

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-506709

(P2024-506709A)

(43)公表日 令和6年2月14日(2024.2.14)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113	1 3 0 Z	4 C 0 7 6
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	C 1 2 N	15/113	Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	4 C 0 8 6
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	31/712(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全58頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-549575(P2023-549575)	(71)出願人	516056971
(86)(22)出願日	令和4年2月17日(2022.2.17)		キュー - ステート バイオサイエンス
(85)翻訳文提出日	令和5年10月4日(2023.10.4)		ズ, インコーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2022/016842		Q - State Bioscience
(87)国際公開番号	WO2022/178160		s, Inc.
(87)国際公開日	令和4年8月25日(2022.8.25)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(31)優先権主張番号	63/150,188		139, ケンブリッジ, シドニー ス
(32)優先日	令和3年2月17日(2021.2.17)		トリート 179
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		179 Sidney Street,
			Cambridge, Massach
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100078282
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(弁理士 山本 秀策
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A	(74)代理人	100113413
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 U B E 3 A アンチセンス治療剤

(57)【要約】

本発明は、U B E 3 A の過剰発現をノックダウンし Dup 1 5 q 症候群と関連する状態を処置するために有用な組成物を提供し、アンチセンスオリゴヌクレオチド、U B E 3 A 転写物に相補的であり、かつインピボでハイブリダイズする短いオリゴヌクレオチド(ASO)を含み得、タンパク質へのU B E 3 A mRNA の成功裡の翻訳を防止または阻害する。ASOは、RNAウイングが隣接した中心的DNA部分を含む抗U B E 3 A ギャップマー - オリゴを含み、ギャップマーがU B E 3 A pre - mRNA または mRNA にハイブリダイズし、二重鎖ハイブリッドがRNaseHを動員し、U B E 3 A pre - mRNA または mRNA を切断または消化し、U B E 3 A タンパク質の発現を防止する。従って、ASOは、U B E 3 A タンパク質の発現を防止し、本開示のASOを含む組成物での処置はU B E 3 A の過剰発現をノックダウンするために有効であり得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ユビキチンリガーゼタンパク質の発現を阻害する合成アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を含む組成物。

【請求項 2】

前記タンパク質は、ユビキチンタンパク質リガーゼ E3A である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記 ASO は、UBE3A 遺伝子に由来する転写物中の相補的標的にハイブリダイズする、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

前記 ASO における塩基の配列は、配列番号 1 ~ 219 のうちの 1 つと少なくとも 80 % 同一性を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 ASO における塩基の配列は、配列番号 1 ~ 219 のうちの 1 つと少なくとも 90 % 同一であり、前記オリゴヌクレオチドは、UBE3A pre-mRNA または mRNA にハイブリダイズし得、RNase H 媒介性切断を誘導し得る、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記オリゴヌクレオチドは、少なくとも 10 個の DNA 塩基の中心的領域に隣接する 2 つのウイングを含む、請求項 1 に記載の組成物。

20

【請求項 7】

前記 ASO の少なくとも 1 つのウイングは、改変された RNA 塩基を含む、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

各改変された RNA 塩基は、2'-O-メトキシエチル RNA および 2'-O-メチル RNA からなる群より選択される、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記 ASO は、少なくとも約 15 個の塩基を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記 ASO は、約 15 ~ 約 25 個の間の塩基を含む、請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 11】

前記 ASO は、複数のホスホロチオエート結合を含む骨格を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記 ASO は、スクリーニングされてヒトにおけるいずれの非標的転写物に対しても閾値マッチを満たさないように決定された塩基配列を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 ASO は、非ヒト霊長類ゲノムにおける相同なセグメントに対する 0 個のミスマッチおよび齧歯類ゲノムにおける相同なセグメントにおいて約 5 個以下のミスマッチを有する塩基配列を有する、請求項 1 に記載の組成物。

40

【請求項 14】

前記組成物は、配列番号 1 ~ 40、146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213、および 214 のうちの 1 つと少なくとも 80 % 同一の塩基配列を各々有する複数の ASO を含み、前記 ASO の各々は、RNA ウイングが隣接した中心的 DNA セグメントを含むギャップマー構造を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 ~ 219 のうちの 1 つと少なくとも 90 % マッチを有し、ホスホロチオエート連結によってのみ連結される塩基を有する塩基配列を有し、

50

前記オリゴヌクレオチドはさらに、5'ウイングおよび3'ウイングが隣接した中心的な12個のDNA塩基を含み、前記5'ウイングおよび前記3'ウイングは各々、4個連続した2'改変されたRNA塩基を含む、請求項2に記載の組成物。

【請求項16】

前記オリゴヌクレオチドは、配列番号1~40、146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213、および214のうちの一つとマッチする塩基配列を有し、少なくとも塩基間連結の大部分は、ホスホロチオエート連結を含み、前記オリゴヌクレオチドは、5'ウイングおよび3'ウイングが隣接した中心的な12個のDNA塩基をさらに含み、前記5'ウイングおよび前記3'ウイングは各々、4個連続した2'-MOE RNA塩基を含む、請求項2に記載の組成物。

10

【請求項17】

前記ASOは、炭水化物、細胞表面レセプターリガンド、薬物物質、ホルモン、親油性基質、ポリマー、タンパク質、ペプチド、毒素、ビタミン、ウイルスタンパク質、およびこれらの組み合わせからなる群より選択されるメンバーに結合体化される、請求項1に記載の組成物。

【請求項18】

Dup15q症候群を有する被験体に、請求項1~16のいずれか1項に記載の組成物を投与して、それによって、UBE3A遺伝子の発現をノックダウンする工程を包含する方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

技術分野

本開示は、神経学的障害のための処置に関する。

【0002】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットにおいてEFS-Webを介して提出され、その全体において本明細書に参考として援用される配列表を含む。そのASCIIフォーマットにした配列表は、2022年2月17日に作成し、名称は「QSTA-036-01WO-Sequence-Listing」であり、サイズは44048バイトである。

30

【背景技術】

【0003】

背景

ユビキチンリガーゼタンパク質（例えば、E3リガーゼE6関連タンパク質（E6AP（UBE3Aとしても公知））は、神経学的障害および神経発達障害に関係している。例えば、E6APは、UBE3A遺伝子によってコードされ、UBE3A遺伝子の発現は、遺伝子刷り込みを介して調節される。E6AP発現の喪失は、発話および運動発達の障害、ならびに発作（seizure）によって代表的には特徴づけられる、アンジェルマン症候群の発生をもたらす。逆に、UBE3Aのコピー数のバリエーション（CNVs）は、E6APの過剰発現および結果的に自閉スペクトラム症（ASD）の発生に関連付けられ得る。

40

【0004】

いくつかの臨床症状において、第15染色体の一部は、重複している。このDup15q症候群は、2つの形態のうち的一方、余分な二動原体同腕第15染色体または第15染色体における中間部重複において最も一般的に起こる。Dup15q症候群は、筋緊張低下、ならびに粗大運動および微細運動の遅れ、知的障害、自閉スペクトラム症（ASD）、ならびにてんかん（点頭てんかんを含む）によって特徴づけられる。メチル化された母系15q重複のコピー数の増大がタンパク質発現の増大をもたらし、UBE3Aの過剰発現がDup15qにおける重篤度に関連付けられると考えられる。ここで母系アレルの数の増大は、Dup15q病理の主要駆動因子であると考えられる。

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

要旨

本発明は、UBE3A遺伝子のCNVと関連する障害を処置するための組成物を提供する。具体的には、本開示は、Dup15q症候群に罹患した被験体において生じる発作、筋緊張低下、運動の遅れ、知的障害、発作を示す障害、および自閉スペクトラム症(ASD)を処置するためにUBE3Aの過剰発現をロックダウンするために有用であるアンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。本発明の組成物は、UBE3A転写物に相補的であり、かつインピボでハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。上記ASOは、タンパク質へのUBE3A mRNAの翻訳を防止する。具体的には、好ましい実施形態は、RNAウイングが隣接した中心的DNA部分を含む抗UBE3Aギャップマー-オリゴを含む。上記ギャップマーがUBE3A pre-mRNAまたはmRNAにハイブリダイズする場合、そのハイブリッド二重鎖は、RNaseHを動員し、これは、上記UBE3A pre-mRNAまたはmRNAを切断または消化し、UBE3Aタンパク質の発現を防止する。上記ASOは、UBE3Aタンパク質の発現を防止することから、本開示のASOを含む組成物での処置は、UBE3Aの過剰発現をロックダウンするために有効であり得る。よって、本開示の組成物は、Dup15q症候群およびその症状を書治すために有用である。

10

【0006】

本開示のオリゴヌクレオチドは、ユビキチンリガーゼタンパク質の合成で使用されるRNA中のある特定の標的に結合するように設計される。そのオリゴヌクレオチドの結合は、タンパク質合成を防止し、ユビキチンリガーゼの発現をダウンレギュレートする。具体的には、本発明のオリゴヌクレオチドは、ユビキチンタンパク質リガーゼE3A pre-mRNAまたはmRNA上で特定された標的のうちの1つに実質的にまたは完全に相補的な配列を有する。すなわち、上記オリゴヌクレオチドは、その特定された標的に対するアンチセンスである。上記アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)が、その標的RNAにハイブリダイズする場合、それは、2本鎖のASO:RNA二重鎖を形成し、この二重鎖は、その2本鎖二重鎖の一部を分解する酵素(RNaseH)を動員する。そのASO:RNA二重鎖を分解すると、E6AP mRNAの細胞が枯渇し、これは、その細胞によって合成されるE6APの量を減少させる。

20

30

【0007】

従って、E6AP pre-mRNAまたはmRNA中の特定された標的に対するアンチセンスであるオリゴヌクレオチドを含む組成物が患者に投与される場合、その組成物は、そうでなければ、UBE3Aのコピー数バリエーションまたはDup15q症候群として公知の第15染色体q11.2-q13.1重複症候群から生じ得るE6APの発現を減少させる。

【0008】

ある特定の局面において、本開示は、Dup15qを処置するための組成物を提供する。このような組成物は、ユビキチンリガーゼタンパク質の発現を阻害する合成アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を含む。好ましくは、上記タンパク質は、ユビキチンタンパク質リガーゼE3Aである。上記ASOは、UBE3A遺伝子の転写物中の相補的な領域にハイブリダイズする。上記ASOにおける塩基の配列は、配列番号1~219のうちの1つ、好ましくは配列番号1~40のうちの1つ、ならびにより好ましくは配列番号146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213、および214のうちの1つと少なくとも80%同一性を有し得る。いくつかの実施形態において、上記ASOにおける塩基の配列は、配列番号1~219、1~40、または146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213、および214のうちの1つと少なくとも90%、95%、または100%同一であり、上記オリゴヌクレオチドは、UBE3A

40

50

pre-mRNAまたはmRNAにハイブリダイズし得、かつそのRNase切断を誘導し得る。

【0009】

いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、少なくとも10個のDNA塩基、好ましくは約12個の塩基の中心的領域に隣接する2つのRNAウイングを含む。上記ASOの2つのウイングのうちの少なくとも一方は、改変されたRNA塩基を含む。各改変されたRNA塩基は、2'-O-メトキシエチルRNAおよび2'-O-メチルRNAからなる群より選択され得る。上記ASOは、少なくとも約20個の塩基、好ましくは約15~約25個の間の塩基を含み得る。ある特定の実施形態において、上記ASOは、複数のホスホロチオエート結合を含む骨格を有する。本明細書で提供されるASOは、100~12個の塩基の中心的領域および4~5個の塩基の隣接する領域を含む。

【0010】

好ましいASOは、スクリーニングされてヒトにおいていかなる非標的転写物に関しても閾値マッチを満たさないように決定された塩基配列を有する。必要に応じて、上記ASOは、非ヒト霊長類ゲノムにおける相同なセグメントと0個のミスマッチおよび齧歯類ゲノムにおける相同なセグメント中で約5個以下のミスマッチを有する塩基配列を有する。

【0011】

ある特定の実施形態において、本発明の組成物は、複数のASOを含み、各々は、配列番号1~219のうちの1つと少なくとも約80%同一の塩基配列を有し、ここで上記ASOの各々は、RNAウイングが隣接した中心的DNAセグメントを含むギャップマー構造を有する。ある特定の好ましい実施形態において、上記組成物は、複数のASOを含み、各々は、配列番号1~40のうちの1つ、ならびにより好ましくは配列番号146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213、および214のうちの1つと少なくとも約80%同一の塩基配列を有し、ここで上記ASOの各々は、RNAウイングが隣接した中心的DNAセグメントを含むギャップマー構造を有する。各オリゴヌクレオチドは、配列番号1~219（好ましくは1~40ならびにより好ましくは146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213、および214）のうちの1つと少なくとも約90%（または95%、もしくは100%）マッチを有し、ホスホロチオエート連結によってのみ連結された塩基を有する塩基配列を有し得、上記オリゴヌクレオチドはさらに、5'ウイングおよび3'ウイングが隣接した中心的な10個のDNA塩基を含み、上記5'ウイングおよび上記3'ウイングは各々、5個連続した2'改変されたRNA塩基を含む。

【0012】

いくつかの実施形態において、各オリゴヌクレオチドは、配列番号1~219のうちの1つとマッチする塩基配列を有し、少なくとも塩基間連結の大部分は、ホスホロチオエート連結を含み、上記オリゴヌクレオチドはさらに、5'ウイングおよび3'ウイングが隣接した中心的な10個のDNA塩基を含み、上記5'ウイングおよび上記3'ウイングは各々、5個連続した2'-O-メトキシエチル(2'-MOE) 2'-MOE RNA塩基を含む。好ましい実施形態において、各オリゴヌクレオチドは、配列番号1~40のうちの1つとマッチする塩基配列を有し、少なくとも塩基間連結の大部分は、ホスホロチオエート連結を含み、上記オリゴヌクレオチドはさらに、5'ウイングおよび3'ウイングが隣接した中心的な10個のDNA塩基を含み、上記5'ウイングおよび上記3'ウイングは各々、5個連続した2' MOE RNA塩基を含む。より好ましい実施形態において、各オリゴヌクレオチドは、配列番号146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213、および214のうちの1つとマッチする塩基配列を有し、少なくとも塩基間連結の大部分は、ホスホロチオエート連結を含み、上記オリゴヌクレオチドはさらに、5'ウイングおよび3'ウイングが隣接した中心的な10個のDNA塩基を含み、上記5'ウイングおよび上記3'ウイングは各々、5個連続した2' MOE RNA塩基を含む。

【 0 0 1 3 】

関連する局面において、本発明は、Dup15q症候群を処置するための方法であって、上記方法は、本開示の組成物のうちの1つをそれを必要とする被験体に、例えば、UBE3Aの過剰発現をダウンレギュレートするために送達する工程を包含する方法を提供する。本開示の治療用オリゴヌクレオチドは、改変されたRNAウイングが隣接した中心的DNAセグメントを含むギャップマー構造を有し得る。このような治療用オリゴヌクレオチドは、DNA塩基の中心的領域（例えば、約10～14個のDNA塩基の、例えば、約12個のDNA塩基の中心的領域）に隣接する2つのウイングを含み得る。好ましくは上記オリゴヌクレオチドの少なくとも一方の末端は、改変されたRNA塩基、例えば、2'-O-メトキシエチルRNA（「2'-MOE」）および/もしくは2'-O-メチルRNA（「2'-OMe」）の任意の数または任意の組み合わせを含む。さらに、本発明の組成物は、エキソン-エキソン接合部を標的化し、核pre-mRNAに対して細胞質mRNAを区別して標的とするように設計され得る。従って、本発明のASOは、スプライシング、上記組成物への特異性および多機能性の付加前、またはその後、RNAと相互作用するように設計され得る。

【 0 0 1 4 】

種々の実施形態において、治療用オリゴヌクレオチドは、任意の適切な経路（例えば、静脈内または髄腔内を含む）を介する送達のために製剤化された溶液またはキャリア中に提供され得る。上記オリゴヌクレオチドは、任意の適切な長さ（例えば、少なくとも約18個の塩基、および好ましくは約15～約25個の間の塩基）のものであり得る。上記オリゴヌクレオチドは、その骨格中にホスホロチオエート結合を有し得る。好ましい実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、ヒトにおいて、スクリーニングされて任意の長さに関して閾値マッチを満たさないように決定された塩基配列、非コードRNAまたは他のオフターゲット配列もしくは転写物を有する。上記オリゴヌクレオチドは、非ヒト霊長類ゲノムにおける相同なセグメントに対する0個のミスマッチおよび齧歯類ゲノムにおける相同なセグメントにおいて約5個以下のミスマッチを有する塩基配列を有し得る。

