよびアルキンは、筋標的化剤、分子ペイロード、またはリンカー上に位置付けられていてもよい。いくつかの態様において、アルキンは、環状アルキン、例としてシクロオクタンであってもよい。いくつかの態様において、アルキンは、ビシクロノニン(またビシクロ[6.1.0]ノニンまたはBCNとしても知られている)または置換ビシクロノニンであってもよい。いくつかの態様において、シクロオクタンは、2011年11月3日に公開の国際特許出願刊行物WO2011136645、表題「Fused Cyclooctyne Compounds A nd Their Use In Metal-free Click Reactions」に記載のとおりである。いくつかの態様において、アジドは、アジドを含む糖または炭水化物分子であってもよい。いくつかの態様において、アジドは、6-アジド-6-デオキシガラクトースまたは6-アジド-N-アセチルガラクトサミンであってもよい。いくつかの態様において、アジドを含む糖または炭水化物分子は、2016年10月27日に公開の国際特許出願刊行物WO2016170186、表題「Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A (1,4)-N-Acetylgalactosaminyltransferase」に記載のとおりである。いくつかの態様において、トリアゾールを形成するアジドとアルキンとの間

10

20

30

40

50

のシクロ付加反応(ここでアジドおよびアルキンは、筋標的化剤、分子ペイロード、またはリンカー上に位置付けられていてもよい)は、2014年5月1日に公開の国際特許出願刊行物WO2014065661、表題「Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof」;または2016年10月27日に公開の国際特許出願刊行物WO2016170186、表題「Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A (1,4)-N-Acetylgalactosaminyltransferase」に記載のとおりである。

【0241】

いくつかの態様において、リンカーはさらに、スペーサー、例として、ポリエチレングリコールスペーサーまたはアシリル/カルバモイルスルファミドスペーサー、例として、HydraSpace(商標)スペーサーを含む。いくつかの態様において、スペーサーは、Verkade,J.M.M. et al., "A Polar Sulfamide Spacer Significantly Enhances the Manufacturability, Stability, and Therapeutic Index of Antibody-Drug Conjugates", Antibodies, 2018, 7, 12に記載のとおりである。10

【0242】

いくつかの態様において、リンカーは、求ジエン体とジエン/ヘテロ-ジエンとの間のディールス・アルダー反応によって、筋標的化剤および/または分子ペイロードへ接続されるが、ここで求ジエン体およびジエン/ヘテロ-ジエンは、筋標的化剤、分子ペイロード、またはリンカー上に位置付けられていてもよい。いくつかの態様において、リンカーは、他のペリ環状反応、例として、エン反応によって、筋標的化剤および/または分子ペイロードへ接続される。いくつかの態様において、リンカーは、アミド、チオアミド、またはスルホンアミド結合反応によって、筋標的化剤および/または分子ペイロードへ接続される。いくつかの態様において、リンカーは、リンカーと筋標的化剤および/または分子ペイロードとの間に存在するオキシム基、ヒドラゾン基、またはセミカルバジド基を形成する縮合反応によって、筋標的化剤および/または分子ペイロードへ接続される。20

【0243】

いくつかの態様において、リンカーは、求核試薬(例として、アミン基またはヒドロキシル基)と求電子試薬(例として、カルボン酸またはアルデヒド)との間の抱合体付加反応によって、筋標的化剤および/または分子ペイロードへ接続される。いくつかの態様において、リンカーと筋標的化剤または分子ペイロードとの間の反応に先立ち、求核試薬はリンカー上に存在していてもよく、求電子試薬は筋標的化剤または分子ペイロード上に存在していてもよい。いくつかの態様において、リンカーと筋標的化剤または分子ペイロードとの間の反応に先立ち、求電子試薬はリンカー上に存在していてもよく、求核試薬は筋標的化剤または分子ペイロード上に存在していてもよい。いくつかの態様において、求電子試薬は、アジド、ケイ素中心、カルボニル、カルボン酸、無水物、イソシアナート、チオイソシアナート、スクシニミジルエステル、スルホスクシニミジルエステル、マレイミド、アルキルハロゲン化物、アルキル擬ハロゲン化物、エポキシド、エピスルフィド、アジリジン、アリール、活性化リン中心、および/または活性化硫黄中心であってもよい。いくつかの態様において、求核試薬は、任意に置換されていてもよいアルケン、任意に置換されていてもよいアルキン、任意に置換されていてもよいアリール、任意に置換されていてもよいヘテロシクリル、ヒドロキシル基、アミノ基、アルキルアミノ基、アニリド(anilido)基、またはチオール基であってもよい。30

【0244】

D . 抗体-分子ペイロード複合体の例

他の本開示の側面は、本明細書に記載の分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチド)のいずれかへ共有結合的に連結された、本明細書に記載のいずれか1つの筋標的化剤(例として、抗トランスフェリン受容体抗体)を含む複合体を提供する。いくつかの態様において、筋標的化剤(例として、抗トランスフェリン受容体抗体)は、リンカーを介して分子ペイロード(例として、オリゴヌクレオチド)へ共有結合的に連結されている。本明細書に記載のリンカーのいずれも、使用されてもよい。いくつかの態様において、リンカーは、オリ40

10

20

30

40

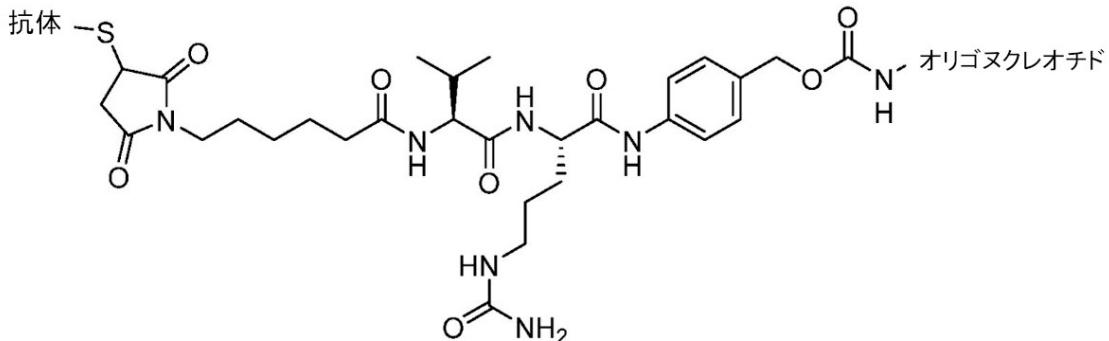
50

ゴヌクレオチドの5'末端、3'末端、または内部へ連結されている。いくつかの態様において、リンカーは、チオール反応性の連結を介して(例として、抗体中のシステインを介して)抗体へ連結されている。