【 0 0 1 5 】

上記組成物がインビトロで細胞へと送達される場合、上記細胞は、UBE3Aの用量依存性ノックダウンを示す。上記オリゴヌクレオチドは、配列番号1～219のうちの1つと少なくとも約90%マッチを有し、少なくともいくつかのホスホロチオエート連結を有する塩基配列を有するギャップマーであり得る。上記連結は、全てホスホロチオエートまたはホスホロチオエートおよびホスホジエステル結合の混合であり得る。上記オリゴヌクレオチドはさらに、5'ウイングおよび3'ウイングが隣接した中心的な12個のDNA塩基を有し得、上記5'ウイングおよび上記3'ウイングは各々、4個連続した2'改変されたRNA塩基を含む。好ましくは、上記オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート連結によって連結された塩基、ならびに5'ウイングおよび3'ウイングが隣接した中心的DNA塩基を有する構造を有する、配列番号1～219のうちの1つとマッチする塩基配列を有する。上記ウイングにおけるRNA塩基および中心的セグメントにおけるDNA塩基の数は、5-10-5もしくは4-12-4、または類似の適切なパターンであり得る。上記5'ウイングおよび上記3'ウイングは各々、いくつかの2'-MOE RNA塩基を含み得る。例えば、上記オリゴヌクレオチドは、各ウイングにおいて4個連続した2'-MOE RNA塩基と、中心的な12個のDNA塩基とを有し得（「4-12-4」構造）、中心的DNAセグメント全体にわたってホスホロチオエート連結を、ならびに上記ウイングにおいてホスホロチオエート結合およびホスホジエステル結合の混合を有する。あるいは、上記オリゴヌクレオチドは、各ウイングにおいて5個連続した2'-MOE RNA塩基と、中心的な10個のDNA塩基とを有し得（「5-10-5」構造）、上記中心的DNAセグメント全体にわたってホスホロチオエート連結を、ならびに上記ウイングにおいてホスホロチオエート結合およびホスホジエステル結合の混合を有する。上記5'および3'ウイングはまた、同じASOにおいて異なる長さのものである場合もある（例えば、「4-11-5」または「5-11-4」構造）。

【0016】

組み合わせ実施形態において、本発明は、複数の別個の治療用ギャップマーの複数のコピー（各々、上記の説明に従う）を適切な製剤またはキャリア中に含む組成物を提供する。

【0017】

本開示の局面は、Dup15q症候群を処置するための医薬の製造のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）の使用に関する。このような実施形態において、上記ASOは、配列番号1～219のうちの1つと少なくとも約75%同一性を、およびより好ましくは少なくとも約90%同一性を、例えば、95%もしくは100%同一性を有する。好ましい実施形態は、約15～25個の間の塩基の長さである、好ましくは約18～22個の間、または約19～21個の間（両端を含む）であるASOを使用する。一般に、「ASO」への言及は、実質的に同一な分子の多くのコピーを含む。よって、「ASO」は、任意の数、例えば、その示されたASOの数十万の、または数百万のコピーであり得る。好ましい実施形態において、上記ASOは、20個の塩基の長さであり、配列番号1～219のうちの1つの配列を有し、Dup15q症候群の処置のための医薬の製造において使用される。上記ASOは、任意の適切な形式（例えば、チューブ中で凍結乾燥されるか、またはチューブ（例えば、微量遠心チューブもしくは試験管）中で溶液の状態）において提供され得る。上記使用の好ましい実施形態は、UBE3A遺伝子の転写物を標的とする。1またはこれより多くの（例えば、2、3、4、もしくは5、またはこれより多い）ASOは、医薬の製造において使用され得る。上記1またはこれより多くのASOは、UBE3A pre-mRNAまたはmRNAにおける標的にハイブリダイズし得る。ある特定の実施形態において、上記ASOにおける塩基の配列は、配列番号1～219のうちの1つと少なくとも約90%同一である。他の実施形態において、上記ASOは、RNAウイングが隣接した中心的DNAセグメントを有するギャップマー構造（例えば、12個のDNA塩基の中心的領域であって、その中心的な領域の両側に4個の改変されたRNA塩基を有するもの）を有し得る。各改変されたRNA塩基は、2'-MOEであり得る。好ましくは、上記ASOの骨格は、複数のホスホロチオエート結合を有する。よって、上記ASOは、最初は、注射またはポンプによる導入に適した製剤へと混合するために適した形態にあり得る。例えば、上記ASO（1つのASOの数千または数百万またはより多くのコピー）は、チューブ中で凍結乾燥されていてもよいし、既知の量、重量モル濃度、または濃度において溶液中にあってもよい。上記ASOは、キャリア（例えば、溶媒および/または賦形剤）が上記ASOを含む薬学的に受容可能な組成物へと溶解または希釈され得、IVバッグ、シリンジ、またはポンプ中に装填され得る。上記医薬は、1より多くのASO、例えば、2、3、4、もしくは5、またはこれより多くの任意の組み合わせを使用して作製され得る。本発明の組成物における塩基は、改変された塩基または揺らぎ塩基であり得、これは、本発明の組成物の範囲および有効性を増大させるために使用され得る。1つの例において、本発明における使用のためのASOは、メチル化塩基（例えば、5-メチルシトシン、5-メチルウラシル（チミン）など）を含み得る。

【0018】

本発明の組成物は、連続的な投与に適応させるために製剤化され得る。例えば、製剤は、2回またはこれより多くの別個の時に、および必要に応じて、2またはこれより多くの異なるASOで、最適な治療濃度域（therapeutic window）を利用し、ASO間の潜在的な競合を回避するために投与されるための投与量を提供し得る。さらに、本発明の組成物は、連続的に投与されようがそうでなかろうが、関わる上記ASOの組成物に応じて、1またはこれより多くの標的と相互作用し得る。例えば、ASOは、多数の標的（mRNA種およびpre-mRNA種の中およびこれらにまたがるものの両方）との相互作用を可能にし、従って、その関連付けられた処置が1より多くの遺伝子コピーからの転写物に影響を与えることを可能にする標的化されたミスマッチを含み得る。本発明の組成物はまた、時間放出フォーマットにおいて送達され得る、および/または血清半減期を増大させるためにアジュバントを含み得る。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0019】

図面の簡単な説明

【図1】図1は、Dup15q症候群を処置するための組成物を示す。

【0020】

【図2】図2は、ギャップマー構造を有するオリゴヌクレオチド(ASO)を示す。

【0021】

【図3】図3は、40のUBE3Aエキソン性ASOのスクリーニングからの結果を示す。

【0022】

【図4】図4は、10のASO候補の用量応答を示す結果を示す。

【0023】

【図5】図5は、マウス相同性を有するヒトエキソン性ASOのスクリーニングからの結果を示す。

【0024】

【図6】図6は、ある特定のスクリーニングされた本発明のASOに関するUBE3AノックダウンのqPCR読み出し(UBE3Aノックダウンのパーセントとして表される)をまとめる表を示す。

【0025】

【図7】図7は、ある特定のスクリーニングされた本発明のASOに関するUBE3AノックダウンのqPCR読み出し(UBE3Aノックダウンのパーセントとして表される)をまとめる表を示す。

【0026】

【図8】図8は、ある特定のスクリーニングされた本発明のASOに関するUBE3AノックダウンのqPCR読み出し(UBE3Aノックダウンのパーセントとして表される)をまとめる表を示す。

【0027】

【図9】図9は、ある特定のスクリーニングされた本発明のASOに関するUBE3AノックダウンのqPCR読み出し(UBE3Aノックダウンのパーセントとして表される)をまとめる表を示す。

【0028】

【図10】図10は、Dup15q患者線維芽細胞(上)またはマウス胚性線維芽細胞(下)における2つのリード候補例ASOおよびそれらのPO改変娘分子に関する標的発現のUBE3A ASO用量応答調節を示す。

【0029】

【図11】図11は、用量応答のプロットを示し、図10からの同じ2例のリード候補ASOに関するEC50を示す。

【0030】

【図12】図12は、UBE3Aエキソンを標的とする本発明のリード全PS骨格ASO候補の用量応答データを示す。

【0031】

【図13】図13は、UBE3Aイントロンを標的とする本発明のリード全PS骨格ASO候補の用量応答データを示す。

【0032】

【図14】図14は、齧歯類のインビボ有効性試験のための100%マウス相同性を有する本発明のリード全PS骨格ASO候補の用量応答データを示す。

【0033】

【図15】図15は、齧歯類のインビボ有効性試験のための100%マウス相同性を有するPO改変娘リードASO候補の用量応答データを示す。

【0034】

10

20

30

40

50

【図16】図16は、ヒト臨床候補試験のための本発明のPO改変娘リードASO候補の用量応答データを示す。

【0035】

【図17】図17は、ある特定の候補リードUBE3A ASOおよび同一のASO配列を有する3つのPO改変娘分子のウェスタンブロットを示す。

【0036】

【図18】図18は、図17のASOに関するUBE3Aタンパク質ノックダウンの定量を示す。

【0037】

【図19】図19は、UBE3Aを標的とするリード全PS骨格ASO候補のUBE3Aタンパク質ノックダウン結果をまとめる表を提供する。 10

【0038】

【図20】図20は、齧歯類のインビボ有効性試験のための100%マウス相同性を有するリード全PS骨格ASO候補のUBE3Aタンパク質ノックダウン結果をまとめる表を提供する。

【0039】

【図21】図21は、齧歯類のインビボ有効性試験のための100%マウス相同性を有するPO改変娘リードASO候補のUBE3Aタンパク質ノックダウン結果をまとめる表を提供する。

【0040】

【図22】図22は、ヒト臨床候補のためのPO改変娘リードASO候補のUBE3Aタンパク質ノックダウン結果をまとめる表を提供する。 20

【0041】

【図23】図23は、本発明のUBE3Aリード候補ASOを使用するヒトNGN2幹細胞由来ニューロンにおけるUBE3A転写物のノックダウンを示すデータを提供する。

【0042】

【図24】図24は、本発明のUBE3Aリード候補ASOを使用するヒト初代ニューロンにおけるUBE3A転写物のノックダウンを示すデータを提供する。

【0043】

【図25】図25は、本発明のUBE3AリードASO候補を使用する非ヒト霊長類初代線維芽細胞培養物におけるUBE3A転写物のノックダウンを示すデータを提供する。 30

【0044】

【図26】図26は、本発明のUBE3Aリード候補ASOを使用するマウス初代皮質ニューロンにおけるUBE3A転写物のノックダウンを示すデータを提供する。

【0045】

【図27】図27は、本発明のUBE3AリードASO候補を使用するラット初代皮質ニューロン（ここで細胞を4日後にqPCRのために採取した）を使用するUBE3A転写物のノックダウンを示すデータを提供する。

【0046】

【図28】図28は、本発明のUBE3AリードASO候補を使用するラット初代皮質ニューロン（ここで細胞を8日後にqPCRのために採取した）におけるUBE3A転写物のノックダウンを示すデータを提供する。 40

【発明を実施するための形態】

【0047】

詳細な説明

図1は、Dup15q症候群を処置するための組成物101を示す。組成物101は、mRNA 117またはpre-mRNAにおける標的セグメント115にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチド107を含む。RNA 117は、ユビキチンリガーゼタンパク質（例えば、ユビキチンタンパク質リガーゼESA）をコードする。上記標的を含むRNA 117のセグメント115は、配列番号1~219のうちの一つと少 50

なくとも約75%相補的である。RNA 117のセグメント115へのASO 107のハイブリダイゼーションは、上記mRNAをUBE3Aタンパク質へと翻訳することを防止する。好ましくは、上記オリゴヌクレオチドにおける塩基の配列は、配列番号1~219のうちの1つと少なくとも80%同一性、より好ましくは少なくとも約90%同一性を有する。ある特定の実施形態において、上記オリゴヌクレオチドにおける塩基の配列は、配列番号1~219のうちの1つと少なくとも約90%同一であり、ここで上記オリゴヌクレオチドは、UBE3A pre-mRNAまたはmRNAにハイブリダイズして、そのRNase H切断を誘導する。

【0048】

オリゴヌクレオチド107は、mRNA 117におけるセグメント115にハイブリダイズする。なぜならオリゴヌクレオチド107は、mRNA 117の標的セグメント115に対して実質的にまたは完全にアンチセンスだからである。その局面において、上記組成物は、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を含む。組成物101は、塩基対相補性を有するRNAを標的とするために結合し、上記ASOの化学構造および設計に基づいて、種々の効果を発揮するASOを含む。神経学的疾患の前臨床モデルおよびヒト臨床試験開発において一般に使用される種々の機序が、使用され得る。それらの機序は、RNase H酵素の動員；エキソンを含むかまたは排除するための選択的スプライシング改変、およびその標的へのmiRNA結合を阻害するmiRNA阻害を介するRNA標的分解を含む。

【0049】

本開示の好ましい実施形態は、UBE3A pre-mRNAまたはmRNAにハイブリダイズし、RNase H酵素を動員するASOを含む。上記RNase H酵素は、上記RNAを切断し、これは、UBE3Aタンパク質の発現をダウンレギュレートする。従って、本開示のオリゴヌクレオチド107は、Dup15q症候群の標的としてUBE3A CNVに対処する。本開示は、自閉スペクトラム症(ASD)と関連する最も一般的な遺伝的変体のうちの1つが、第15染色体q11.2-q13.1の重複(Dup15q症候群)であるということを示唆する洞察を元にする。第15染色体q11.2-q13.1領域は、刷り込みされるプラダー-ウィリ/アンジェルマン症候群決定領域(critical region)(PWACR)、ならびに脳発達およびシナプス機能に極めて重要ないくつかの遺伝子(例えば、ユビキチンタンパク質リガーゼ3A(UBE3A)、small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N(SNRPN)、および3種のGABA Aレセプター遺伝子(GABRB3、GABRA5、およびGABRG3)を含む。Dup15q症候群は、15q11.2-13.1の重複の2つの主なタイプ：(1)15p、および15q11.1の近位領域を含む過剰染色体上に2つのさらなる母系に由来するコピーを生じる(最も一般には、その領域の4つのコピーをもたらす)同腕二動原体第15染色体(idic(15))、または(2)15q11.2-q13.1領域の1つ余分のコピーが、同じ染色体アーム上で起こり、代表的には、その領域の3つのコピーを生じ、全体により軽度の表現型を有する中間部15q重複、を含む。Hogart, 2010, The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-13, Neurobiol Dis 38:181-91(参考として援用される)を参照のこと。メチル化された母系15q重複の増大したコピー数は、遺伝子およびタンパク質発現において変化をもたらし、UBE3Aの過剰発現は、Dup15qにおける重篤度に関連付けられ、ここで母系アレルの増大した数は、Dup15q病理の主な駆動因子であると考えられる。Scoles, 2011, Increased copy number for methylated maternal 15q duplications lead to changes in gene and protein expression in human cortical samples, Mol Autism 2:19およびBaker, 2020, Relationships betwee

10

20

30

40

50

n UBE3A and SNORD116 expression and features of autism in chromosome 15 imprinting disorders, Translational Psychiatry 10:362 (ともに参考として援用される)を参照のこと。そこで、UBE3A ASOを含む組成物は、Dup15q症候群を処置するために被験体に投与される。

【0050】

従って、本開示は、患者においてDup15q症候群を処置するための医薬の製造のためのアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)の使用を提供する。この使用において、上記ASOは、配列番号1~219のうちの一つと少なくとも約75%同一性、およびより好ましくは少なくとも90%同一性、例えば、95%またはこれより高い同一性を有する。好ましい実施形態は、約15~25個の間の塩基の長さ、好ましくは約18~22個の間(両端を含む)であるASOを使用する。一般に、「ASO」への言及は、実質的に同一の分子の多くのコピーを含む。よって、「ASO」は、規定されたASOの数十万または数百万ものコピーより多い可能性がある。好ましい実施形態において、上記ASOは、20個の塩基の長さであり、配列番号1~219のうちの一つの配列を有し、Dup15q症候群の処置のための医薬の製造において使用される。上記ASOは、任意の適切な形式(例えば、チューブ中で凍結乾燥されるか、またはチューブ(例えば、微量遠心チューブもしくは試験管)中で溶液の状態のような)において提供され得る。上記使用の好ましい実施形態は、UBE3Aを標的とする。1またはこれより多くの(例えば、2、3、4、もしくは5、またはこれより多い)ASOは、医薬の製造において使用され得る。上記1またはこれより多くのASOは、UBE3A mRNAにおける標的にハイブリダイズし得る。上記使用のある特定の実施形態において、上記ASOにおける塩基の配列は、配列番号1~219のうちの一つと少なくとも約90%同一である。上記使用の実施形態において、ASOは、RNAウイングが隣接した中心的DNAセグメントを有するギャップマー構造(例えば、10~12個のDNA塩基の中心的領域であって、その中心的な領域の両側に4~5個の改変されたRNA塩基を有するもの)を有し得る。各改変されたRNA塩基は、2'-MOE RNA、2'-O-メチルRNA、または他の適切な糖であり得る。好ましくは、ASOの骨格は、複数のホスホロチオエート結合(専ら、またはホスホジエステル連結をも含むかのいずれか)を有し、例えば、その糖連結のうちの大部分または全てが、上記使用の実施形態においてホスホロチオエートであり得る。上記ASOは、最初は、注射による導入に適した製剤へと混合するために適した形態にあり得る。例えば、上記ASO(1つのASOの数干または数百万またはこれより多くのコピー)は、チューブ中に凍結乾燥されていてもよいし、既知の量、重量モル濃度、または濃度において溶液中にあってもよい。上記ASOは、キャリア(例えば、溶媒および/または賦形剤)が上記ASOを含み、IVバッグ、シリンジ、またはバイアル中に装填され得る薬学的に受容可能な組成物へと溶解または希釈され得る。上記医薬は、1より多くのASO、例えば、2、3、4、もしくは5、またはこれより多くのものの任意の組み合わせを使用して作製され得る。

【0051】

上記使用の実施形態において記載される任意のASOは、本開示の組成物中に含まれ得る。本開示の組成物の好ましい実施形態は、1または複数の治療用オリゴヌクレオチドを含み、各々、配列番号1~219のうちの一つと少なくとも80%同一の塩基配列を有し、ここで上記治療用オリゴヌクレオチドの各々は、改変されたRNAウイングが隣接した中心的DNAセグメントを含むギャップマー構造を有し、ここで上記複数の治療用オリゴヌクレオチドは、注射のために製剤化された溶液またはキャリア中に提供される。