【0245】

Val-citリンカーを介してオリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含む複合体の例示の構造は、下に提供される:

【化3】



ここでリンカーは、オリゴヌクレオチドの5'末端、3'末端、または内部へ連結されており、およびここでリンカーは、チオール反応性の連結を介して(例として、抗体中のシステインを介して)抗体へ連結されている。

【0246】

抗体は、種々の化学量論でオリゴヌクレオチドへ連結され得ることが解されるはずであって、前記特性は薬物抗体比(DAR)と称されることもあり、ここで「薬物」はオリゴヌクレオチドである。いくつかの態様において、1つのオリゴヌクレオチドが抗体へ連結されている(DAR=1)。いくつかの態様において、2つのオリゴヌクレオチドが抗体へ連結されている(DAR=2)。いくつかの態様において、3つのオリゴヌクレオチドが抗体へ連結されている(DAR=3)。いくつかの態様において、4つのオリゴヌクレオチドが抗体へ連結されている(DAR=4)。いくつかの態様において、各々が異なるDARを有する異なる複合体の混合物が提供される。いくつかの態様において、かかる混合物中の複合体の平均DARは、1～3、1～4、1～5以上の範囲にあってもよい。DARは、オリゴヌクレオチドを抗体上の種々の部位へ抱合させることによって、および/またはマルチマーを抗体上の1以上の部位へ抱合させることによって、増大されてもよい。例えば、2のDARは、單一オリゴヌクレオチドを抗体上の2つの異なる部位へ抱合させることによって、または二量体オリゴヌクレオチドを抗体の单一部位へ抱合させることによって、達成されてもよい。

【0247】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、オリゴヌクレオチド(例として、DMDのエキソンスキッピングを誘導することができるオリゴヌクレオチド)へ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体(例として、本明細書に記載のとおりの抗体またはそのいずれのバリアント)を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、リンカー(例として、Val-citリンカー)を介してオリゴヌクレオチド(例として、DMDのエキソンスキッピングを誘導することができるオリゴヌクレオチド)へ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体(例として、本明細書に記載のとおりの抗体またはそのいずれのバリアント)を含む。いくつかの態様において、リンカー(例として、Val-citリンカー)は、ヌクレオチド(例として、DMDのエキソンスキッピングを誘導することができるオリゴヌクレオチド)の5'末端、3'末端、または内部へ連結されている。いくつかの態様において、リンカー(例として、Val-citリンカー)は、チオール反応性の連結を介して(例として、抗体中のシステインを介して)、抗体(例として、本明細書に記載のとおりの抗体またはそのいずれのバリアント)へ連結されている。

【0248】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、DMD標的化オリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

へ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、表1.1中に示されるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3と同じCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3;ならびに表1.1中に示されるCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3と同じCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む。

【0249】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、DMD標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号283のアミノ酸配列を有するVHおよび配列番号284のアミノ酸配列を有するVLを含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、DM 10 D標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号285のアミノ酸配列を有するVHおよび配列番号286のアミノ酸配列を有するVLを含む。

【0250】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、DMD標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号289のアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号290のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、DMD標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号291のアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号292のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。 20

【0251】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、リンカー(例として、Val-citリンカー)を介してDMD標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、表1.1中に示されるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3と同じCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3;ならびに表1.1中に示されるCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3と同じCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む。

【0252】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、リンカー(例として、Val-citリンカー)を介してDMD標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号283のアミノ酸配列を有するVHおよび配列番号284のアミノ酸配列を有するVLを含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、リンカー(例として、Val-citリンカー)を介してDMD標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号285のアミノ酸配列を有するVHおよび配列番号286のアミノ酸配列を有するVLを含む。 30

【0253】

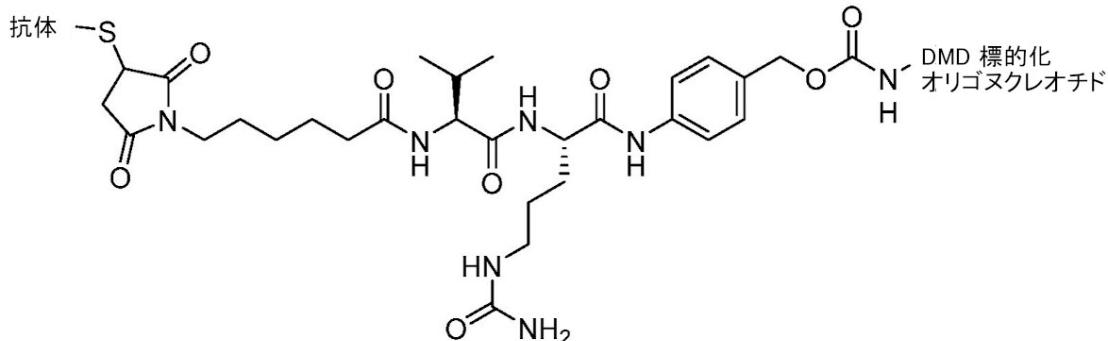
いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、リンカー(例として、Val-citリンカー)を介してDMD標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号289のアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号290のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、リンカー(例として、Val-citリンカー)を介してDMD標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号291のアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号292のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。 40

【0254】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、Val-citリンカーを介してDMD標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、表1.1中に示されるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3と同じCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3;ならびに表1.1中に示されるC 50

DR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3と同じCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、およびここで複合体は、以下の構造を含む:

【化4】



10

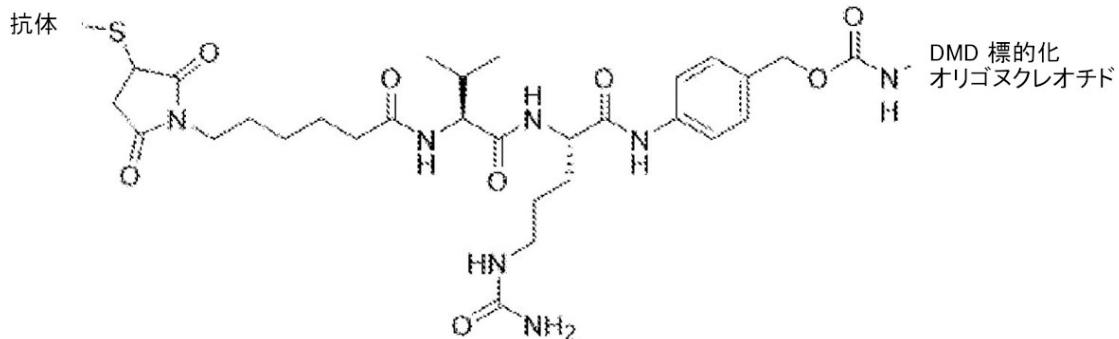
ここでリンカーVal-citリンカーは、DMD標的化オリゴヌクレオチドの5'末端、3'末端、または内部へ連結されており、およびここでVal-citリンカーは、チオール反応性の連結を介して(例として、抗体中のシステインを介して)、抗体(例として、本明細書に記載のとおりの抗体またはそのいずれのバリアント)へ連結されている。

【0255】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、Val-citリンカーを介してDMD標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号283のアミノ酸配列を有するVHおよび配列番号284のアミノ酸配列を有するVLを含み、およびここで複合体は、以下の構造を含む:

20

【化5】



30

ここでリンカーVal-citリンカーは、DMD標的化オリゴヌクレオチドの5'末端、3'末端、または内部へ連結されており、およびここでVal-citリンカーは、チオール反応性の連結を介して(例として、抗体中のシステインを介して)、抗体(例として、本明細書に記載のとおりの抗体またはそのいずれのバリアント)へ連結されている。

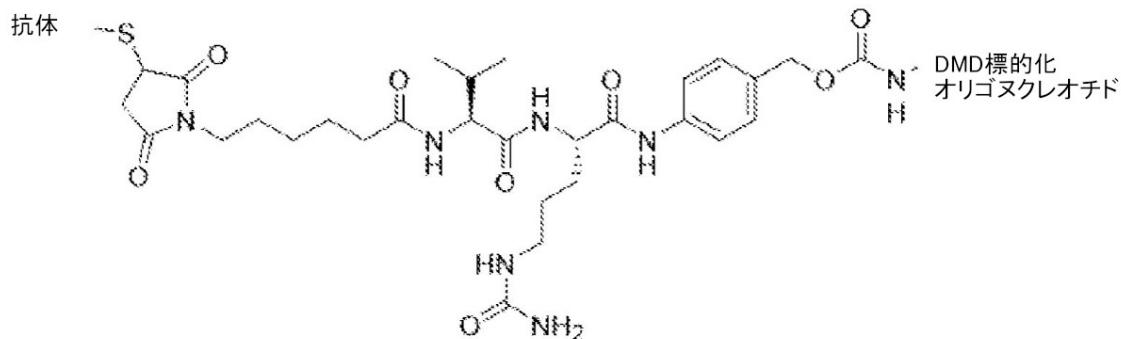
40

【0256】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、Val-citリンカーを介してDMD標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号285のアミノ酸配列を有するVHおよび配列番号286のアミノ酸配列を有するVLを含み、およびここで複合体は、以下の構造を含む:

50

【化6】



10

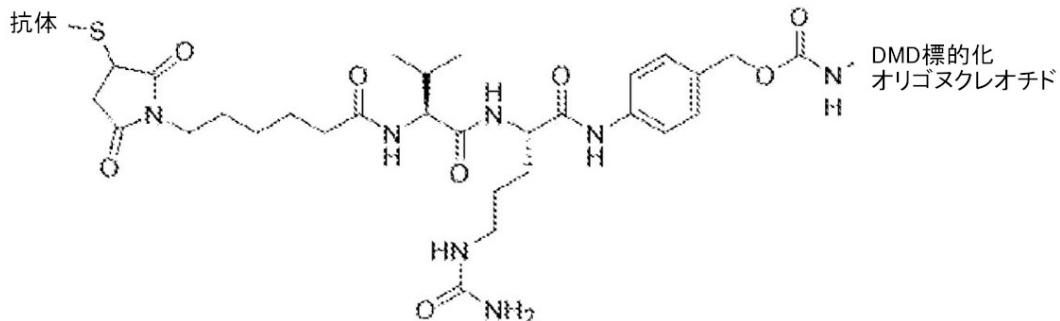
ここでリンカーVal-citリンカーは、DMD標的化オリゴヌクレオチドの5'末端、3'末端、または内部へ連結されており、およびここでVal-citリンカーは、チオール反応性の連結を介して(例として、抗体中のシステインを介して)、抗体(例として、本明細書に記載のとおりの抗体またはそのいずれのバリアント)へ連結されている。

【0257】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、Val-citリンカーを介してDMD標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号289のアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号290のアミノ酸配列を有する軽鎖を含み、およびここで複合体は、以下の構造を含む:

20

【化7】



30

ここでリンカーVal-citリンカーは、DMD標的化オリゴヌクレオチドの5'末端、3'末端、または内部へ連結されており、およびここでVal-citリンカーは、チオール反応性の連結を介して(例として、抗体中のシステインを介して)、抗体(例として、本明細書に記載のとおりの抗体またはそのいずれのバリアント)へ連結されている。

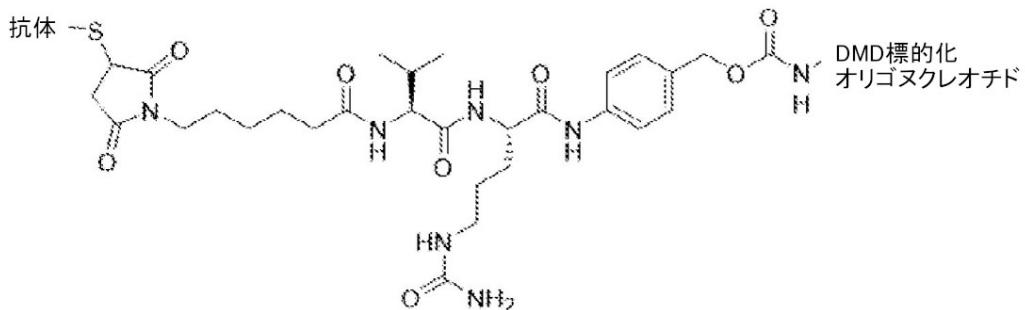
【0258】

いくつかの態様において、本明細書に記載の複合体は、Val-citリンカーを介してDMD標的化オリゴヌクレオチドへ共有結合的に連結された抗トランスフェリン受容体抗体を含むが、ここで抗トランスフェリン受容体抗体は、配列番号291のアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号292のアミノ酸配列を有する軽鎖を含み、およびここで複合体は、以下の構造を含む:

40

50

【化 8】



10

ここでリンカーVal-citリンカーは、DMD標的化オリゴヌクレオチドの5'末端、3'末端、または内部へ連結されており、およびここでVal-citリンカーは、チオール反応性の連結を介して(例として、抗体中のシステインを介して)、抗体(例として、本明細書に記載のとおりの抗体またはそのいずれのバリアント)へ連結されている。

【0259】

III. 製剤

本明細書に提供される複合体は、いずれの好適なやり方でも製剤化されていてよい。一般に、本明細書に提供される複合体は、医薬への使用に好適なやり方で製剤化されている。例えば、複合体は、分解を最小限に抑え、送達および/または取り込みを容易にする製剤を使用して、対象へ送達され得るか、あるいは、製剤中の複合体へ別の有益な特性を提供する。いくつかの態様において、本明細書に提供されるのは、複合体および薬学的に許容し得る担体を含む組成物である。かかる組成物は、対象の標的細胞周囲の環境中または対象の全身のいずれかへ投与されたとき充分量の複合体が標的筋細胞に侵入できるように、好適に製剤化され得る。いくつかの態様において、複合体は、リン酸緩衝生理食塩溶液などの緩衝溶液中、リポソーム中、ミセル構造体中、およびカプシド中に製剤化される。

20

【0260】

いくつかの態様において、組成物が、本明細書に提供される複合体の1以上の構成要素(例として、筋標的化剤、リンカー、分子ペイロード、またはこれらのいずれか1つの前駆体分子)を個別に包含していてもよいことは解されるはずである。

30

【0261】

いくつかの態様において、複合体は、水中または水性溶液(例として、pH調整された水)中に製剤化される。いくつかの態様において、複合体は、塩基性緩衝水性溶液(例として、PBS)中に製剤化される。いくつかの態様において、本明細書に開示のとおりの製剤は、賦形剤を含む。いくつかの態様において、賦形剤は、組成物へ、改善された安定性、改善された吸収、改善された可溶性、および/または活性成分の治療増強を付与する。いくつかの態様において、賦形剤は、緩衝剤(例として、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、トリス塩基、もしくは水酸化ナトリウム)、またはビヒクリル(例として、緩衝溶液、ワセリン、ジメチルスルホキシド、または鉱油)である。

40

【0262】

いくつかの態様において、複合体またはその構成要素(例として、オリゴヌクレオチドまたは抗体)は、その貯蔵寿命を延長するため凍結乾燥され、次いで使用(例として、対象への投与)前に溶液にさせられる。結果的に、本明細書に記載の複合体またはその構成要素を含む組成物中の賦形剤は、凍結保護剤(Iyoprotectant)(例として、マンニトール、ラクトース、ポリエチレン glycole、もしくはポリビニルピロリドン)、または崩壊温度修飾因子(例として、デキストラン、フィコール、もしくはゼラチン)であってもよい。

【0263】

いくつかの態様において、医薬組成物は、その意図された投与ルートに適合するよう製剤化されている。投与ルートの例は、非経口投与、例として、静脈内投与、皮内投与、皮

50

下投与を包含する。典型的には、投与ルートは、静脈内投与または皮下投与である。

【0264】

注射剤への使用に好適な医薬組成物は、滅菌水性溶液(ここで水に可溶性である)または分散溶液、および滅菌注射剤溶液または分散溶液の即時調製のための滅菌粉末を包含する。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等)、および好適なそれらの混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。いくつかの態様において、製剤は、組成物中に等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、および塩化ナトリウムを包含する。滅菌注射剤溶液は、要求量の複合体を、上に列挙された成分の1つまたはそれらの組み合わせとともに、選択された溶媒に組み込むこと、要求に応じ、これに続き濾過滅菌することによって調製され得る。

10

【0265】

いくつかの態様において、組成物は、活性成分(単数または複数)のパーセンテージが組成物全体の重量または体積の約1%と約80%以上との間であってもよいが、少なくとも約0.1%の複合体もしくはその構成要素を含有していてもよい。可溶性、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与ルート、産物の貯蔵寿命などの因子、ならびに他の薬理学的留意事項は、かかる医薬製剤を調製する当業者によって企図されるであろう。そのため様々な投薬量および処置計画が所望されることもある。

【0266】

IV. 使用の方法/処置

20

本明細書に記載のとおりの分子ペイロードへ共有結合した(covalently to)筋標的化剤を含む複合体は、ジストロフィン異常症、例としてデュシェンヌ型筋ジストロフィーを有する対象を処置するのに有効である。いくつかの態様において、複合体は、オリゴヌクレオチド、例として、突然変異したDMDアレルから発現したmRNAのエキソンスキップを容易にするアンチセンスオリゴヌクレオチドである分子ペイロードを含む。

【0267】

いくつかの態様において、対象は、ヒト対象、靈長目の非ヒト動物対象、齧歯類の動物対象、またはいずれか好適な哺乳類の動物対象であってもよい。いくつかの態様において、対象は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたは他のジストロフィン異常症を有してもよい。いくつかの態様において、いくつかの態様において、対象は、突然変異したDMDアレルを有しており、これは、任意に、フレームシフト突然変異を引き起こし、不適切なRNAスプライシング/プロセシングに繋がるDMDエキソンにおける少なくとも1個の突然変異を含んでいてもよい。いくつかの態様において、対象は、重度のジストロフィン異常症の症状、例として、筋萎縮または筋肉喪失を患っている。いくつかの態様において、対象は、クレアチンホスホキナーゼ(CK)の血清濃度の無症候性増大および/またはミオグロビン尿症を伴う筋痙攣を有する。いくつかの態様において、対象は、デュシェンヌ型またはベッカー型筋ジストロフィーまたはDMD関連拡張型心筋症(DCM)などの進行性の筋疾患を有する。いくつかの態様において、対象は、ジストロフィン異常症の症状を患っていない。

30

【0268】

本開示の側面は、本明細書に記載のとおりの有効量の複合体を対象へ投与することを伴う方法を包含する。いくつかの態様において、分子ペイロードへ共有結合した筋標的化剤を含む複合体を含む有効量の医薬組成物は、処置を必要とする対象へ投与され得る。いくつかの態様において、本明細書に記載のとおりの複合体を含む医薬組成物は、静脈内投与を包含してもよい好適なルートによって、例として、ボーラスとして、またはある期間にわたる連続注入によって、投与されてもよい。いくつかの態様において、静脈内投与は、筋肉内の、腹腔内の、脳脊髄内の(intracerebrospinal)、皮下の、関節内の、滑液嚢内の、または髄腔内のルートによって実施されてもよい。いくつかの態様において、医薬組成物は、固体形態、水性形態、または液体形態であってもよい。いくつかの態様において、水性または液体形態は、噴霧されてもよく、または凍結乾燥されてもよい。いくつかの態

40

50

様において、噴霧形態または凍結乾燥形態は、水性または液体溶液で再構成されてもよい。

【0269】

静脈内投与のための組成物は、植物油、ジメチルアセトアミド、ジメチルホルムアミド、乳酸エチル、炭酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、エタノール、およびポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等)などの様々な担体を含有していてもよい。静脈内注射のための水可溶性抗体は点滴法によって投与され得、これによって抗体および薬学的に許容し得る賦形剤を含有する医薬製剤が注入される。薬学的に許容し得る賦形剤は、例えば、5%デキストロース、0.9%生理食塩水、リンガー溶液、または他の好適な賦形剤を含んでいてもよい。筋肉内用調製物、例として、抗体の好適な可溶性の塩形態の滅菌製剤は、注射用水、0.9%生理食塩水、または5%グルコース溶液などの医薬賦形剤に溶解されて投与され得る。

10

【0270】

いくつかの態様において、分子ペイロードへ共有結合した筋標的化剤を含む複合体を含む医薬組成物は、部位特異的または局部的な送達技法を介して投与される。これらの技法の例は、複合体の埋め込み型デポー供給源、局部送達カテーテル、部位特異的担体、直接注射、または直塗り(direct application)を含む。

【0271】

いくつかの態様において、分子ペイロードへ共有結合した筋標的化剤を含む複合体を含む医薬組成物は、治療効果を対象に付与する有効濃度にて投与される。有効量は、当業者によって認識されるとおり、疾患の重症度、処置される対象の特有な特徴、例として、年齢、体調、健康状態、または重量、処置時間、いずれの併用治療の性質、投与ルート、および関連因子に応じて変動する。これらの関連因子は当業者に知られており、わずかな定型的実験法で対処され得る。いくつかの態様において、有効濃度は、患者に安全であるとみなされる最大用量である。いくつかの態様において、有効濃度は、最大限の効き目を提供する、実行可能な最低濃度であろう。

20

【0272】

経験的考察、例として、対象における複合体の半減期は一般に、処置のために使用される医薬組成物の濃度の決定に寄与するであろう。投与頻度は、処置の効き目を最大化するために経験的に決定かつ調整されてもよい。

30

【0273】

一般に、本明細書に記載の複合体のいずれかの投与について、当初の候補投薬量は、上に記載の因子、例として、安全性または効き目に応じて、約1~100mg/kgであってもよく、またはこれより多くてもよい。いくつかの態様において、処置は、一度施されるであろう。いくつかの態様において、処置は、毎日、隔週、毎週、隔月、毎月、または対象へ最大の効き目を提供しつつ安全性へのリスクを最小に抑えるいずれの時間間隔にて、施されるであろう。一般に、効き目ならびに処置および安全性へのリスクは、処置過程を通してずっと監視されることもある。

【0274】

処置の効き目は、いずれか好適な方法を使用して査定されてもよい。いくつかの態様において、処置の効き目は、対象の自己報告による結果、例として可動性、セルフケア、通常の活動、疼痛/不快感、および不安感/抑うつの測定を介して、またはクオリティ・オブ・ライフ指標、例として寿命によって、ジストロフィン異常症に関連する症状、例として筋萎縮または筋力低下の所見の評価によって査定されてもよい。

40

【0275】

いくつかの態様において、本明細書に記載の分子ペイロードへ共有結合した筋標的化剤を含む複合体を含む医薬組成物は、対照(例として、処置に先立つ遺伝子発現のベースラインレベル)と比べて、標的遺伝子の活性または発現を少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%モジュレートするのに充分な有効濃度にて、対象へ投与される。

50

【0276】

いくつかの態様において、本明細書に記載の分子ペイロードへ共有結合した筋標的化剤を含む複合体を含む医薬組成物の対象への単回用量または投与は、少なくとも1～5日間、1～10日間、5～15日間、10～20日間、15～30日間、20～40日間、25～50日間、またはこれより長い期間、標的遺伝子の活性または発現を阻害するのに充分である。いくつかの態様において、本明細書に記載の分子ペイロードへ共有結合した筋標的化剤を含む複合体を含む医薬組成物の対象への単回用量または投与は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12週間、標的遺伝子の活性または発現を阻害するのに充分である。いくつかの態様において、本明細書に記載の分子ペイロードへ共有結合した筋標的化剤を含む複合体を含む医薬組成物の対象への単回用量または投与は、少なくとも1、2、3、4、5、または6ヶ月間、標的遺伝子の活性または発現を阻害するのに充分である。

10

【0277】

いくつかの態様において、医薬組成物は、分子ペイロードへ共有結合した筋標的化剤を含む、1種より多くの複合体を含んでいてもよい。いくつかの態様において、医薬組成物は、対象、例として、ジストロフィン異常症を有するヒト対象の処置のためのいずれか他の好適な治療剤をさらに含んでいてもよい。いくつかの態様において、他の治療剤は、本明細書に記載の複合体の有効性を増強または補完するものであってもよい。いくつかの態様において、他の治療剤は、本明細書に記載の複合体とは異なる症状または疾患を処置するよう機能してもよい。