【0052】

図2は、ギャップマー構造を有するオリゴヌクレオチド207を示す。オリゴヌクレオチド207は、約10~12個のDNA塩基の中心的領域221に隣接する2つのウイング(第1のウイング215および第2のウイング216)を含む。好ましい実施形態において、ウイング215、216は、全てまたは主にRNA塩基であるのに対して、中心的

領域 2 2 1 は、全てまたは主に DNA 塩基である。好ましくは、上記ウイングは、全て RNA 塩基であり（改変されているかまたは改変されていない）、上記中心的領域は全て DNA 塩基である。いくつかの実施形態において、各ウイングは、5 個の RNA 塩基からなり、そのうちの全てまたは大部分は、改変された RNA 塩基である（例えば、ここで各改変された RNA 塩基は、2' - O - メトキシエチル RNA および 2' - O - メチル RNA からなる群より選択される）。改変された RNA 塩基は、リボース糖の 2' ヒドロキシル基上に置換を含み得る。2' - O - メトキシエチル（「2' - MOE」）改変糖は、RNA 塩基中に含まれ得る。オリゴヌクレオチド 2 0 7 は、好ましくは、少なくとも約 1 5 個の塩基を含み、約 1 5 ~ 約 2 5 個の間の塩基を含み得る。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチド 2 0 7 は、複数のホスホロチオエート結合を含む骨格を有する。1 または任意の数のホスホロチオエート結合が、DNA のセグメント（例えば、オリゴヌクレオチド 2 0 7 の中心的領域 2 2 1）の骨格中に含まれ得る。オリゴヌクレオチド 2 0 7 は、1 または任意の数のホスホロチオエート結合を含み得る。例えば、オリゴヌクレオチド 2 0 7 内のあらゆる骨格の連結は、ホスホロチオエートであり得るか、または大部分、もしくは約半数が、ホスホロチオエートであり得る。さらに、ホスホジエステル骨格に対する他の改変が存在し得る。

10

【0053】

組成物 1 0 1 は、送達のために製剤化され得る。よって、オリゴヌクレオチド 1 0 7 は、最初は、シリンジ、バッグ、または注射ポンプへの導入に適した製剤へと混合するために適切な形態にあり得る。例えば、オリゴヌクレオチド 1 0 7（1 つのオリゴヌクレオチド 1 0 7 の数千または数百万またはこれより多くのコピー）は、チューブ中で凍結乾燥されてもよいし、既知の重量モル濃度または濃度において溶液中にあってもよい。オリゴヌクレオチド 1 0 7 は、キャリア（例えば、溶媒または賦形剤）がオリゴヌクレオチド 1 0 7 を含む薬学的に受容可能な組成物へと溶解または希釈され得、IV バッグ、シリンジ、またはバイアル中に装填され得る。記載されるように、組成物 1 0 1 は、配列番号 1 ~ 2 1 9 のうちの 1 つとの比較によって規定される配列を有する少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチド 1 0 7 を含む。従って、本開示の組成物は、特定された標的によって規定され、例証される。

20

【0054】

具体的には、オリゴヌクレオチド 1 0 7 は、配列番号 1 ~ 2 1 9 のうちの 1 つと少なくとも約 7 5 % 相補的である mRNA のセグメントに沿って U B E 3 A タンパク質をコードする mRNA にハイブリダイズして、それによって、U B E 3 A タンパク質への上記 mRNA の翻訳を防止する。これは、上記オリゴヌクレオチドが配列番号 1 ~ 2 1 9 のうちの 1 つと少なくとも約 7 5 % 同一性、好ましくは少なくとも約 9 0 % または 9 5 % または 1 0 0 % 同一性を有する場合に達成される。ある特定の実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 ~ 2 1 9 のうちの 1 つの配列を有するが、当業者は、相補的な標的と 9 0 % または好ましくは 9 5 % 同一性を有するオリゴヌクレオチドが、上記標的に配列特異的様式においてなおもハイブリダイズする傾向があることを理解する。2 本鎖構造の形成は、エネルギー的に、Watson - Crick 塩基対合およびその 2 本鎖構造が 1 0 個ごと程度に約 1 個のミスマッチ塩基対を許容し得る塩基スタッキングを通じて十分に有利である。よって、細胞における中程度にストリンジェントな生理学的条件下では、9 5 % 同一性は、特に、オリゴヌクレオチドが、上記オリゴヌクレオチドを酵素による分解から保護するために少なくとも数個の改変された RNA 塩基またはホスホロチオエート骨格連結を有するギャップマー構造を有する場合、効果的であるはずである。

30

40

【0055】

実際に、本開示の組成物の特徴および利益は、（配列番号 1 ~ 2 1 9 の）標的が、相補体が U B E 3 A 転写物以外の分子中に存在する配列を除外するために実質的にスクリーニングされていることである。例えば、上記配列は、長い非コード RNA（IncRNA）を含む RNA 転写物のデータベースに対してスクリーニングされており、非標的配列とマッチする最初の配列は、除外された。従って、患者に投与される場合に、配列番号 1 ~ 2

50

19の配列を有するASOは、非標的配列とハイブリダイズしてしまう機会は最小限のほ
 ずである。よって、好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチド107は、スクリー
 ニングされて、ヒトにおける任意のオフターゲットコードRNA、または長い非コードR
 NAに関する閾値マッチを満たさないように決定されている塩基配列を有する。上記で述
 べた基準を満たす組成物または使用は、オフターゲット物質（例えば、IncRNA）ま
 たは他のオフターゲットRNA転写物にインピボで結合しないはずである。なぜならその
 含まれる配列は、IncRNAおよび他のRNA転写物のデータベースに対してスクリー
 ニングされているからである。本開示の配列は、標的特異性に関してスクリーニングされ
 ている。好ましくは、オリゴヌクレオチド107は、ヒトまたは非ヒト霊長類ゲノムにお
 ける相同なセグメントに対する0個のミスマッチおよび齧歯類ゲノムにおける相同なセグ
 メントにおいて約5個以下のミスマッチを有する塩基配列を有する。 10

【0056】

上記組成物が細胞に送達される場合、その細胞は、UBE3Aの用量依存性ノックダ
 ウンを示す。

【0057】

図3は、40のUBE3Aエキソン性ASOのスクリーニングからの結果を示す（1つ
 のコントロール線維芽細胞株とともに；結果は処理後48時間で得られる）。その示さ
 れる結果は、配列番号1～40に相当する。図において、濃度応答（CR）において試験
 したASOのバーに、丸で印を付ける。

【0058】

図4は、本開示の実施形態（約20個の塩基、ASOを通じて2'-O改変されたRNA
 Aおよびホスホロチオエート連結を有するRNAウイングが連結した約12個の塩基のD
 NA中心的領域）に従って設計された配列番号14、17、4、7、8、18、21、2
 6、34、および35の10のASO候補の用量応答を（各々6つの濃度で）示す結果を
 示す。全10個のASOは、用量依存性様式においてコントロール（ビヒクルのみで処理
 した細胞および処理しない「細胞のみ」の条件）と比較してUBE3A発現を減少させた
 。

【0059】

核酸ハイブリダイゼーションは、ミスマッチに関してある程度許容性を有することから
 、配列番号1～219のうちの一つと少なくとも90%マッチである塩基配列を有し、ホ
 スホロチオエート連結によってのみ連結された塩基を有し、オリゴヌクレオチド107が
 、5'ウイングおよび3'ウイングが隣接したDNA塩基の中心的セグメント（例えば、上
 記5'ウイングおよび上記3'ウイングは各々、12個のDNA塩基に隣接する4個連続し
 た2'改変されたRNA塩基を含む4-12-4構造、または5-10-5構造、または
 類似のもの）を有するオリゴヌクレオチド107は、チャートに示されるパターンに従っ
 て用量依存性ノックダウンを示すことが見出され得る。いくつかの実施形態において、オ
 リゴヌクレオチド107は、具体的には、配列番号1～219のうちの一つ（より好まし
 くは配列番号1～40のうちの一つ、またはより好ましくは配列番号146、155、1
 56、158、159、161、164、169、174、175、178、179、2
 13、もしくは214）とマッチし、ホスホロチオエート連結によって（必要に応じてい
 くつかのホスホジエステル連結とともに）連結された塩基を有し、上記オリゴヌクレオチ
 ド107は5'ウイングおよび3'ウイングが隣接した中心的な12個のDNA塩基を有し
 、上記5'ウイングおよび上記3'ウイングは各々、4個連続した2'-MOE RNA塩基
 を含む塩基配列を有する。 30 40

【0060】

図5は、マウス線維芽細胞におけるマウス相同性を有するマウスエキソン性Ube3a
 ASOおよびヒトエキソン性ASOのスクリーニングからの結果を示す。そのスクリー
 ニングしたヒトASOは、配列番号1、4、5、9、15、16、21、25、28、およ
 び29のものを含んだ。その結果は、齧歯類モデルにおいて相同な標的が存在するヒト標
 的に対するASOを設計することが可能であることを示す傾向にある。 40 50

【0061】

これらの組成物はUBE3Aの発現をノックダウンするにあたって効果的であることから、本開示の組成物は、患者においてDup15q症候群を処置するために使用され得る。本開示の方法は、本開示の任意の組成物を、それを必要とする患者に投与して、それによって、Dup15q症候群を処置または緩和する工程を包含する。

【0062】

本開示の組成物は、生きているニューロンのインビトロサンプルで試験され得る。例えば、インビトロでのニューロンは、光刺激下でのニューロン活性化（例えば、光に応じてニューロンを発火させる改変された藻類チャネルロドプシン）およびニューロン活性の光学的レポーター（ニューロン膜電位に比例して光を発し、ニューロン活性のシグナルを生じる改変された古細菌ロドプシン）を提供する光遺伝学的構築物（optogenetic construct）を含み得る。インビトロのニューロンは、蛍光顕微鏡検査機器においてアッセイされ得、必要に応じて、推定可能な様式でニューロンを発火させる神経刺激組成物で処理され得る。任意の適切な光遺伝学的構築物、光遺伝学顕微鏡（optogenetic microscope）、または神経刺激性組成物が使用され得る。例えば、適切な光遺伝学的構築物としては、米国特許第9,594,075号（参考として援用される）に記載されるものが挙げられる。適切な光遺伝学顕微鏡としては、米国特許第10,288,863号（参考として援用される）に記載されるものが挙げられる。

10

【0063】

本開示の方法および組成物は、有益なことには、Dup15q症候群を有する被験体においてインビボでニューロンへと本明細書に記載される治療用オリゴヌクレオチド107を送達するために使用され得る。任意の適切な送達アプローチが、使用され得る（例えば、全身送達（例えば、注射による）または局所送達（例えば、皮下、髄腔内、または遅延放出デバイスの移植によるもの）が挙げられる）。本開示の方法は、本開示の組成物を、1回、数日間または数週間にわたって数回、数ヶ月ごと（例えば、1年に約3回または4回）送達することを含み得る。

20

【0064】

本開示のオリゴヌクレオチド（例えば、組成物101中のギャップマー、ASO、または治療用オリゴヌクレオチド107）は、表1に示される配列のうちの1つを参照して定義される配列を有し得る。例えば、本開示のオリゴヌクレオチドは、表1に示されるとおりの配列番号1~219のうちの1つと少なくとも約75%、80%、90%、95%、または完全に同一である配列を有し得る。UBE3Aに対するある特定の好ましい実施形態は、配列番号1~40として表示される表1中のものを含む。

30

【0065】

さらに、以下で示される実施例に記載されるように、本発明者らは、本発明のASOをスクリーニングした。得られたデータに基づくと、配列番号146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213、および214に相当するASOを、単一用量および用量応答有効性、配列モチーフ責任（sequence motif liabilities）、およびオフターゲットアラインメント分析に基づいてリード候補ASOとして特定した。それらのASOは、最大のインビトロ有効性、最低のオフターゲットアラインメント、および制限された配列モチーフの懸念を示した。よって、ある特定の局面において、本発明に従うUBE3Aに対する好ましいASOは、配列番号146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213および214に相当する配列と少なくとも約75%、80%、90%、95%、または完全に同一である配列を有するASOを含む。

40

【0066】

【表 1 - 1】

表1: ASOの配列		
配列識別子	配列	第15染色体のマイナス鎖 における開始位置
配列番号 1	TCATTTCCACAGCCCTCAGT	25375694
配列番号 2	TCAGAGCAGGAGTTGTTGGG	25375505
配列番号 3	GATTTTCAGTTCTTCCTTGGT	25371643
配列番号 4	TCCATAGCAGCAGCAGAACA	25371571
配列番号 5	GCTTCTGAGTCTTCTTCCAT	25371556
配列番号 6	GTGAGCTATCACCTATCCTT	25371527
配列番号 7	TTGTTGTCTCCCTGTGAGCT	25371514
配列番号 8	GCAATCTGGTGTAGACCCTT	25371443
配列番号 9	TCCCCCTCCCACTACATTGTC	25371022

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

配列番号 10	TTTGTGTCCACTTCCCCTCC	25371010
配列番号 11	GGGATGGGCTCTTCATCATC	25370977
配列番号 12	AGGACCTTTCTTGTTTCTTC	25370913
配列番号 13	ACCAAGTTCAGTTTCCAGGG	25370883
配列番号 14	ACCTCATTAGTGGTTCATT	25370812
配列番号 15	GGATTCAACTGCTGTCCTTG	25370620
配列番号 16	TCATCAACTCCTTGTTCTCC	25360444
配列番号 17	ATTTCTCCACAACCAGCTG	25360399
配列番号 18	GCCAGACCCAGTACTATGCC	25356793
配列番号 19	CCACATTCCCTTCATACTCC	25356007
配列番号 20	GAGTCCCTGGTATAGCCACC	25354364
配列番号 21	AGTCTTTTCTGTTCATCTGT	25340180
配列番号 22	CAGGTGCTCTGTCTGTGCC	25340142
配列番号 23	CCCACAGGTGCTCTGTCTGT	25340138
配列番号 24	CCTAGTCCTCCCACAGGTGC	25340129
配列番号 25	AACCTTTCTGTGTCTGGGCC	25339254
配列番号 26	CAGCCTTTTTGTACTGGGAC	25339012
配列番号 27	TTCCAGCCCACATGTCCCA	25338942
配列番号 28	GAAATCTGCTGTTCAGCCC	25338931
配列番号 29	AGGCTCAACCTCAAGCAGTA	25338769
配列番号 30	GGGAGAGTAGTTCTGTTGGT	25338727
配列番号 31	CATTCCAATTTCTCCCTTCC	25338489
配列番号 32	CCCTGTCCTTTCATATACTA	25338344
配列番号 33	GGCCAAATGCACTTTCCCA	25338284
配列番号 34	GCACAGTAGCCATCTTTTTC	25338041
配列番号 35	TCATTCATTTCCAGGTCAGC	25337996
配列番号 36	AGGCACAAGCTCAGCACATT	25337708
配列番号 37	GCATTGTCTTCTTTTCCAC	25337455
配列番号 38	CCCCATGTTACCTTATCACA	25337426
配列番号 39	GTCCCTTTCATCAAGGTAGC	25337365

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

配列番号 40	GCACAGTGGATGAGAAGCCT	25337320
配列番号 41	GCTGCTCGCTTCCTGTACCA	25375752
配列番号 42	CTTACTGGGTGAGAGTCTCC	25356686
配列番号 43	TTCTTACCCGGCTTCCACAT	25354521
配列番号 44	TTTCTTACCCGGCTTCCACA	25354520
配列番号 45	CTTTCTTACCCGGCTTCCAC	25354519
配列番号 46	TACCTTTCTGTGTCTGGGCC	25340082
配列番号 47	ACCTTCCTGTTTTCATTTGT	25355890
配列番号 48	ACTTACTGGGTGAGAGTCTC	25356685
配列番号 49	TACCTTCCTGTTTTCATTTG	25355889
配列番号 50	AACTTACTGGGTGAGAGTCT	25356684
配列番号 51	GCCCTCCCTTCCCATCAATC	25438011
配列番号 52	TCCCCACACCTCTGACTAGT	25436704
配列番号 53	GGGTGGTGGGCTGGGACCAA	25435050
配列番号 54	ACTGACCCCTAGTTCTGCCT	25430565
配列番号 55	CCTTGGCTCTCCCCTCCCTT	25425998
配列番号 56	GGACCCATGGCCTTTGAGCT	25415877
配列番号 57	TGACACCATACCTCCCCTCT	25415825
配列番号 58	CCCAGCACTACTGCCACTA	25415373
配列番号 59	ACCCAGCCATCCCAGCACT	25415362
配列番号 60	GAGTCTCTCTTTCCAGT	25414672
配列番号 61	CCTCTGACCCTTGAGTCTCC	25412413
配列番号 62	CACCCTACCTGGGTCCCTCA	25411743
配列番号 63	CCTCTCTTCCAGTCCCCTCT	25411061
配列番号 64	GGTCAACTCTCAGGCCCACT	25408962
配列番号 65	GGTGCAGCTTCTCCATCCTG	25408633
配列番号 66	CCCTCCAGCATCAGATGTCA	25407191
配列番号 67	GACACACCTGGTCTCCACCA	25407060
配列番号 68	CTTACCCATTCCCCTCAGT	25403266
配列番号 69	TGGGCTCCTGTGTCTGTCAG	25393846