【0278】

20

例

例1: トランスフェクトされたアンチセンスオリゴヌクレオチドでのHPRTの標的化

ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)を標的にするsiRNAを、不死化細胞株中HPRTの発現レベル低減能についてin vitroで試験した。手短に言えば、He pa1-6細胞に、リポフェクタミン2000で製剤化された対照siRNA(siCTRL; 100nM)またはHPRTを標的にするsiRNA(siHPRT; 100nM)のいずれかをトランスフェクトした。HPRT発現レベルを、トランスフェクションを受けてから48時間評価した。対照実験もまた実施した。対照実験においてビヒクル(リン酸緩衝生理食塩水)を培養中Hepa1-6細胞へ送達して細胞を48時間維持した。図1に示されるとおり、HPRT siRNAはHPRT発現レベルを対照と比較して~90%低減させたことがわかった。

30

表3。siHPRTおよびsiCTRLの配列

【表4】

| | 配列 |
|----------------|--|
| siHPRT センス鎖 | 5'-UcCuAuGaCuGuAgAuUuUaU-(CH ₂) ₆ NH ₂ -3' |
| siHPRT アンチセンス鎖 | 5'-paUaAaAuCuAcAgUcAuAgGasAsu-3' |
| siCTRL センス鎖 | 5'-UgUaAuAaCcAuAuCuAcCuU-(CH ₂) ₆ NH ₂ -3' |
| siCTRL アンチセンス鎖 | 5'-aAgGuAgAuAuGgUuAuUaCasAsa-3' |

* 小文字—2'OMeリボース；大文字—2'フルオロリボース；p—ホスファート連結；s—ホスホロチオアート連結

40

【0279】

例2: 筋標的化複合体でのHPRTの標的化

切断不能なN-ガンマ-マレイミドブチリル-オキシスクシンイミドエステル(GMBS)リンカーを介して、抗トランスフェリン受容体抗体であるDTX-A-002へ共有結合的に連結された、例1(siHPRT)に使用されたHPRT siRNAを含む筋標的化複合体を生成した。

【0280】

手短に言えば、GMBSリンカーを乾燥DMSOに溶解し、水性条件下のアミド結合形成を通してsiHPRTのセンス鎖の3'末端へカップリングした。反応の完了をカイザー(Kaiser)試験によって検証した。過剰なリンカーおよび有機溶媒をゲル浸透クロマトグラフィーに

50

よって除去した。次いで、精製されたsiHPRTのマレイミド官能化センス鎖を、マイケル付加反応を使用してDTX-A-002抗体へカップリングした。

【0281】

次いで、抗体カップリング反応の産物を疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC-HPLC)へ供した。DTX-A-002抗体へ共有結合的に付着された1個または2個のsiHPRT分子を含む抗TfR-siHPRT複合体を精製した。濃度測定によって、精製された複合体の試料は1.46の平均siHPRT抗体比を有することが確認された。SDS-PAGE分析によって、精製された複合体の試料の>90%は1個または2個いずれかのsiHPRT分子へ連結されたDTX-A-002を含むことが実証された。

【0282】

上に記載されたのと同じ方法を使用して、GMBSリンカーを介してIgG2a(Fab)抗体(DTX-A-003)へ共有結合的に連結された、例1(siHPRT)に使用されたHPRT siRNAを含む対照IgG2a-siHPRT複合体を生成した。濃度測定によってDTX-C-001は1.46の平均siHPRT抗体比を有することが確認され、SDS-PAGEによって、精製された対照複合体の試料の>90%は1個または2個いずれかのsiHPRT分子へ連結されたDTX-A-003を含むことが実証された。

10

【0283】

次いで抗TfR-siHPRT複合体を、細胞の内在化およびin celluloでのHPRTの阻害について試験した。相対的に高発現レベルのトランスフェリン受容体を有するHepa1-6細胞を、ビヒクル(リン酸緩衝生理食塩水)、IgG2a-siHPRT(100nM)、抗TfR-siCTRL(100nM)、または抗TfR-siHPRT(100nM)の存在下72時間インキュベートした。72時間のインキュベーション後に細胞を単離し、HPRTの発現レベルについてアッセイした(図2)。抗TfR-siHPRTで処置された細胞は、HPRT発現がビヒクル対照で処置された細胞と比べて~50%低減されたことが実証された。その一方で、IgG2a-siHPRTまたは抗TfR-siCTRLのいずれかで処置された細胞は、ビヒクル対照(HPRT発現がまったく低減されない)に匹敵するHPRT発現レベルを有していた。これらのデータは、抗TfR-siHPRTの抗トランスフェリン受容体抗体が複合体の細胞の内在化を可能にし、それによってsiHPRTがHPRTの発現を阻害できることを示唆している。

20

【0284】

例3:筋標的化複合体でのマウス筋組織中HPRTの標的化

30

例2に記載の筋標的化複合体、抗TfR-siHPRTを、マウス組織中HPRTの阻害について試験した。C57BL/6野生型マウスに、単回用量のビヒクル対照(リン酸緩衝生理食塩水);siHPRT(2mg/kgのRNA);IgG2a-siHPRT(2mg/kgのRNA、抗体複合体9mg/kgに相当する);または抗TfR-siHPRT(2mg/kgのRNA、抗体複合体9mg/kgに相当する)を静脈内注射した。各実験条件を4匹の個々のC57BL/6野生型マウスにおいて再現した。注射から3日後にマウスを安楽死させ、細分して単離された組織型とした。続いて個々の組織試料をHPRTの発現レベルについてアッセイした(図3A~3Bおよび4A~4E)。

【0285】

抗TfR-siHPRT複合体で処置されたマウスは、siHPRT対照で処置されたマウスと比べて、腓腹筋(31%低減;p < 0.05)および心臓(30%低減;p < 0.05)においてHPRT発現が低減されたことを実証した(図3A~3B)。その一方で、IgG2a-siHPRT複合体で処置されたマウスは、アッセイされたすべての筋組織型について、siHPRT対照(HPRT発現がほとんどまたはまったく低減されない)に匹敵するHPRT発現レベルを有していた。

40

【0286】

抗TfR-siHPRT複合体で処置されたマウスは、脳、肝臓、肺、腎臓、および脾臓組織などの非筋組織においてHPRT発現がまったく変化しないことを実証した(図4A~4E)。これらのデータは、抗TfR-siHPRT複合体の抗トランスフェリン受容体抗体がin vivoマウスマルモデルで複合体の筋肉特異的組織中への細胞内在化を可能にし、それによってsiHPRTがHPRTの発現を阻害できることを示唆している。これらのデータは、本開示の抗TfR-オリゴヌクレオチド複合体が、筋組織を特異的に標的にすることが可能であることをさらに実証す

50

る。

【0287】

例4:筋標的化複合体でのDMDの標的化

カテプシン切断可能なリンカーを介して抗トランスフェリン受容体抗体であるDTX-A-002(RI7 217(Fab))へ共有結合的に連結された、エキソンスキッピングのための、DMD(DMD ASO)の突然変異アレルを標的にするアンチセンスオリゴヌクレオチド、例として表2に開示される配列を有するオリゴヌクレオチドを含む筋標的化複合体を生成した。

【0288】

手短に言えば、マレイミドカプロイル-L-バリン-L-シトルリン-p-アミノベンジルアルコールp-ニトロフェニルカーボネート(MC-Val-Cit-PABC-PNP)リンカー分子を、アミドカップリング反応を使用してNH₂-C₆-DMD ASOへカップリングする。過剰なリンカーおよび有機溶媒をゲル浸透クロマトグラフィーによって除去する。次いで、精製されたVal-Cit-リンカー-DMD ASOを、チオール反応性の高い抗トランスフェリン受容体抗体(DTX-A-002)へカップリングする。

10

【0289】

次いで抗体カップリング反応の産物を疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC-HPLC)へ供することで筋標的化複合体を精製する。精製された複合体の濃度測定およびSDS-PAGE分析は夫々、ASO対抗体の平均比率および総純度を決定させる。

【0290】

上に記載されるのと同じ方法を使用して、Val-Citリンカーを介してIgG2a(Fab)抗体へ共有結合的に連結されたDMD ASOを含む対照複合体を生成する。次いで、DMD ASOへ共有結合的に連結されたDTX-A-002を含む精製された筋標的化複合体を、細胞の内在化およびDMDエキソンスキッピングのモジュレートについて試験する。相対的に高発現レベルのトランスフェリン受容体を有する、疾患に関係のある筋細胞を、ビヒクル対照(生理食塩水)、筋標的化複合体(100nM)、または対照複合体(100nM)の存在下72時間インキュベートする。72時間のインキュベーション後に細胞を単離し、DMDの発現レベルについてアッセイする。

20

【0291】

等価物および専門用語

本明細書に好適に説明して記載される本開示は、本明細書に具体的に開示されていない、いずれの要素(单数もしくは複数)、限界(单数もしくは複数)が存在しない中でも実践され得る。よって、例えば、本明細書の各場合において、用語「～を含む(comprising)」、「本質的に～からなる(consisting essentially of)」、および「～からなる」のいずれかは、他の2つの用語のいずれかに置き換えられていてもよい。採用された用語および表現は、記載する用語として使用されるが、限定する用語としては使用されず、かかる用語および表現を、示され記載される特色またはそれらの一部のいずれの等価物を除くよう使用する意図はないが、本開示の範囲内で様々な修飾が実行可能であることは認識される。よって、本開示は好ましい態様によって具体的に開示されているが、本明細書に開示された任意の特色、概念の修飾およびバリエーションが当業者によって再分類されてもよいこと、およびかかる修飾およびバリエーションが本開示の範囲内にあるとみなされることは、理解されるはずである。

30

【0292】

加えて、本開示の特色または側面が、マーカッシュ群または他の代替群の観点から記載される場合、当業者は、それによって本開示がまた、マーカッシュ群または他の群のいずれか個々のメンバーまたは下位群のメンバーの観点からも記載されていることを認識するであろう。

40

【0293】

いくつかの態様において、配列表に提示される配列が、オリゴヌクレオチドまたは他の核酸の構造を記載する際に触れられてもよいことは解されるはずである。かかる態様において、実際のオリゴヌクレオチドまたは他の核酸は、特定の配列と比較して、特定の配列

50

と本質的に同じかまたは同様の相補的特性を保持しながら、1以上の代替ヌクレオチド(例として、DNAヌクレオチドのRNA相当物もしくはRNAヌクレオチドのDNA相当物)、および/または1以上の修飾ヌクレオチド、および/または1個以上の修飾ヌクレオチド間連結、および/または1以上の他の修飾を有していてもよい。

【0294】

用語「a」および「an」および「the」ならびに同様の指示語(referent)の使用は、本発明を記載するという文脈において(とくに以下のクレームの文脈において)、本明細書に別様に指示されていない限り、または文脈によって明確に矛盾しない限り、単数形と複数形との両方をカバーするよう解釈されるべきである。用語「～を含む」、「～を有する(having)」、「～を包含する(including)」、および「～を含有する(containing)」は、別様に注記されていない限り、オープンエンドな(open-ended)用語(すなわち、「～を包含するが、これらに限定されない」を意味する)として解釈されるべきである。本明細書の値の範囲の列挙は、本明細書に別様に指示されていない限り、範囲内に収まる別々の各値を個々に指す簡単な方法として役立つことをただ単に意図するものであって、別々の各値は本明細書に個々に列挙された場合であっても本明細書中へ組み込まれたものである。本明細書に記載のすべての方法は、本明細書に別様に指示されていない限り、または文脈によって明確に矛盾しない限り、いずれか好適な順序で実施され得る。本明細書に提供されるありとあらゆる例または例示の言葉(例として、「～などの(such as)」)の使用は、ただ単に本発明をより良く説明することを意図し、別様に主張されていない限り、本発明の範囲に制限を課すことはない。本明細書中の言葉は、主張されていないどの要素も、本発明の実践に対し不可欠なものとして指示示さないとして解釈されるはずである。10
20