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

配列番号 70	GCCCTCCAGTGACCCTGCCA	25380443
配列番号 71	GTCCAGGAGICTTTCAGCTT	25378642
配列番号 72	CTGCATTCCACTGTGCCAGC	25374354
配列番号 73	GGGTCTTCCTAGTTTGTTCC	25372328
配列番号 74	GTTTCCTTATGCCAGTTCCC	25362783
配列番号 75	ATGAGCAGGGTCCAGCAGGA	25342721
配列番号 76	TTGCCACTTCCCTCCCTGC	25341989
配列番号 77	GACTCTACACTGTCCAGCCA	25432729
配列番号 78	CTCCATTAGCTCCTCAGAGT	25413636
配列番号 79	TCCTCCTAACCTCTTCCAGA	25397434
配列番号 80	CCACATCTCAGCCATTCTT	25366556
配列番号 81	GCTATCACCTATCCTTGA	25371531
配列番号 82	GTCTCCCTGTGAGCTATC	25371519
配列番号 83	TCTGGTGTAGACCCTTCT	25371447
配列番号 84	CCTCCCCTACATTGCA	25371025
配列番号 85	ATTCAACTGCTGTCCTTG	25370622
配列番号 86	TGCAGGATTTCCATAGC	25360497
配列番号 87	TAGCCAGACCCAGTACTA	25356791
配列番号 88	GTGAGAGICTCCCAAGTC	25356693
配列番号 89	CACATTCCTTCATACTC	25356008
配列番号 90	GGCTTCCACATATAAGCA	25354529
配列番号 91	ATCTGCTGTTCCAGCCCA	25338934
配列番号 92	GAGAGTAGTTCTGTTGGT	25338729
配列番号 93	ACATACTGTGGCATGAGT	25338414
配列番号 94	GCACTTTCCCCAGTAAAC	25338292
配列番号 95	GCAATAGGCTTGACTACC	25338257
配列番号 96	GGGAGACTTTGGATTGTC	25338130
配列番号 97	CCAGGTCAGCTTACTGTA	25338006
配列番号 98	GCTCAGCACATTAGCTAT	25337716
配列番号 99	CCCCATGTTACCTTATCA	25337426

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

配列番号 100	GGTCCCTTTCATCAAGGT	25337364
配列番号 101	GGAGGGATGAGGATCACAGA	
配列番号 102	GCTTGCTCCTTCTTGAGG	
配列番号 103	TATCTCAGAGCAGGAGTTGT	
配列番号 104	GCTCTGTACCAATGCCTCAG	
配列番号 105	CAGAACATGCAGCTTTTCC	
配列番号 106	GCCATTTCCAGATATTCAGG	
配列番号 107	TCAGTTTTCCTTGGGCTGCA	
配列番号 108	GTTGCTGAAATGTCTCCATC	
配列番号 109	CCCTCCCCTACATTTGCAT	
配列番号 110	CTAGAACCTCATTGAGTGGT	
配列番号 111	GATTCAACTGCTGTCCTTGA	
配列番号 112	CCACATACAAGTCTTCTTC	
配列番号 113	CCAGACCCAGTACTATGCCA	
配列番号 114	TTCCCAGAAGTCCCTAATCA	
配列番号 115	GGTAACCTTTCTGTGTCTGG	
配列番号 116	GGCCTTCAACAATCTCTCTT	
配列番号 117	GCCTTTTTGTACTGGGACAC	
配列番号 118	TCTGCTGTTCCAGCCCACAT	
配列番号 119	ATCTGCTGTTCCAGCCCACA	
配列番号 120	CTAAAGTTCTGAGGGCTGCA	
配列番号 121	CATACTGTGGCATGAGTTGT	
配列番号 122	GACTACCATTTCAATTTGGCC	
配列番号 123	CATTTCCAGGTCAGCTTACT	
配列番号 124	CACCAAGGCACAAGCTCAGC	
配列番号 125	AAAGCTGCATTTTCTCTGCC	
配列番号 126	ACAGTGTTCTAAAGGCTGGC	
配列番号 127	CAGACACATCATCAGGGCCT	
配列番号 128	ACAGACACATCATCAGGGCC	
配列番号 129	CACAGACACATCATCAGGGC	

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

配列番号 130	GACTCAGGGATGGGCTCTTC	
配列番号 131	GGACTCAGGGATGGGCTCTT	
配列番号 132	TGGACTCAGGGATGGGCTCT	
配列番号 133	TCCCTTCCTCCATCTTTCT	
配列番号 134	CTCCCTTCCTCCATCTTTC	
配列番号 135	ACATACTGTGGCATGAGTTG	
配列番号 136	CAATCAGAGTAAACTGACCC	10
配列番号 137	GACAGGAAGCACAAACTCA	
配列番号 138	GGACAAGTGCATCATCTATG	
配列番号 139	TAAATAGCCAGACCCAGTAC	
配列番号 140	GGATTCAACTGCTGTCCTTG	
配列番号 141	GGATTCAACTGCTGTCCTTG	
配列番号 142	GGATTCAACTGCTGTCCTTG	
配列番号 143	AACCTTTCTGTGTCTGGGCC	
配列番号 144	AACCTTTCTGTGTCTGGGCC	20
配列番号 145	AACCTTTCTGTGTCTGGGCC	
配列番号 146	GCTTGCTCCTTTCTTGGAGG	
配列番号 147	GCTTGCTCCTTTCTTGGAGG	
配列番号 148	GCTTGCTCCTTTCTTGGAGG	
配列番号 149	GGTAACCTTTCTGTGTCTGG	
配列番号 150	GGTAACCTTTCTGTGTCTGG	
配列番号 151	GGTAACCTTTCTGTGTCTGG	
配列番号 152	GGCCTTCAACAATCTCTCTT	30
配列番号 153	GGCCTTCAACAATCTCTCTT	
配列番号 154	GGCCTTCAACAATCTCTCTT	
配列番号 155	GCAATCTGGTGTAGACCCTT	
配列番号 156	GCAATCTGGTGTAGACCCTT	
配列番号 157	GCAATCTGGTGTAGACCCTT	
配列番号 158	GGGATGGGCTCTTCATCATC	
配列番号 159	GGGATGGGCTCTTCATCATC	40

【表 1 - 7】

配列番号 160	GGGATGGGCTCTTCATCATC	
配列番号 161	ACCAAGTTCAGTTTCCAGGG	
配列番号 162	ACCAAGTTCAGTTTCCAGGG	
配列番号 163	ACCAAGTTCAGTTTCCAGGG	
配列番号 164	GGATTCAACTGCTGTCCTTG	
配列番号 165	GGATTCAACTGCTGTCCTTG	
配列番号 166	ATTCCTCCACAACCAGCTG	10
配列番号 167	ATTCCTCCACAACCAGCTG	
配列番号 168	ATTCCTCCACAACCAGCTG	
配列番号 169	CAGCCTTTTTGTACTGGGAC	
配列番号 170	CAGCCTTTTTGTACTGGGAC	
配列番号 171	CAGCCTTTTTGTACTGGGAC	
配列番号 172	GCTTGCTCCTTCTTGGAGG	
配列番号 173	GCTTGCTCCTTCTTGGAGG	
配列番号 174	GCCATTTCCAGATATTCAGG	20
配列番号 175	GCCATTTCCAGATATTCAGG	
配列番号 176	GCCATTTCCAGATATTCAGG	
配列番号 177	GGCCTTCAACAATCTCTCTT	
配列番号 178	GCCTTTTTGTACTGGGACAC	
配列番号 179	GCCTTTTTGTACTGGGACAC	
配列番号 180	GCCTTTTTGTACTGGGACAC	
配列番号 181	GACTACCATTTCAATTTGGCC	
配列番号 182	GACTACCATTTCAATTTGGCC	30
配列番号 183	GACTACCATTTCAATTTGGCC	
配列番号 184	TCATTTCCACAGCCCTCAGT	
配列番号 185	CCTTCTTGGAGGGATGAGG	
配列番号 186	CTGAGCTTGCTCCTTCTTG	
配列番号 187	GCAGCTTTTTCCTTTTCATC	
配列番号 188	CAGCAGCAGAACATGCAGCT	
配列番号 189	TCTTCTTCCATAGCAGCAGC	40

【表 1 - 8】

配列番号 190	GATGCTTCTGAGTCTTCTTC	
配列番号 191	TCCCCTCCCCTACATTTGC	
配列番号 192	TCTGCAGGATTTCCATAGC	
配列番号 193	ACTGCTTCTTCAAGTCTGCA	
配列番号 194	AGTCTTTTCTGTTCATCTGT	
配列番号 195	ACAGGTGCTCTGTCTGTGCC	
配列番号 196	CTGTGTCTGGGCCATTTTTG	10
配列番号 197	ACCTTTCTGTGTCTGGGCCA	
配列番号 198	GTAGGTAACCTTTTCTGTGTC	
配列番号 199	ACAGCCTTTTTGTACTGGGA	
配列番号 200	TGAAATCTGCTGTTCCAGCC	
配列番号 201	AGGCTCAACCTCAAGCAGTA	
配列番号 202	TCCCTGTCCCTTTCATATACT	
配列番号 203	GCACTTCCCCAGTAAACTT	
配列番号 204	CCTTCTTGGAGGGATGAGG	20
配列番号 205	CCTTCTTGGAGGGATGAGG	
配列番号 206	CCTTCTTGGAGGGATGAGG	
配列番号 207	ACAGGTGCTCTGTCTGTGCC	
配列番号 208	ACAGGTGCTCTGTCTGTGCC	
配列番号 209	ACAGGTGCTCTGTCTGTGCC	
配列番号 210	ACCTTTCTGTGTCTGGGCCA	
配列番号 211	ACCTTTCTGTGTCTGGGCCA	
配列番号 212	ACCTTTCTGTGTCTGGGCCA	30
配列番号 213	ACAGCCTTTTTGTACTGGGA	
配列番号 214	ACAGCCTTTTTGTACTGGGA	
配列番号 215	ACAGCCTTTTTGTACTGGGA	
配列番号 216	GCACTTCCCCAGTAAACTT	
配列番号 217	GCACTTCCCCAGTAAACTT	
配列番号 218	GCACTTCCCCAGTAAACTT	
配列番号 219	ACAGCCTTTTTGTACTGGGA	40

【 0 0 6 7 】

本開示の好ましい組み合わせの実施形態は、Dup15q症候群を処置するための組成物を含む。上記組成物は、以下を含む：配列番号1～40のうちの1つと少なくとも約90%相補的であるmRNAのセグメントに沿ってUBE3Aタンパク質をコードするmRNAにハイブリダイズする第1のオリゴヌクレオチド；および必要に応じて、配列番号1～40のうちの異なる1つと少なくとも約90%相補的であるmRNAのセグメントに沿ってUBE3Aタンパク質をコードするmRNAにハイブリダイズする第2のオリゴヌクレオチド。好ましい組み合わせの実施形態において、上記治療用オリゴヌクレオチドの各々は、改変されたRNAウイングが隣接した中心的DNAセグメントを含むギャップマ

一構造を有し得る。

【0068】

本開示のより好ましい組み合わせの実施形態は、配列番号146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213、および214のうちの一つと少なくとも約90%相補的であるmRNAのセグメントに沿ってUBE3Aタンパク質をコードするmRNA；ならびに必要なに応じて、配列番号146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213、および214のうちの一つと少なくとも約90%相補的であるmRNAのセグメントに沿ってUBE3Aタンパク質をコードするmRNAにハイブリダイズする第2のオリゴヌクレオチドを含む、Dup15q症候群を処置するための組成物を含む。

【0069】

いずれかまたは両方のウイングは、改変されたRNA塩基を含み得る。例えば、両方のウイングは、2'-O-メトキシエチルリボース改変を有する4個連続したRNA塩基を含み得る。各オリゴヌクレオチドの全体は、当業者に明らかであるように、ホスホジエステルもしくはホスホロチオエート連結または他のものを介して接続され得る。最も好ましくは、少なくとも末端の連結は、標準的でない（すなわち、ホスホジエステルでない（例えば、ホスホロチオエート））。より好ましくは、上記RNAウイング内の連結のうちの大部分または全てが、標準的ではない（例えば、ホスホロチオエート）。好ましくは複数の治療用オリゴヌクレオチドは、送達のためにクリニックで希釈または再構成するために、凍結乾燥または溶液の状態を提供される。すなわち、上記第1のオリゴヌクレオチドの少なくとも1000から数百万のコピー、および必要なに応じて、上記第2のオリヌーの少なくとも1000から数百万のコピーが、1またはこれより多くのチューブ中に、凍結乾燥または溶液でパッケージされる。上記組成物のこの好ましい組み合わせの実施形態は、Dup15q症候群の処置のためのアンチセンス治療剤として予測外の利益を有することを証明し得る。本開示の実施形態は、UBE3Aの過剰発現をダウンレギュレートし得るUBE3Aを標的とするロック核酸（LNA）アンチセンスオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含む。本発明は、10~30ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドを提供する。これは、UBE3A標的核酸と少なくとも90%相補性（例えば、100%相補性）を有し、インピボでのUBE3Aの過剰発現を阻害し得る10~30ヌクレオチドの長さの連続したヌクレオチド配列を含む。オリゴヌクレオチド107は、配列番号1~219のうちの一つ、または好ましくは配列番号1~40のうちの一つ、または配列番号146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213、および214のうちの一つと100%同一であり得る。ある特定の局面において、オリゴヌクレオチド107は、配列番号1~219のうちの一つ、または好ましくは配列番号1~40のうちの一つ、または配列番号146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213、および214のうちの一つと少なくとも90%、95%、98%、または99%同一であり得る。

【0070】

実施形態は、本発明に従うアンチセンスオリゴヌクレオチドの薬学的に受容可能な塩、または本発明に従う結合体を含む。

【0071】

本発明は、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは本発明の結合体、ならびに薬学的に受容可能な希釈剤、溶媒、キャリア、塩および/またはアジュバントを含む薬学的組成物を提供する。

【0072】

本発明は、医療における使用のための本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは本発明の結合体または本発明の薬学的塩もしくは組成物を提供する。

【0073】

本発明は、Dup15q症候群の処置または防止または緩和における使用のための本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは本発明の結合体または本発明の薬学的塩もしくは組成物を提供する。本発明は、Dup15q症候群の処置または防止または緩和のための医薬の調製のための、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは本発明の結合体または本発明の薬学的塩もしくは組成物の使用を提供する。

【0074】

オリゴヌクレオチドは、固相化学合成、続いて、精製および単離によって、実験室で一般には作製される。上記オリゴヌクレオチドの配列に言及する場合、共有結合により連結されたヌクレオチドまたはヌクレオシドの核塩基部分の配列もしくは順序、またはその改変に言及が行われる。本発明のオリゴヌクレオチドは、人工物、すなわち、化学合成されたものであり得、代表的には、精製または単離される。本発明のオリゴヌクレオチドは、1またはこれより多くの改変されたヌクレオシドまたはヌクレオチド（例えば、2'糖改変ヌクレオシド）を含み得る。

【0075】

上記改変されたヌクレオチドは、独立して、デオキシ-ヌクレオチド、3'末端デオキシ-チミン(dT)ヌクレオチド、2'-O-メチル改変ヌクレオチド、2'-フルオロ改変ヌクレオチド、2'-デオキシ改変ヌクレオチド、ロックヌクレオチド、ロックされていないヌクレオチド、コンホメーションが制限されたヌクレオチド、制約されたエチルヌクレオチド、無塩基ヌクレオチド、2'-アミノ改変ヌクレオチド、2'-O-アシル改変ヌクレオチド、2'-C-アルキル改変ヌクレオチド、2'-ヒドロキシ(hydroxyl)改変ヌクレオチド、2'-メトキエチル改変ヌクレオチド、2'-O-アルキル改変ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホルアミデート、非天然の塩基を含むヌクレオチド、1,5-アンヒドロヘキシトール改変ヌクレオチド、シクロヘキセニル改変ヌクレオチド、ホスホチオエート基を含むヌクレオチド、メチルホスホネート基を含むヌクレオチド、5'-ホスフェートを含むヌクレオチド、5'-ホスフェート模倣物を含むヌクレオチド、グリコール改変ヌクレオチド、および2'-O-(N-メチルアセトアミド)改変ヌクレオチド、ならびにこれらの組み合わせからなる群より選択され得る。

【0076】

上記ASOの窒素性塩基は、天然に存在する核塩基（例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン、ウラシル、キサンチンおよびヒポキサンチン）ならびに天然に存在しない改変体（例えば、置換されたプリンまたは置換されたピリミジン（例えば、イソシトシン、プソイドイソシトシン、5-メチルシトシン、5-チアゾロ-シトシン、5-プロピニル-シトシン、5-プロピニル-ウラシル、5-プロモウラシル、5-チアゾロ-ウラシル、2-チオ-ウラシル、2'-チオ-チミン、イノシン、ジアミノプリン、6-アミノプリン、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリンおよび2-クロロ-6-アミノプリンから選択される核塩基）であり得る。

【0077】

上記核塩基部分は、各相当する核塩基の文字コード（例えば、A、T、G、CまたはU）によって示され得、ここで各文字は、必要に応じて、等しい機能の改変された核塩基を含み得る。例えば、例示されるオリゴヌクレオチドにおいて、上記核塩基部分は、A、T、G、C、および5-メチルシトシンから選択される。必要に応じて、LNAギャップマーに関しては、5-メチルシトシンLNAヌクレオシドが使用され得る。

【0078】

本開示のオリゴヌクレオチド107は、UBE3Aの発現をダウンレギュレートする（阻害する）能力がある。いくつかの実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的を阻害またはダウンレギュレートすることによって、その標的の発現を調節する能力がある。好ましくは、このような調節は、上記標的の正常な発現レベルと比較して少なくとも20%の発現の阻害、より好ましくは上記標的の正常な発現レベルと比較して少なくとも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%、または少なくとも90%阻害を生じる。

【0079】

本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）は、標的核酸のレベルを（例えば、RNase H切断を介して）減少させ得るか、または例えば、pre-mRNAのスプライシングの調節を介して、標的核酸の機能性を減少させ得る（もしくは機能性を変化させ得る）。