【0295】

本発明の態様は本明細書に記載されている。これらの態様のバリエーションは、上記の記載を読んだ上で当業者に明らかとなることもある。

【0296】

本発明者らは、当業者に、かかるバリエーションを必要に応じて採用することを期待し、本発明者らは、本発明が、本明細書に具体的に記載されるものと別様に実施されることも意図する。結果的に、本発明は、適用法によって許容されるとおりの、本明細書に添付のクレームに記載の主題のすべての修飾および等価物を包含する。その上、上記要素のいずれかの組み合わせは、それらの実行可能なすべてのバリエーションにおいて、本明細書に別様に指示されていない限り、または文脈によって明確に矛盾しない限り、本発明によって網羅される。当業者は、わずかな定型的実験法を使用して、本明細書に記載の本発明の特定の態様との多くの等価物を認識するか、またはこれを確かめることができるであろう。かかる等価物は、以下のクレームによって網羅されることが意図される。30

【図面】

【図 1】

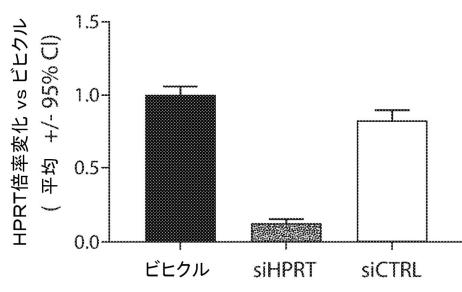


図 1

【図 2】

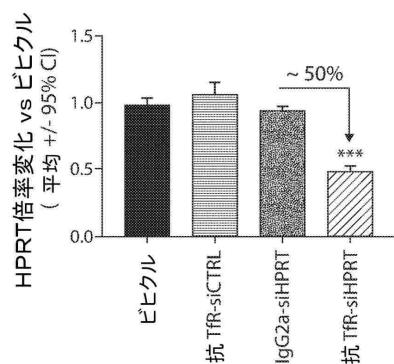


図 2

【図 3】

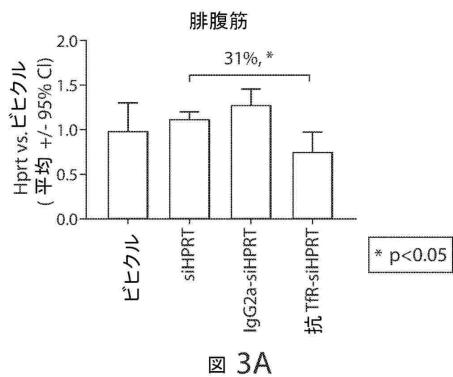


図 3A

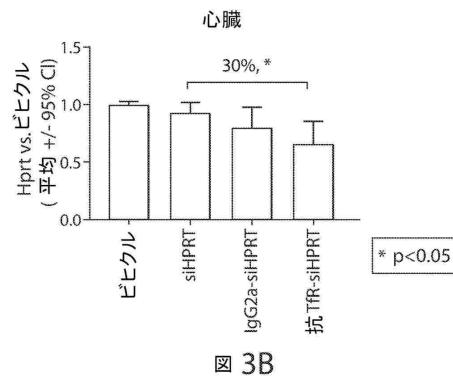


図 3B

【図 4 A - B】

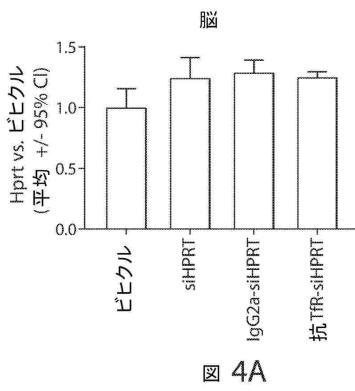


図 4A

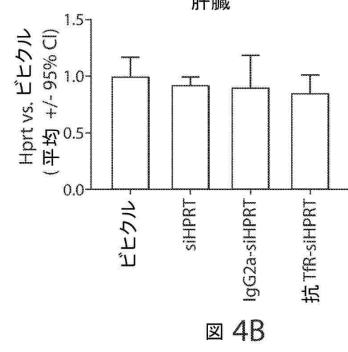


図 4B

10

20

30

40

50

【図 4 C - D】

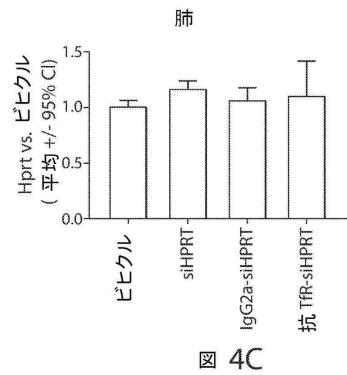


図 4C

【図 4 E】

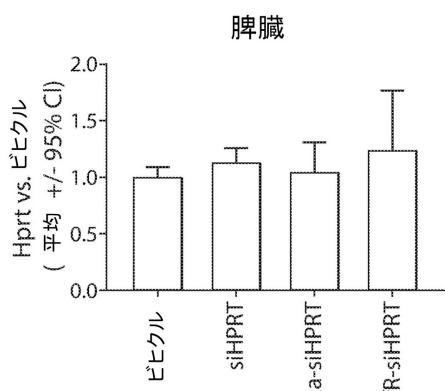


図 4E

10

20

30

40

50

【配列表】

0007611825000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

| | | | |
|-------------------------|-----|----------------|---|
| A 61 K 39/395 (2006.01) | F I | A 61 K 39/395 | N |
| A 61 K 31/7088(2006.01) | | A 61 K 31/7088 | |
| A 61 K 48/00 (2006.01) | | A 61 K 48/00 | |

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139、ケンブリッジ、テクノロジー スクエア 400, 10ス フロアー

(72)発明者

カタナニ, モハメド, ティー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139、ケンブリッジ、テクノロジー スクエア 400, 10ス フロアー

(72)発明者

ウィーデン, テイモシー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02139、ケンブリッジ、テクノロジー スクエア 400, 10ス フロアー

審査官 大久保 智之

(56)参考文献

国際公開第2018/129384 (WO, A1)
国際公開第2017/221883 (WO, A1)
Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle , 2017年12月08日 , Vol.8 , pp.1065-1066, 8-05

Bol Med Hosp Infant Mex , 2016年12月13日 , Vol.73, No.6 , pp.372-379

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00 - 90
C07K 16/00 - 19/00
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)