【0080】

本開示のオリゴヌクレオチド107は、改変された糖部分（すなわち、DNAおよびRNAにおいて見出されるリボース糖部分と比較した場合のその糖部分の改変）を有する1またはこれより多くのヌクレオチドを含み得る。リボース糖部分の改変を有する多くのヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドのある特定の特性（例えば、親和性および/またはヌクレアーゼ耐性）の改善を主に目的として作製されている。このような改変は、リボース環構造が、例えば、ヘキソース環（HNA）、または二環式環（これは、代表的には、リボース環（LNA）上のC2炭素とC4炭素との間の架橋を有する）、またはC2炭素とC3炭素との間の結合を代表的には欠いている連結されていないリボース環（例えば、UNA）での置換によって改変されているものを含む。改変されたヌクレオチドはまた、糖部分が非糖部分で置換されているヌクレオチド（例えば、ペプチド核酸（PNA）の場合）、またはモルホリノ核酸を含む。

10

【0081】

糖改変はまた、リボース環上の置換基を、水素以外の基へ、またはDNAおよびRNAヌクレオチドにおいて天然に見出される2'-OH基へと変更することを介して作製された改変を含む。置換基は、例えば、2'、3'、4'または5'位置において導入され得る。

20

【0082】

上記オリゴヌクレオチドは、1またはこれより多くのロック核酸（LNA）塩基を含み得る。LNAは、リボース環のコンホメーションを制限またはロックする、上記ヌクレオチドのリボース糖環のC2'およびC4'のピラジカル連結（「2'-4'架橋」ともいわれる）を含む2'-改変されたヌクレオチドを含み得る。これらのヌクレオチドはまた、文献中で架橋核酸または二環式核酸（BNA）といわれる。リボースのコンホメーションのロックは、LNAが、相補的なRNAまたはDNA分子に関してオリゴヌクレオチドへと組み込まれる場合、ハイブリダイゼーションの増強された親和性（二重鎖安定化）と関連する。これは、上記オリゴヌクレオチド/相補体二重鎖の融解温度を測定することによって慣用的に決定され得る。限定ではないが、例示的なLNAヌクレオチドは、以下に開示される：WO 99/014226、WO 00/66604、WO 98/039352、WO 2004/046160、WO 00/047599、WO 2007/134181、WO 2010/077578、WO 2010/036698、WO 2007/090071、WO 2009/006478、WO 2011/156202、WO 2008/154401、WO 2009/067647、およびWO 2008/150729（全て参考として援用される）。

30

【0083】

本開示のオリゴヌクレオチドの薬学的に受容可能な塩は、生物学的にまたは他の点で望ましくないものではない、遊離塩基または遊離酸の生物学的有効性および特性を保持するそれらの塩を含む。上記塩は、無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、特に塩酸）、および有機酸（例えば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、ケイ皮酸、スルホン酸、またはサリチル酸）で形成される。さらに、それらの塩は、無機塩基または有機塩基を上記遊離酸に添加することから調製され得る。無機塩基から得られる塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩が挙げられるが、これらに限定されない。有機塩基から得られる塩としては、一級、二級、および三級アミン、置換されたアミン（天然に存在する置換されたアミンを含む）、環式アミンおよび塩基性イオン交換樹脂（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノ

40

50

ールアミン、リジン、アルギニン、N - エチルピペリジン、ピペリジン、ポリアミン樹脂)の塩が挙げられるが、これらに限定されない。

【0084】

オリゴヌクレオチド107は、UBE3A pre-mRNAまたはmRNA転写物のヌクレアーゼ媒介性分解を媒介または促進し得る。ヌクレアーゼ媒介性分解とは、相補的なヌクレオチド配列と二重鎖を形成する場合に、このような相補的なヌクレオチド配列の分解を媒介し得るオリゴヌクレオチドに言及する。いくつかの実施形態において、上記オリゴヌクレオチドは、本発明のオリゴヌクレオチドが、ヌクレアーゼ、特にエンドヌクレアーゼ、好ましくはエンドリボヌクレアーゼ(RNase)(例えば、RNase H)を動員し得る場合、標的核酸のヌクレアーゼ媒介性分解を介して機能し得る。ヌクレアーゼ媒介性機序を介して機能するオリゴヌクレオチド設計の例は、少なくとも5個または6個連続したDNAヌクレオシドの領域を代表的には含み、親和性増強ヌクレオシドによって一方の側または両側に隣接されるオリゴヌクレオチド(例えば、ギャップマー)である。アンチセンスオリゴヌクレオチド107のRNase H活性は、相補的RNA分子との二重鎖にある場合に、RNase Hを動員するその能力に言及する。

10

【0085】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド107、またはその連続したヌクレオチド配列は、ギャップマー(ギャップマーオリゴヌクレオチドまたはギャップマー設計ともいわれる)であり得る。アンチセンスギャップマーは、一般に、RNase H媒介性分解を介して標的核酸を阻害するために使用される。ギャップマーオリゴヌクレオチドは、少なくとも3個の別個の構造的領域、5' - 3'配向において5' - 隣接、ギャップ、および3' - 隣接、F - G - F'を含む。「ギャップ」領域(G)は、上記オリゴヌクレオチドがRNase Hを動員し得る連続したDNAヌクレオチドのストレッチを含む。上記ギャップ領域は、1またはこれより多くの糖改変されたヌクレオシド(有利なことには、高親和性糖改変ヌクレオシド)を含む5'隣接領域(F)および1またはこれより多くの糖改変されたヌクレオシド(有利なことには、高親和性糖改変ヌクレオシド)を含む3'隣接領域(F')によって隣接されている。領域FおよびF'における上記1またはこれより多くの糖改変されたヌクレオシドは、上記標的核酸に対するオリゴヌクレオチドの親和性を増強する(すなわち、親和性増強糖改変ヌクレオシドである)。いくつかの実施形態において、領域FおよびF'における上記1またはこれより多くの糖改変されたヌクレオシドは、2'糖改変されたヌクレオシド(例えば、高親和性2'糖改変)である(例えば、LNAおよび2' - MOEから独立して選択される)。

20

30

【0086】

混合ウイングギャップマーは、領域FおよびF'のうち的一方または両方が、2'置換されたヌクレオシド(例えば、2' - O - アルキル - RNAユニット、2' - O - メチル - RNA、2' - アミノ - DNAユニット、2' - フルオロ - DNA ユニット、2' - アルコキシ - RNA、2' - MOEユニット、アラビノ核酸(ANA)ユニット、2' - フルオロ - ANAユニット、またはこれらの組み合わせからなる群より独立して選択される2'置換されたヌクレオシド)を含むLNAギャップマーである。領域FおよびF'のうち少なくとも一方、または領域FおよびF'の両方が少なくとも1個のLNAヌクレオシドを含むいくつかの実施形態において、領域FおよびF'の残りのヌクレオシドは、2' - MOEおよびLNAからなる群より独立して選択される。領域FおよびF'のうち少なくとも一方、または領域FおよびF'の両方が少なくとも2個のLNAヌクレオシドを含むいくつかの実施形態において、領域FおよびF'の残りのヌクレオシドは、2' - MOEおよびLNAからなる群より独立して選択される。いくつかの混合ウイングの実施形態において、領域FおよびF'のうち的一方または両方は、1またはこれより多くのDNAヌクレオシドをさらに含み得る。ギャップマー設計は、WO 2008/049085およびWO 2012/109395(ともに参考として援用される)において考察されている。

40

【0087】

表2は、本明細書で開示されるとおりの改変された塩基および他の改変を組み込む本発

50

明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの例を示す。説明されるように、多くの非標準的核酸モノマーが、注文オリゴヌクレオチド製造供給元から市販されており、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドへと容易に組み込まれる。これらのモノマーユニットは、例えば、Integrated DNA Technologies (Iowa, US) によって示されるように、非標準的モノマーユニットを示す周知のオリゴヌクレオチド合成命名法を使用して記載される。例えば、表 2 に提供される配列において、非標準的モノマーユニットは、前方のスラッシュ「/」において囲まれ、ユニット間のアスタリスク「*」は、PS 連結を示す一方で、アスタリスクがないものは、PO 連結を示す。表 2 はまた、上記 ASO の配列番号を提供する。

【表 2 - 1】

10

表 2: 変更されたヌクレオチドおよび連結を有する本発明の例示的 ASO。	
配列番号	変更を示す配列
配列番号 1	/52MOErT*/i2MOErC*/i2MOErA*/i2MOErT/*T*T*/iMe-dC*/iMe-dC/*A*/iMe-dC/*A*G*/iMe-dC*/iMe-dC*/iMe-dC/*T*/i2MOErC*/i2MOErA*/i2MOErG*/32MOErT/

20

30

40

50

【表 2 - 2】

配列番号 2	/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*A*G*iMe-dC/*A*G*G*A*G*T*T*G*T*/i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErG/*32MOErG/
配列番号 3	/52MOErG/*i2MOErA/*i2MOErT/*i2MOErT/*T*iMe-dC/*A*G*T*T*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErG/*32MOErT/
配列番号 4	/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*T*A*G*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*A*G*i2MOErA/*i2MOErA/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 5	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*iMe-dC/*T*G*A*G*T*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*T*T*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*32MOErT/
配列番号 6	/52MOErG/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErA/*G*iMe-dC/*T*A*T*iMe-dC/*A*iMe-dC/*iMe-dC/*T*A*T*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*32MOErT/
配列番号 7	/52MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErT/*T*G*T*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*T*G*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErC/*32MOErT/
配列番号 8	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErA/*T*iMe-dC/*T*G*G*T*G*T*A*G*A*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*32MOErT/
配列番号 9	/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*iMe-dC/*T*A*iMe-dC/*A*T*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*32MOErC/
配列番号 10	/52MOErT/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*T*G*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErC/
配列番号 11	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*T*G*G*G*iMe-dC/*T*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*A*T*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT/*32MOErC/
配列番号 12	/52MOErA/*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*iMe-dC/*T*T*G*T*T*T*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*32MOErC/
配列番号 13	/52MOErA/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*A*G*T*T*iMe-dC/*A*G*T*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErG/*32MOErG/
配列番号 14	/52MOErA/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*iMe-dC/*A*T*T*iMe-dC/*A*G*T*G*G*T*T*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT/*32MOErT/
配列番号 15	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErT/*T*iMe-dC/*A*A*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*T*G*T*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*32MOErG/
配列番号 16	/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT/*iMe-dC/*A*A*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*G*T*T*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErC/

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

配列番号 17	/52MOErA/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErT/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*iMe-dC/*A*A*iMe-dC/*iMe-dC/*A*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i32MOErG/
配列番号 18	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*G*A*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*T*A*iMe-dC/*T*A*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/*i32MOErC/
配列番号 19	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*A*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*A*T*A*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*i32MOErC/
配列番号 20	/52MOErG/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErT/*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*G*T*A*T*A*G*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*i32MOErC/
配列番号 21	/52MOErA/*i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErC/*T*T*T*T*iMe-dC/*T*G*T*T*iMe-dC/*A*T*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*i32MOErT/
配列番号 22	/52MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErG/*T*G*iMe-dC/*T*iMe-dC/*T*G*T*iMe-dC/*T*G*T*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i32MOErC/
配列番号 23	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*iMe-dC/*A*G*G*T*G*iMe-dC/*T*iMe-dC/*T*G*T*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*i32MOErT/
配列番号 24	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErA/*G*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*iMe-dC/*A*G*i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErG/*i32MOErC/
配列番号 25	/52MOErA/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErC/*T*T*T*iMe-dC/*T*G*T*G*T*iMe-dC/*T*G*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErC/*i32MOErC/
配列番号 26	/52MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErC/*iMe-dC/*T*T*T*T*G*T*A*iMe-dC/*T*G*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*i32MOErC/
配列番号 27	/52MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*A*G*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*iMe-dC/*A*T*G*T*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i32MOErA/
配列番号 28	/52MOErG/*i2MOErA/*i2MOErA/*i2MOErA/*T*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*T*G*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i32MOErC/
配列番号 29	/52MOErA/*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErC/*T*iMe-dC/*A*A*iMe-dC/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*A*A*G*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErT/*i32MOErA/
配列番号 30	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*G*A*G*T*A*G*T*T*iMe-dC/*T*G*T*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErG/*i32MOErT/
配列番号 31	/52MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT/*i2MOErT/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*A*T*T*T*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*i32MOErC/

10

20

30

40

【表 2 - 4】

配列番号 32	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*G*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*iMe-dC/*A*T*A*T*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErT/*32MOErA/
配列番号 33	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*A*A*A*T*G*iMe-dC/*A*iMe-dC/*T*T*T*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 34	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*A*G*T*A*G*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*T*T*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErT/*32MOErC/
配列番号 35	/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT/*T*iMe-dC/*A*T*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*G*T*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErC/
配列番号 36	/52MOErA/*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErC/*A*iMe-dC/*A*A*G*iMe-dC/*T*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*A*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT/*32MOErT/
配列番号 37	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT/*T*G*T*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*T*T*T*T*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*32MOErC/
配列番号 38	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*A*T*G*T*T*A*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*A*T*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 39	/52MOErG/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*iMe-dC/*T*T*T*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*A*A*G*G*i2MOErT/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErC/
配列番号 40	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*A*G*T*G*G*A*T*G*A*G*A*A*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*32MOErT/
配列番号 41	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*G*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*T*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 42	/52MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErA/*iMe-dC/*T*G*G*G*T*G*A*G*A*G*T*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErC/
配列番号 43	/52MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErT/*T*A*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*G*G*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErA/*32MOErT/
配列番号 44	/52MOErT/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*T*T*A*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*G*G*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 45	/52MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErT/*iMe-dC/*T*T*A*iMe-dC/*iMe-dC/*G*G*iMe-dC/*T*T*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*32MOErC/
配列番号 46	/52MOErT/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErC/*T*T*T*iMe-dC/*T*G*T*G*T*iMe-dC/*T*G*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErC/*32MOErC/

10

20

30

40

【表 2 - 5】

配列番号 47	/52MOErA/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*T*T*T*T*iMe-dC/*A*T*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*32MOErT/
配列番号 48	/52MOErA/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*A*iMe-dC/*T*G*G*G*T*G*A*G*A*G*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErT/*32MOErC/
配列番号 49	/52MOErT/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*T*T*T*iMe-dC/*A*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErT/*32MOErG/
配列番号 50	/52MOErA/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErT/*T*A*iMe-dC/*T*G*G*G*T*G*A*G*A*i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErT/
配列番号 51	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErA/*i2MOErT/*32MOErC/
配列番号 52	/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*iMe-dC/*A*iMe-dC/*A*iMe-dC/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*T*G*A*iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErT/
配列番号 53	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErT/*G*G*T*G*G*G*iMe-dC/*T*G*G*G*A*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 54	/52MOErA/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*A*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*A*G*T*T*iMe-dC/*T*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*32MOErT/
配列番号 55	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*G*G*iMe-dC/*T*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*32MOErT/
配列番号 56	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*G*G*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*G*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErC/*32MOErT/
配列番号 57	/52MOErT/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErC/*A*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*A*iMe-dC/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErT/
配列番号 58	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*G*iMe-dC/*A*iMe-dC/*T*A*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErT/*32MOErA/
配列番号 59	/52MOErA/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*32MOErT/
配列番号 60	/52MOErG/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErT/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*T*iMe-dC/*T*iMe-dC/*T*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErT/
配列番号 61	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*T*G*A*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*G*A*G*T*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErC/

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

配列番号 62	/52MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErC/*iMe-dC/*T*A*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*G*G*T*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 63	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*T*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErT/
配列番号 64	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErC/*A*A*iMe-dC/*T*iMe-dC/*T*iMe-dC/*A*G*G*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*32MOErT/
配列番号 65	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErG/*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*32MOErG/
配列番号 66	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*A*G*A*T*i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 67	/52MOErG/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErA/*iMe-dC/*A*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*G*T*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 68	/52MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*A*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErT/
配列番号 69	/52MOErT/*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErG/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*G*T*G*T*iMe-dC/*T*G*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErA/*32MOErG/
配列番号 70	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*T*G*A*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 71	/52MOErG/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*A*G*G*A*G*T*iMe-dC/*T*T*T*iMe-dC/*A*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*32MOErT/
配列番号 72	/52MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/*A*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*iMe-dC/*T*G*T*G*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErC/
配列番号 73	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErT/*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*A*G*T*T*G*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErC/
配列番号 74	/52MOErG/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErT/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*A*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*T*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*32MOErC/
配列番号 75	/52MOErA/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErA/*G*iMe-dC/*A*G*G*G*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErG/*32MOErA/
配列番号 76	/52MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/*iMe-dC/*A*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*32MOErC/

10

20

30

40

【表 2 - 7】

配列番号 77	/52MOErG/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErT/*iMe-dC/*T*A*iMe-dC/*A*iMe-dC/*T*G*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 78	/52MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*A*T*T*A*G*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*A*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErT/
配列番号 79	/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*A*A*iMe-dC/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*T*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErA/
配列番号 80	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*A*T*iMe-dC/*T*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*T*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*32MOErT/
配列番号 101	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErG/*G*G*A*T*G*A*G*G*A*T*iMe-dC/*A*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErA/
配列番号 102	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*G*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*iMe-dC/*T*T*G*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErG/
配列番号 103	/52MOErT/*i2MOErA/*i2MOErT/*i2MOErC/*T*iMe-dC/*A*G*A*G*iMe-dC/*A*G*G*A*G*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*32MOErT/
配列番号 104	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*T*G*T*A*iMe-dC/*iMe-dC/*A*A*T*G*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErA/*32MOErG/
配列番号 105	/52MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErA/*A*iMe-dC/*A*T*G*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*T*T*T*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErC/
配列番号 106	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*T*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*A*T*A*T*T*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErG/
配列番号 107	/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*T*T*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*G*G*G*iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 108	/52MOErG/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*iMe-dC/*T*G*A*A*A*T*G*T*iMe-dC/*T*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT/*32MOErC/
配列番号 109	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*iMe-dC/*T*A*iMe-dC/*A*T*T*T*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErA/*32MOErT/
配列番号 110	/52MOErC/*i2MOErT/*i2MOErA/*i2MOErG/*A*A*iMe-dC/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*A*T*T*iMe-dC/*A*G*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErG/*32MOErT/
配列番号 111	/52MOErG/*i2MOErA/*i2MOErT/*i2MOErT/*iMe-dC/*A*A*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*T*G*T*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*32MOErA/

10

20

30

40

50

【表 2 - 8】

配列番号 112	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*A*T*A/iMe-dC/*A*A/iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*T*T*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*32MOErC/
配列番号 113	/52MOErC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*A/iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*T*A/iMe-dC/*T*A*T*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 114	/52MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*iMe-dC/*A*G*A*A/iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*A*i2MOErA/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 115	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErA/*A/iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*iMe-dC/*T*G*T*G*T*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*32MOErG/
配列番号 116	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*T*T*iMe-dC/*A*A/iMe-dC/*A*A*T*iMe-dC/*T*iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErT/*32MOErT/
配列番号 117	/52MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErT/*T*T*T*G*T*A/iMe-dC/*T*G*G*G*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErA/*32MOErC/
配列番号 118	/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErG/*iMe-dC/*T*G*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErA/*32MOErT/
配列番号 119	/52MOErA/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErT/*G*iMe-dC/*T*G*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 120	/52MOErC/*i2MOErT/*i2MOErA/*i2MOErA/*A*G*T*T*iMe-dC/*T*G*A*G*G*G/iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 121	/52MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT/*i2MOErA/*iMe-dC/*T*G*T*G*G/iMe-dC/*A*T*G*A*G*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErG/*32MOErT/
配列番号 122	/52MOErG/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErT/*A/iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*T*T*iMe-dC/*A*T*T*T*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErC/*32MOErC/
配列番号 123	/52MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT/*i2MOErT/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*G*T*iMe-dC/*A*G*iMe-dC/*T*i2MOErT/*i2MOErA/*i2MOErC/*32MOErT/
配列番号 124	/52MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErC/*A*A*G*G/iMe-dC/*A*iMe-dC/*A*A*G*iMe-dC/*T*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*32MOErC/
配列番号 125	/52MOErA/*i2MOErA/*i2MOErA/*i2MOErG/*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*A*T*T*T*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErC/*32MOErC/
配列番号 126	/52MOErA/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*T*G*T*T*iMe-dC/*T*A*A*A*G*G/iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErG/*i2MOErG/*32MOErC/

10

20

30

40

50

【表 2 - 9】

配列番号 127	/52MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*i2MOErA/*iMe-dC/*A*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*A*G*G*i2MOErG/*i2MOErC/*i2MOErC/*32MOErT/
配列番号 128	/52MOErA/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErG/*A*iMe-dC/*A*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*A*G*G*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErC/*32MOErC/
配列番号 129	/52MOErC/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErA/*G*A*iMe-dC/*A*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*A*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErG/*32MOErC/
配列番号 130	/52MOErG/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErT/*iMe-dC/*A*G*G*G*A*T*G*G*G*iMe-dC/*T*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*32MOErC/
配列番号 131	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErC/*T*iMe-dC/*A*G*G*G*A*T*G*G*G*iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErT/*32MOErT/
配列番号 132	/52MOErT/*i2MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*iMe-dC/*T*iMe-dC/*A*G*G*G*A*T*G*G*G*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErT/
配列番号 133	/52MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*i2MOErC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*T*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErT/
配列番号 134	/52MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*i2MOErC/*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErT/*i2MOErT/*32MOErC/
配列番号 135	/52MOErA/*i2MOErC/*i2MOErA/*i2MOErT/*A*iMe-dC/*T*G*T*G*G*iMe-dC/*A*T*G*A*i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErT/*32MOErG/
配列番号 136	/52MOErC/*i2MOErA/*i2MOErA/*i2MOErT/*iMe-dC/*A*G*A*G*T*A*A*A*iMe-dC/*T*G*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErC/*32MOErC/
配列番号 137	/52MOErG/*i2MOErA/*i2MOErC/*i2MOErA/*G*G*A*A*G*iMe-dC/*A*iMe-dC/*A*A*A*A*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErC/*32MOErA/
配列番号 138	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErC/*A*A*G*T*G*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*A*T*iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErA/*i2MOErT/*32MOErG/
配列番号 139	/52MOErT/*i2MOErA/*i2MOErA/*i2MOErA/*T*A*G*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*A*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*i2MOErG/*i2MOErT/*i2MOErA/*32MOErC/
配列番号 140	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErT/*T*iMe-dC/*A*A*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*T*G*T*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*32MOErG/
配列番号 141	/52MOErG/*i2MOErG/*i2MOErA/*i2MOErT/*T*iMe-dC/*A*A*iMe-dC/*T*G*iMe-dC/*T*G*T*iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErT/*i2MOErT/*32MOErG/

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 0】

配列番号 142	/52MOErG/*i2MOErG/i2MOErA/ i2MOErT/T*Me-dC/*A*A*/iMe-dC/*T*G*/iMe-dC/*T*G*T*/iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErT/i2MOErT*/32MOErG/
配列番号 143	/52MOErA/*i2MOErA/i2MOErC/ i2MOErC/*T*T*T*/iMe-dC/*T*G*T*G*T*/iMe-dC/*T*G*/i2MOErG/i2MOErG/i2MOErC*/32MOErC/
配列番号 144	/52MOErA/i2MOErA/i2MOErC/*i2MOErC/*T*T*T*/iMe-dC/*T*G*T*G*T*/iMe-dC/*T*G*/i2MOErG/i2MOErG/i2MOErC*/32MOErC/
配列番号 145	/52MOErA/*i2MOErA/i2MOErC/ i2MOErC/T*T*T*/iMe-dC/*T*G*T*G*T*/iMe-dC/*T*G*/i2MOErG/i2MOErG/i2MOErC*/32MOErC/
配列番号 146	/52MOErG/*i2MOErC/i2MOErT/ i2MOErT/*G*/iMe-dC/*T*/iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*/iMe-dC/*T*T*G*/i2MOErG/i2MOErA/i2MOErG*/32MOErG/
配列番号 147	/52MOErG/i2MOErC/i2MOErT/ i2MOErT/*G*/iMe-dC/*T*/iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*/iMe-dC/*T*T*G*/i2MOErG/*i2MOErA/i2MOErG*/32MOErG/
配列番号 148	/52MOErG/*i2MOErC/i2MOErT/ i2MOErT/G*/iMe-dC/*T*/iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*/iMe-dC/*T*T*G*/i2MOErG/*i2MOErA/i2MOErG*/32MOErG/
配列番号 149	/52MOErG/i2MOErG/i2MOErT/*i2MOErA/*A*/iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*/iMe-dC/*T*G*T*G*T*/i2MOErC/i2MOErT/i2MOErG*/32MOErG/
配列番号 150	/52MOErG/*i2MOErG/i2MOErT/ i2MOErA/*A*/iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*/iMe-dC/*T*G*T*G*T*/i2MOErC/*i2MOErT/i2MOErG*/32MOErG/
配列番号 151	/52MOErG/*i2MOErG/i2MOErT/ i2MOErA/A*/iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*/iMe-dC/*T*G*T*G*T*/i2MOErC/i2MOErT/i2MOErG*/32MOErG/
配列番号 152	/52MOErG/*i2MOErG/i2MOErC/ i2MOErC/*T*T*/iMe-dC/*A*A*/iMe-dC/*A*A*T*/iMe-dC/*T*/iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErC/ i2MOErT*/32MOErT/
配列番号 153	/52MOErG/*i2MOErG/i2MOErC/ i2MOErC/*T*T*/iMe-dC/*A*A*/iMe-dC/*A*A*T*/iMe-dC/*T*/iMe-dC/*i2MOErT/i2MOErC/ i2MOErT*/32MOErT/
配列番号 154	/52MOErG/*i2MOErG/i2MOErC/ i2MOErC/T*T*/iMe-dC/*A*A*/iMe-dC/*A*A*T*/iMe-dC/*T*/iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErC/ i2MOErT*/32MOErT/
配列番号 155	52MOErG/*i2MOErC/i2MOErA/ i2MOErA/*T*/iMe-dC/*T*G*G*T*G*T*A*G*A*/iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErC/i2MOErT*/32MOErT/
配列番号 156	/52MOErG/*i2MOErC/i2MOErA/ i2MOErA/*T*/iMe-dC/*T*G*G*T*G*T*A*G*A*/iMe-dC/*i2MOErC/i2MOErC/i2MOErT*/32MOErT/

10

20

30

40

【表 2 - 1 1】

配列番号 157	/52MOErG//i2MOErC//i2MOErA/ /i2MOErA/*T*/iMe-dC/*T*G*G*T*G*T*A*G*A*/iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErC//i2MOErT*/32MOErT/
配列番号 158	/52MOErG/*i2MOErG//i2MOErG/ /i2MOErA/*T*G*G*G*/iMe-dC/*T*/iMe-dC/*T*T*/iMe-dC/*A*T*/i2MOErC/*i2MOErA//i2MOErT*/32MOErC/
配列番号 159	/52MOErG/*i2MOErG//i2MOErG/ /i2MOErA/*T*G*G*G*/iMe-dC/*T*/iMe-dC/*T*T*/iMe-dC/*A*T*/i2MOErC//i2MOErA//i2MOErT*/32MOErC/
配列番号 160	/52MOErG//i2MOErG/*i2MOErG/ /i2MOErA/*T*G*G*G*/iMe-dC/*T*/iMe-dC/*T*T*/iMe-dC/*A*T*/i2MOErC/*i2MOErA//i2MOErT*/32MOErC/
配列番号 161	/52MOErA/*i2MOErC//i2MOErC/ /i2MOErA/*A*G*T*T*/iMe-dC/*A*G*T*T*T*/iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErG//i2MOErG*/32MOErG/
配列番号 162	/52MOErA/*i2MOErC//i2MOErC/ /i2MOErA/*A*G*T*T*/iMe-dC/*A*G*T*T*T*/iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErA//i2MOErG//i2MOErG*/32MOErG/
配列番号 163	/52MOErA//i2MOErC//i2MOErC/*i2MOErA/*A*G*T*T*/iMe-dC/*A*G*T*T*T*/iMe-dC/*iMe-dC/*i2MOErA/*i2MOErG//i2MOErG*/32MOErG/
配列番号 164	/52MOErG/*i2MOErG//i2MOErA/ /i2MOErT/*T*/iMe-dC/*A*A*/iMe-dC/*T*G*/iMe-dC/*T*G*T*/iMe-dC/*i2MOErC/*i2MOErT/ /i2MOErT*/32MOErG/
配列番号 165	/52MOErG//i2MOErG//i2MOErA/*i2MOErT/*T*/iMe-dC/*A*A*/iMe-dC/*T*G*/iMe-dC/*T*G*T*/iMe-dC/*i2MOErC//i2MOErT//i2MOErT*/32MOErG/
配列番号 166	/52MOErA/*i2MOErT//i2MOErT/ /i2MOErT/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*/iMe-dC/*iMe-dC/*A*/iMe-dC/*A*A*/iMe-dC/*iMe-dC/*A*/i2MOErG/*i2MOErC/ /i2MOErT*/32MOErG/
配列番号 167	/52MOErA/*i2MOErT//i2MOErT/ /i2MOErT/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*/iMe-dC/*iMe-dC/*A*/iMe-dC/*A*A*/iMe-dC/*iMe-dC/*A*/i2MOErG//i2MOErC/ /i2MOErT*/32MOErG/
配列番号 168	/52MOErA//i2MOErT//i2MOErT/*i2MOErT/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*/iMe-dC/*iMe-dC/*A*/iMe-dC/*A*A*/iMe-dC/*iMe-dC/*A*/i2MOErG/*i2MOErC/ /i2MOErT*/32MOErG/
配列番号 169	/52MOErC/*i2MOErA//i2MOErG/ /i2MOErC/*iMe-dC/*T*T*T*T*T*G*T*A*/iMe-dC/*T*G*/i2MOErG/*i2MOErG//i2MOErA*/32MOErC/
配列番号 170	/52MOErC//i2MOErA//i2MOErG/*i2MOErC/*iMe-dC/*T*T*T*T*T*G*T*A*/iMe-dC/*T*G*/i2MOErG//i2MOErG//i2MOErA*/32MOErC/
配列番号 171	/52MOErC/*i2MOErA//i2MOErG/ /i2MOErC/*iMe-dC/*T*T*T*T*T*G*T*A*/iMe-dC/*T*G*/i2MOErG//i2MOErG//i2MOErA*/32MOErC/

10

20

30

40

【表 2 - 1 2】

配列番号 172	/52MOErG/*i2MOErC/i2MOErT/ i2MOErT/*G*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*iMe-dC/*T*T*G*i2MOErG/*i2MOErA/i2MOErG/*32MOErG/
配列番号 173	/52MOErG/i2MOErC/*i2MOErT/ i2MOErT/*G*iMe-dC/*T*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*iMe-dC/*T*T*G*i2MOErG/*i2MOErA/i2MOErG/*32MOErG/
配列番号 174	/52MOErG/*i2MOErC/i2MOErC/ i2MOErA/*T*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*A*T*A*T*T*i2MOErC/i2MOErA/i2MOErG/*32MOErG/
配列番号 175	/52MOErG/i2MOErC/i2MOErC/*i2MOErA/*T*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*A*T*A*T*T*i2MOErC/i2MOErA/i2MOErG/*32MOErG/
配列番号 176	/52MOErG/*i2MOErC/i2MOErC/ i2MOErA/*T*T*T*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*A*T*A*T*T*i2MOErC/i2MOErA/ i2MOErG/*32MOErG/
配列番号 177	/52MOErG/i2MOErG/*i2MOErC/ i2MOErC/*T*T*iMe-dC/*A*A*iMe-dC/*A*A*T*iMe-dC/*T*iMe-dC/*i2MOErT/*i2MOErC/ i2MOErT/*32MOErT/
配列番号 178	/52MOErG/*i2MOErC/i2MOErC/ i2MOErT/*T*T*T*T*G*T*A*C*T*G*G*G/i2MOErA/*i2MOErC/i2MOErA/*32MOErC/
配列番号 179	/52MOErG/i2MOErC/*i2MOErC/ i2MOErT/*T*T*T*T*G*T*A*C*T*G*G*G/i2MOErA/*i2MOErC/i2MOErA/*32MOErC/
配列番号 180	/52MOErG/*i2MOErC/i2MOErC/ i2MOErT/*T*T*T*T*G*T*A*C*T*G*G*G/i2MOErA/i2MOErC/i2MOErA/*32MOErC/
配列番号 181	/52MOErG/*i2MOErA/i2MOErC/ i2MOErT/*A*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*T*T*iMe-dC/*A*T*T*T*i2MOErG/*i2MOErG/i2MOErC/*32MOErC/
配列番号 182	/52MOErG/i2MOErA/*i2MOErC/ i2MOErT/*A*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*T*T*iMe-dC/*A*T*T*T*i2MOErG/*i2MOErG/i2MOErC/*32MOErC/
配列番号 183	/52MOErG/*i2MOErA/i2MOErC/ i2MOErT/*A*iMe-dC/*iMe-dC/*A*T*T*T*iMe-dC/*A*T*T*T*i2MOErG/i2MOErG/i2MOErC/*32MOErC/
配列番号 204	52MOErC/*i2MOErC/i2MOErT/ i2MOErT/*T*iMe-dC/*T*T*G*G*A*G*G*G*A*T/i2MOErG/*i2MOErA/i2MOErG/*32MOErG/
配列番号 205	/52MOErC/*i2MOErC/i2MOErT/ i2MOErT/*T*iMe-dC/*T*T*G*G*A*G*G*G*A*T/i2MOErG/i2MOErA/i2MOErG/*32MOErG/
配列番号 206	/52MOErC/*i2MOErC/i2MOErT/ i2MOErT/*T*iMe-dC/*T*T*G*G*A*G*G*G*A*T/i2MOErG/*i2MOErA/i2MOErG/*32MOErG/

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 3】

配列番号 207	/52MOErA/*i2MOErC/i2MOErA/ i2MOErG/*G*T*G*/iMe-dC/*T*iMe-dC/*T*G*T*/iMe-dC/*T*G*/i2MOErT/*i2MOErG//i2MOErC/*/32MOErC/
配列番号 208	52MOErA/*i2MOErC/i2MOErA/ i2MOErG/*G*T*G*/iMe-dC/*T*iMe-dC/*T*G*T*/iMe-dC/*T*G*/i2MOErT//i2MOErG//i2MOErC/*/32MOErC/
配列番号 209	/52MOErA/*i2MOErC/i2MOErA/ i2MOErG/*G*T*G*/iMe-dC/*T*iMe-dC/*T*G*T*/iMe-dC/*T*G*/i2MOErT/*i2MOErG//i2MOErC/*/32MOErC
配列番号 210	/52MOErA/*i2MOErC/i2MOErC/ i2MOErT/*T*T*/iMe-dC/*T*G*T*G*T*/iMe-dC/*T*G*G*/i2MOErG//i2MOErC//i2MOErC/*/32MOErA/
配列番号 211	/52MOErA/*i2MOErC/i2MOErC/ i2MOErT/*T*T*/iMe-dC/*T*G*T*G*T*/iMe-dC/*T*G*G*/i2MOErG/*i2MOErC//i2MOErC/*/32MOErA/
配列番号 212	/52MOErA/*i2MOErC/i2MOErC/ i2MOErT/T*T*/iMe-dC/*T*G*T*G*T*/iMe-dC/*T*G*G*/i2MOErG/*i2MOErC//i2MOErC/*/32MOErA/
配列番号 213	/52MOErA/*i2MOErC/i2MOErA/ i2MOErG/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*T*G*T*A*/iMe-dC/*T*/i2MOErG//i2MOErG//i2MOErG/*/32MOErA/
配列番号 214	/52MOErA/*i2MOErC/i2MOErA/ i2MOErG/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*T*G*T*A*/iMe-dC/*T*/i2MOErG/*i2MOErG//i2MOErG/*/32MOErA/
配列番号 215	/52MOErA/*i2MOErC/i2MOErA/ i2MOErG//iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*T*G*T*A*/iMe-dC/*T*/i2MOErG/*i2MOErG//i2MOErG/*/32MOErA/
配列番号 216	/52MOErG/*i2MOErC/i2MOErA/ i2MOErC/*T*T*T*/iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*T*A*A*/i2MOErA//i2MOErC//i2MOErT/*/32MOErT/
配列番号 217	/52MOErG/*i2MOErC/i2MOErA/ i2MOErC/*T*T*T*/iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*T*A*A*/i2MOErA//i2MOErC//i2MOErT/*/32MOErT/
配列番号 218	/52MOErG/*i2MOErC/i2MOErA/ i2MOErC/T*T*T*/iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*iMe-dC/*A*G*T*A*A*/i2MOErA//i2MOErC//i2MOErT/*/32MOErT/
配列番号 219	/52MOErA/*i2MOErC/i2MOErA/*i2MOErG/*iMe-dC/*iMe-dC/*T*T*T*T*G*T*A*/iMe-dC/*T*/i2MOErG/*i2MOErG//i2MOErG/*/32MOErA/
<p>モノマー略語 52MOEr = 5' 2'-O-メトキシエチルRNA 32MOEr = 3' 2'-O-メトキシエチルRNA i2MOEr = 内部 2'-O-メトキシエチルRNA iMe-dC = 5-メチルデオキシシチジン * = PS連結 // = PO連結 (非PS連結)</p>	

10

20

30

40

【 0 0 8 8 】

1 またはこれより多くの非ヌクレオチド部分へのオリゴヌクレオチド 107 の結合体化は、上記オリゴヌクレオチドの薬理学を、例えば、上記オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、細胞取り込みまたは安定性に影響を及ぼすことによって改善し得る。いくつかの実施形態において、上記結合体部分は、上記オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を、上記オリゴヌクレオチドの細胞分布、バイオアベイラビリティ、代謝、排出、透過性、および/または細胞取り込みを改善することによって改変または増強し得る。特に、上記結合体は、上記オリゴヌクレオチドを特異的器官、組織または細胞タイプを標的にし得、それによって、その器官、組織または細胞タイプにおける上記オリゴヌクレオチドの有効性を増

50

強し得る。上記結合体はまた、非標的細胞タイプ、組織もしくは器官における上記オリゴヌクレオチドの活性、例えば、オフターゲット活性または非標的細胞タイプ、組織もしくは器官における活性を低減するように働き得る。

【0089】

一実施形態において、上記非ヌクレオチド部分（結合体部分）は、炭水化物、細胞表面レセプターリガンド、薬物物質、ホルモン、親油性物質、ポリマー、タンパク質、ペプチド、毒素（例えば、細菌毒素）、ビタミン、ウイルスタンパク質（例えば、キャプシド）またはこれらの組み合わせからなる群より選択される。

【0090】

本開示のオリゴヌクレオチド107は、前述のオリゴヌクレオチドおよび/またはそのオリゴヌクレオチド結合体もしくは塩のうちいずれか、ならびに薬学的に受容可能な希釈剤、キャリア、塩および/またはアジュバントを含む薬学的組成物において提供され得る。薬学的に受容可能な希釈剤としては、ACSF（人工脳脊髄液）が挙げられ、薬学的に受容可能な塩としては、ナトリウム塩およびカリウム塩が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、上記薬学的に受容可能な希釈剤は、滅菌リン酸緩衝化生理食塩水または滅菌炭酸ナトリウム緩衝液である。いくつかの好ましい実施形態において、臨床適用のための希釈剤としては、Elliotts B溶液および/またはACSF（人工脳脊髄液）が挙げられる。

【0091】

いくつかの実施形態において、本発明のオリゴヌクレオチドは、薬学的に受容可能な希釈剤中の溶液の形態にある（例えば、PBSまたは炭酸ナトリウム緩衝液中に溶解される）。上記オリゴヌクレオチドは、上記溶液中にあらかじめ製剤化されていてもよいし、いくつかの実施形態においては、投与前に薬学的に受容可能な希釈剤中に溶解され得る乾燥粉末（例えば、凍結乾燥粉末）の形態にあってもよい。適切には、例えば、上記オリゴヌクレオチドは、0.1~100mg/mLの濃度（例えば、1~10mg/mL）において溶解され得る。

【実施例】

【0092】

実施例

以下の実施例は、本発明のASOをスクリーニングするための例示的方法を提供する。実施例において、一連のASOをスクリーニングした。得られたデータに基づいて、配列番号146、155、156、158、159、161、164、169、174、175、178、179、213、および214に相当するASOを、用量応答有効性、配列モチーフ責任、およびオフターゲットアラインメント分析に基づいてリード候補ASOとして特定した。それらのASOは、最大のインビトロ有効性、最低のオフターゲットアラインメント、および制限された配列モチーフの懸念を示した。しかし、本明細書で記載されるとおりの他のASOはまた、種々の条件の処置に対してUBE3Aをロックダウンするために記載されるように機能する。

【0093】

実施例1 UBE3A ASOの単一用量スクリーニング

40のUBE3A標的化ASO（配列番号1~40）を、初代線維芽細胞（96ウェルプレートのウェルあたり10kをプレート）を200nMのASOで処理することによってインビトロでスクリーニングした。ASOを、96ウェルプレートのウェルあたり0.5μLでRNAi Maxを使用するトランスフェクションによって送達した。

【0094】

図3に示されるデータは、ビヒクルに対してASO処理線維芽細胞の正規化した相対的UBE3A転写物発現のqPCRデータである。全てのサンプルを、第2のビヒクル条件に対して正規化した。細胞のみの条件（白）は、UBE3A発現の変化を示さない。UBE3A siRNAを陽性コントロールとして使用したところ、UBE3A転写物の-80%ロックダウンを示す。非標的化siRNAを陰性コントロールとして使用したところ

10

20

30

40

50

、UBE3Aのノックダウンを示さない。上のグラフは、UBE3A ASOs 001 - 020 (配列番号1~20)のデータを示す。下のグラフは、UBE3A ASOs 021 - 040 (配列番号21~40)のデータを示す。

【0095】

全ての細胞を、プレートして48時間後にASOでトランスフェクトした。細胞を、ASOトランスフェクションのさらに48時間後に、qPCRのために採取した。アクチンを、UBE3Aに対する正規化遺伝子として使用した。各バーは、3つの技術的複製および1つの生物学的複製を表す。ある特定のバーの上にあるドットは、40のASOのこのセット内で特定された好ましいASOを示し、配列番号4、7、8、14、17、18、21、26、34、および35に相当する。

10

【0096】

図4は、各々6つの濃度において、本開示の実施形態(上記ASO全体を通じて2'-O改変されたRNAおよびホスホロチオエート連結を有するRNAウイングが連結した約10~12個の塩基DNAの中心的領域を有する約20個の塩基の長さ)に従って設計された10のASO候補(配列番号14、17、4、7、8、18、21、26、34、および35)の用量応答を示す結果を提供する。全10個のASOは、用量依存性様式においてコントロールと比較してUBE3A発現を減少させた(ビヒクルのみで処理した細胞および処理していない「細胞のみ」条件)。

【0097】

実施例2 全UBE3A ASOの単一用量スクリーニング

20

実施例1の方法を使用して、UBE3A標的化ASO(配列番号1~80、101~139、および184~203)を、初代線維芽細胞(96ウェルプレートのウェルあたり10kをプレート)を200nMのASOで処理することによってインビトロでスクリーニングした。ASOを、96ウェルプレートのウェルあたり0.5μLでRNAi Maxを使用するトランスフェクションによって送達した。

【0098】

全てのスクリーニングしたASOを、本開示の実施形態(すなわち、上記ASO全体を通じて2'-O改変されたRNAおよびホスホロチオエート連結を有するRNAウイングが隣接した約10~12個の塩基のDNA中心的領域を有する約20個の塩基の長さ)に従って設計した。

30

【0099】

図6~9に示されるデータは、スクリーニングされた全139のASOに関するUBE3Aノックダウン(UBE3Aノックダウンのパーセントとして表される)のqPCR読み出しのまとめの表として表される。全てのサンプルを、ビヒクル条件または細胞のみの条件のいずれかに対して正規化した。ASOの表は、下流の齧歯類概念立証インビボ試験のために、UBE3Aエキソン標的化ASO(図6~7)、UBE3Aイントロン標的化ASO(図8)、ならびにヒトおよびマウス両方のUBE3A転写物と100%同一性を有するUBE3A ASO(図9)に分類される。

【0100】

全ての細胞を、プレートして48時間後にASOでトランスフェクトした。細胞を、qPCRのために、ASOトランスフェクションのさらに48時間後に採取した。アクチンを、UBE3Aに対する正規化遺伝子として使用した。適切な場合、ASOを、コントロール線維芽細胞およびDup15q患者に由来する線維芽細胞の両方においてスクリーニングした(図6~8)。図9において、マウスUBE3A同一性を有するASOに関しては、データは2回に対して示される。

40

【0101】

実施例3 UBE3AリードASO候補の用量応答スクリーニング

実施例1および2のデータに基づいて、候補リードUBE3A標的化ASOを、一次単一用量スクリーニングにおいて80~85%より大きい転写物ノックダウンに基づいて選択した。各候補リードに関して、同一の配列を有する新たなASOを、1~3個のホスホ

50

ジエステル (PO) 骨格改変 (各々、3' および 5' において、ASO あたり合計 4 ~ 5 個の PO 改変 (すなわち、PO 連結で置き換えられた PS 連結) を有する 2' - MOE RNA 様ウイング) で合成した。これらの改変は、元々のリード ASO 中のその相当する PS 連結に置き換わる。PO 改変 ASO を、娘 ASO として図 10 中で言及する。

【0102】

次いで、これらの候補リードを、UBE3A 転写物発現の用量応答調節に関して試験した。これらの実験のために、初代線維芽細胞 (96 ウェルプレートのウェルあたり 10 k をプレート) またはマウス胚性線維芽細胞 (ウェルあたり 15 k でプレート) のいずれかを、96 ウェルプレートにプレートした。ASO を、6 つの用量: 6.25 nM、12.5 nM、25 nM、50 nM、100 nM、および 200 nM でスクリーニングした。ASO を、96 ウェルプレートのウェルあたり 0.5 μ L で RNAi Max を使用するトランスフェクションによって送達した。

10

【0103】

図 10 は、Dup15q 患者線維芽細胞 (上) またはマウス胚性線維芽細胞 (下) における 2 つのリード候補例およびそれらの PO 改変娘分子に関する標的発現の UBE3A ASO 用量応答の例示的データを示す。全サンプルを、ビヒクルコントロールに対して正規化した。

【0104】

図 11 は、用量応答をプロットし、図 10 からの同じ 2 例のリード候補に関する EC50 を示す。全細胞を、プレートして 48 時間後に ASO でトランスフェクトした。細胞を、qPCR のために、ASO トランスフェクションのさらに 48 時間後に採取した。アクチンを、UBE3A に対する正規化遺伝子として使用した。各データ点は、2 つの技術的複製および 1 つの生物学的複製を表す。

20

【0105】

実施例 4 UBE3A リード ASO 候補の用量応答スクリーニング

候補リード UBE3A 標的化 ASO を、実施例 1 および 2 からの一次単一用量スクリーニングにおいて 80 ~ 85 % より大きい転写物ノックダウンに基づいて選択した。各候補リードに関して、同一の配列を有する新たな ASO を、実施例 3 に記載されるように、1 ~ 3 個の PO 骨格改変 (各々、3' および 5' において、2' - MOE RNA 様ウイング (ASO あたり合計 4 ~ 5 個の PO 改変)) で合成した。次いで、全候補リードを、UBE3A 転写物発現の用量応答調節に関して試験した。

30

【0106】

これらの実験のために、初代線維芽細胞 (96 ウェルプレートのウェルあたり 10 k をプレート) またはマウス胚性線維芽細胞 (ウェルあたり 15 k でプレート) のいずれかを、96 ウェルプレートにプレートした。ASO を、別段示されなければ、6 つの用量: 6.25 nM、12.5 nM、25 nM、50 nM、100 nM、および 200 nM でスクリーニングした。ASO を、96 ウェルプレートのウェルあたり 0.5 μ L で RNAi Max を使用するトランスフェクションによって送達した。

【0107】

全サンプルを、各実験内で、ビヒクルまたはコントロール条件のいずれかに対して正規化した。全細胞を、プレートして 48 時間後に ASO でトランスフェクトした。細胞を、qPCR のために、ASO トランスフェクションのさらに 48 時間後に採取した。アクチンを、UBE3A に対する正規化遺伝子として使用した。

40

【0108】

図 12 は、UBE3A エキソンを標的とするリード全 PS 骨格候補の得られた用量応答データを示す。

【0109】

図 13 は、UBE3A イントロンを標的とするリード全 PS 骨格候補の得られた用量応答データを示す。

【0110】

50

図14は、齧歯類のインビボ有効性試験のために100%マウス相同性を有するリード全PS骨格候補の得られた用量応答データを示す。

【0111】

図15は、齧歯類のインビボ有効性試験のために100%マウス相同性を有するPO改変娘リードの得られた用量応答データを示す。

【0112】

図16は、ヒト臨床候補試験のためにPO改変娘リードの得られた用量応答データを示す。

【0113】

実施例5 UBE3A ASOを使用するUBE3Aのタンパク質ノックダウン 10

ASO処理したDup15q患者線維芽細胞を、有効性を決定し、下流の実験のためにASOをランク付けする助けにするために、UBE3Aタンパク質ノックダウンに関してスクリーニングした。

【0114】

線維芽細胞を、96ウェルプレートのウェルあたり10kでプレートした。ASO処理は、プレートして48時間後に生じた。タンパク質ノックダウンの蓄積を許容するために、線維芽細胞を、ASO処理の約4.5日後に、ウェスタンブロット分析のために採取した。

【0115】

図17は、ある特定の候補リードUBE3A ASOおよび同一のASO配列を有する3個のPO改変娘分子のウェスタンブロットを示す。GFP標的化ASOを、陰性コントロールとして使用した。UBE3A発現を、ハウスキーピング遺伝子ACTINに対して正規化し、次いで、ビヒクル条件に対して正規化した。 20

【0116】

図18は、前述のサンプルに関するUBE3Aタンパク質ノックダウンの定量を示す。UBE3Aプロットに関しては、曝露は600sであった。GAPDHに関しては、曝露は15sであった。レーンあたり5μgのタンパク質を載せ、高分子量転写を使用した。UBE3A抗体：Rb-E6AP Antibody (Bethyl) - A300-351A (1:1000)。Actin Antibody：Ms - Actin - (Cell Signaling) - 8H10D10 (1:2000)。 30

【0117】

実施例6 UBE3A標的化ASOを使用するUBE3Aのタンパク質ノックダウン

ASO処理したDup15q患者線維芽細胞を、有効性を決定し、下流の実験のためにASOをランク付けする助けにするために、UBE3Aタンパク質ノックダウンに関してスクリーニングした。

【0118】

図19~22は、候補リードのUBE3Aタンパク質ノックダウンに関するまとめの表を提供する。

【0119】

ASO処理したDup15q患者線維芽細胞を、有効性を決定し、下流の実験のためにASOをランク付けする助けにするために、UBE3Aタンパク質ノックダウンに関してスクリーニングした。線維芽細胞を、96ウェルプレートのウェルあたり10kでプレートした。ASO処理は、プレートして48時間後に生じた。タンパク質ノックダウンの蓄積を許容するために、線維芽細胞を、ASO処理の約4.5日後に、ウェスタンブロット分析のために採取した。全ての実験において、GFP標的化ASOを、陰性コントロールとして使用した。UBE3A発現を、ハウスキーピング遺伝子ACTINに対して正規化し、次いで、ビヒクル条件に対して正規化した。UBE3Aプロットに関しては、曝露は600sであった。GAPDHに関しては、曝露は15sであった。レーンあたり5μgのタンパク質を載せ、高分子量転写を使用した。UBE3A抗体：Rb-E6AP Antibody (Bethyl) - A300-351A (1:1000)。Actin 40

Antibody: Ms - Actin - (Cell Signaling) - 8 H 10 D 10 (1 : 2 0 0 0) 。

【 0 1 2 0 】

図 19 は、UBE3A を標的とするリード全 PS 骨格候補の UBE3A タンパク質ノックダウン結果をまとめる表を提供する。

【 0 1 2 1 】

図 20 は、齧歯類のインビボ有効性試験のために 100% マウス相同性を有するリード全 PS 骨格候補の UBE3A タンパク質ノックダウン結果をまとめる表を提供する。(C)

【 0 1 2 2 】

図 21 は、齧歯類のインビボ有効性試験のために 100% マウス相同性を有する PO 改変娘リードの UBE3A タンパク質ノックダウン結果をまとめる表を提供する。

【 0 1 2 3 】

図 22 は、ヒト臨床候補のために PO 改変娘リードの UBE3A タンパク質ノックダウン結果をまとめる表を提供する。

【 0 1 2 4 】

実施例 7 - UBE3A リード候補を使用するヒト NGN2 幹細胞由来ニューロンにおける UBE3A 転写物のノックダウン

UBE3A は、ニューロンにおいて刷り込みされ、この細胞タイプは、Dup15q の病因にとって極めて重要である。本発明の ASO が疾患関連ヒト細胞タイプにおいて有効であることを示すために、この実施例において、ヒト人工多能性幹細胞由来ニューロン(転写因子 NGN2 の過剰発現および SMAD シグナル伝達の低分子阻害を介して分化)を、本発明の UBE3A 標的化 ASO で処理した。

【 0 1 2 5 】

ニューロンを、80,000 細胞/ウェルの密度で 96 ウェルプレートにプレートし、100 nM の UBE3A 標的化 ASO で処理した。ASO を、DIV (インビトロ日数 (day in vitro)) 21 において Endoporter 試薬で培養したニューロンへと送達した。細胞を、DIV 31 において処理の 10 日後に qPCR のために採取した。UBE3A リード候補 ASO および最適化したリード候補 ASO をスクリーニングした。

【 0 1 2 6 】

図 23 は、このスクリーニングをまとめるデータを提供する。示されるように、多くの ASO は、ヒトニューロンにおいて UBE3A 転写物の > 80% ノックダウンを示した。UBE3A 発現レベルを、チューブリン転写物レベル(参照として使用されるハウスキーピング遺伝子)に対して正規化した。次いで、全ての正規化した発現を、第 1 のビヒクル条件に対して定量した。各バーは、3 つの技術的複製および 1 つの生物学的複製を表す。

【 0 1 2 7 】

実施例 8 - UBE3A リード候補 ASO を使用するヒト初代ニューロンにおける UBE3A 転写物のノックダウン

UBE3A は、ニューロンにおいて刷り込みされ、その細胞タイプは、Dup15q の病因にとって極めて重要である。本発明の ASO が関連ヒト細胞タイプにおいて有効であることを示すために、ヒト初代ニューロン(19 週齢の男性胎児に由来; Science 11 から獲得)を、UBE3A 標的化 ASO で処理した。ニューロンを、30,000 細胞/ウェルの密度で 96 ウェルプレートにプレートし、500 nM の UBE3A 標的化 ASO で処理した。ASO を、裸で (gymnотically) (トランスフェクション試薬なし) で DIV 1 に送達した。細胞を、ASO 処理の 6 日後に qPCR のために採取した。UBE3A リード候補 ASO および最適化したリード候補 ASO の部分セットをスクリーニングした。

【 0 1 2 8 】

10

20

30

40

50

図 2 4 は、このスクリーンをまとめる結果を提供する。示されるように、多くの A S O は、裸の送達でヒト初代ニューロンにおいて U B E 3 A 転写物の > 6 0 % ノックダウンを示す。U B E 3 A 発現レベルを、 チューブリン転写物レベル (参照として使用されるハウスキーピング遺伝子) に対して正規化した。次いで、全ての正規化した発現を、第 1 のビヒクル条件に対して定量した。各バーは、 3 つの技術的複製および 1 つの生物学的複製を表す。

【 0 1 2 9 】

実施例 9 - U B E 3 A リード候補 A S O を使用する非ヒト霊長類初代線維芽細胞培養物における U B E 3 A 転写物のノックダウン

カニクイザル非ヒト霊長類 (N H P) における相当する配列と 1 0 0 % 相同性を有する U B E 3 A A S O を、このアッセイのために選択した。リード A S O 候補を、インビボ寛容性、毒物学、P K および P D に関して試験するために、N H P においてインビボでスクリーニングした。 10

【 0 1 3 0 】

本発明の A S O が、関連の N H P 細胞タイプにおいて有効であることを示すために、N H P 初代線維芽細胞 (C o r i e l l) を、U B E 3 A 標的化 A S O で形質導入した。線維芽細胞を、1 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルの密度で 9 6 ウェルプレートにプレートし、2 0 0 n M U B E 3 A A S O で処理した。A S O を、D I V 2 に R N A i M a x を使用して N H P 線維芽細胞へとトランスフェクトした。細胞を、A S O 処理の 4 8 時間後に q P C R のために採取した。U B E 3 A リード候補 A S O および最適化したリード候補をスクリーニングした。 20

【 0 1 3 1 】

図 2 5 は、このスクリーニングをまとめる結果を提供する。示されるように、多くの A S O は、show U B E 3 A 転写物の 8 0 ~ 9 0 % ノックダウンを示す。U B E 3 A 発現レベルを、G A P D H (参照として使用されるハウスキーピング遺伝子) に対して正規化した。次いで、全ての正規化した発現を、第 1 の細胞のみの条件に対して定量した。各バーは、2 つの技術的複製および 1 つの生物学的複製を表す。

【 0 1 3 2 】

実施例 1 0 - U B E 3 A リード候補を使用するマウス初代皮質ニューロンにおける U B E 3 A 転写物のノックダウン 30

U B E 3 A は、ニューロンにおいて刷り込みされ、この細胞タイプは、D u p 1 5 q の病因にとって極めて重要である。リード A S O を、インビボ寛容性、毒物学、P K および P D に関して試験するために、マウスにおいてインビボでスクリーニングする。

【 0 1 3 3 】

D u p 1 5 q のマウスモデルは、疾患モデルシステムにおいてインビボで概念立証および有効性を示すために有用である。本発明の A S O が関連マウス細胞タイプにおいて有効であることを示すために、マウス初代皮質ニューロン (B r a i n b i t s) を、U B E 3 A A S O で処理した。ニューロンを、ウェルあたり 9 k で 9 6 ウェルプレートにプレートし、1 μ M U B E 3 A A S O で処理した。A S O を、D I V 3 に裸で送達した。細胞を、A S O 処理の 8 日後 (D I V 1 1) に q P C R のために採取した。U B E 3 A リード候補および最適化したリード候補をスクリーニングした。これらのスクリーンから得られた結果を、図 2 6 に示す。示されるように、多くの A S O は、裸の送達、特に、1 0 0 % ラット相同性を有する A S O で U B E 3 A 転写物の > 6 0 % ノックダウンを示す。U B E 3 A 発現レベルを、 チューブリン (参照として使用されるハウスキーピング遺伝子) に対して正規化した。次いで、全ての正規化した発現を、第 2 の細胞のみの条件に対して定量した。各バーは、2 つの技術的複製および 1 つの生物学的複製を表す。 40

【 0 1 3 4 】

実施例 1 1 - U B E 3 A リード候補を使用するラット初代皮質ニューロンにおける U B E 3 A 転写物のノックダウン

U B E 3 A は、ニューロンにおいて刷り込みされ、この細胞タイプは、D u p 1 5 q の 50

病因にとって極めて重要である。リード A S O を、インビボ寛容性、毒物学、P K および P D に関して試験するために、ラットにおいてインビボでスクリーニングする。

【 0 1 3 5 】

本発明の A S O が、関連ラット細胞タイプにおいて有効であることを示すために、ラット初代皮質ニューロン (B r a i n b i t s) を、本明細書に記載されるとおりの U B E 3 A A S O で処理した。ニューロンを、ウェルあたり 9 k で 9 6 ウェルプレートにプレートし、3 μ M U B E 3 A A S O で処理した。A S O を、D I V 3 に裸で送達した。

【 0 1 3 6 】

細胞を、A S O 処理の 4 日後および 8 日後 (それぞれ、D I V 7 および D I V 1 1) に q P C R のために採取した。U B E 3 A リード候補および最適化したリード候補をスクリーニングした。

【 0 1 3 7 】

図 2 7 は、細胞を 4 日後に q P C R のために採取した後のスクリーニングをまとめる結果を提供する。

【 0 1 3 8 】

図 2 8 は、細胞を 8 日後に q P C R のために採取した後のスクリーニングをまとめる結果を提供する。

【 0 1 3 9 】

図 2 7 ~ 2 8 に示されるように、多くの A S O は、裸の送達、特に、1 0 0 % ラット相同性を有する A S O で U B E 3 A 転写物の > 6 0 % ノックダウンを示す。U B E 3 A 発現レベルを、チュープリン (参照として使用されるハウスキーパー遺伝子) に対して正規化した。次いで、全ての正規化した発現を、第 2 の細胞のみの条件に対して定量した。各バーは、2 つの技術的複製および 1 つの生物学的複製を表す。

【 図面 】

【 図 1 】

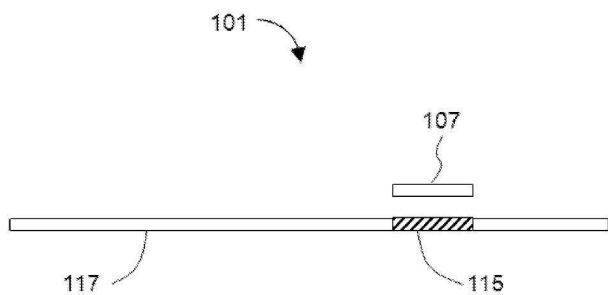


FIG. 1

【 図 2 】

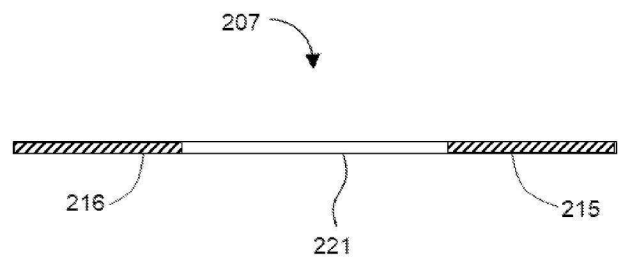


FIG. 2

10

20

30

40

50

【 図 3 】

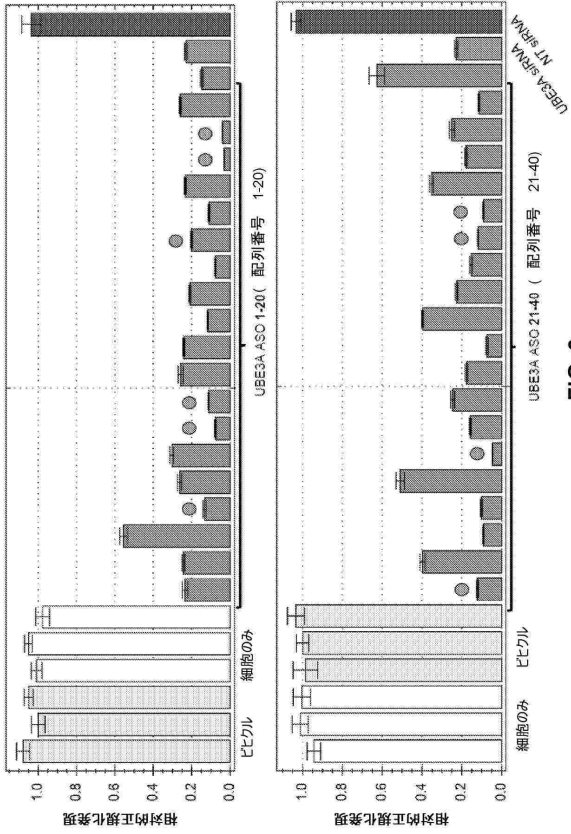


FIG. 3

【 図 4 】

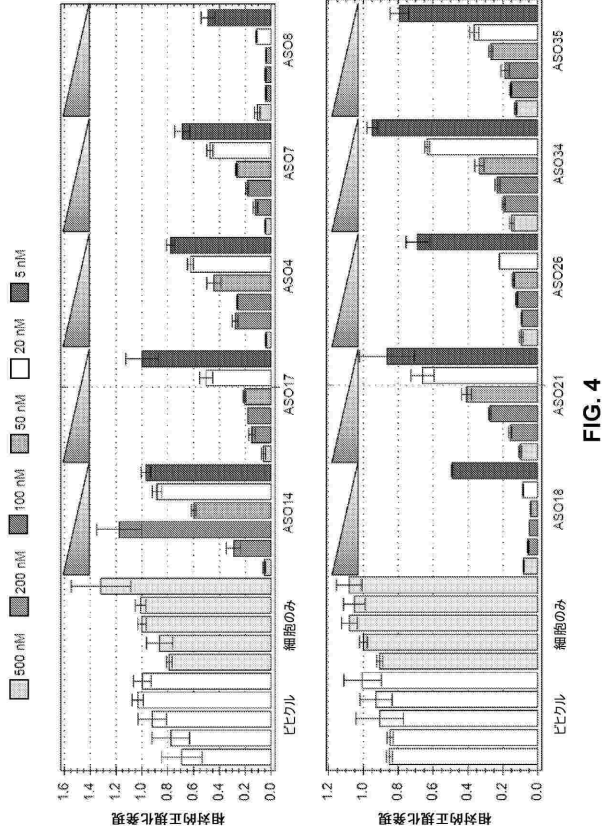


FIG. 4

10

20

【 図 5 】

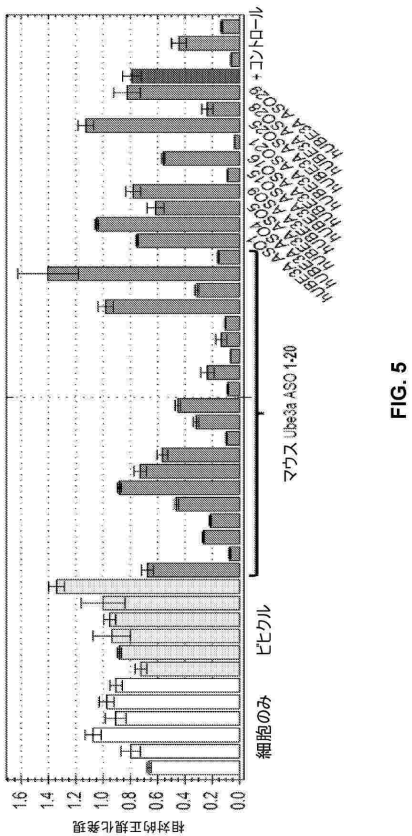
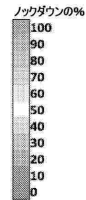


FIG. 5

【 図 6 】

配列番号	ASO ID	CTR	DUP
1	QS-Tg-15-ASO-001	82%	77%
2	QS-Tg-15-ASO-002	88%	88%
3	QS-Tg-15-ASO-003	83%	90%
4	QS-Tg-15-ASO-004	86%	81%
5	QS-Tg-15-ASO-005	85%	86%
6	QS-Tg-15-ASO-006	95%	95%
7	QS-Tg-15-ASO-007	89%	95%
8	QS-Tg-15-ASO-008	93%	96%
9	QS-Tg-15-ASO-009	74%	54%
10	QS-Tg-15-ASO-010	74%	59%
11	QS-Tg-15-ASO-011	93%	91%
12	QS-Tg-15-ASO-012	78%	90%
13	QS-Tg-15-ASO-013	87%	92%
14	QS-Tg-15-ASO-014	78%	77%
15	QS-Tg-15-ASO-015	91%	95%
16	QS-Tg-15-ASO-016	65%	43%
17	QS-Tg-15-ASO-017	91%	92%
18	QS-Tg-15-ASO-018	91%	93%
19	QS-Tg-15-ASO-019	69%	37%
20	QS-Tg-15-ASO-020	81%	84%
21	QS-Tg-15-ASO-021	84%	74%
22	QS-Tg-15-ASO-022	35%	63%
23	QS-Tg-15-ASO-023	80%	81%
24	QS-Tg-15-ASO-024	81%	80%
25	QS-Tg-15-ASO-025	75%	91%
26	QS-Tg-15-ASO-026	87%	88%
27	QS-Tg-15-ASO-027	78%	40%
28	QS-Tg-15-ASO-028	70%	66%
29	QS-Tg-15-ASO-029	77%	83%
30	QS-Tg-15-ASO-030	86%	86%
31	QS-Tg-15-ASO-031	54%	22%
32	QS-Tg-15-ASO-032	73%	42%
33	QS-Tg-15-ASO-033	60%	83%
34	QS-Tg-15-ASO-034	80%	71%
35	QS-Tg-15-ASO-035	86%	61%
36	QS-Tg-15-ASO-036	58%	57%
37	QS-Tg-15-ASO-037	80%	64%
38	QS-Tg-15-ASO-038	71%	22%
39	QS-Tg-15-ASO-039	82%	63%
40	QS-Tg-15-ASO-040	30%	68%

FIG. 6



30

40

50

【 図 7 】

配列番号	ASO ID	CTR	DUP
101	QS-Tg-15-ASO-101	99%	98%
102	QS-Tg-15-ASO-102	96%	96%
103	QS-Tg-15-ASO-103	82%	89%
104	QS-Tg-15-ASO-104	95%	94%
105	QS-Tg-15-ASO-105	86%	82%
106	QS-Tg-15-ASO-106	97%	94%
107	QS-Tg-15-ASO-107	93%	94%
108	QS-Tg-15-ASO-108	92%	90%
109	QS-Tg-15-ASO-109	85%	82%
110	QS-Tg-15-ASO-110	92%	82%
111	QS-Tg-15-ASO-111	79%	70%
112	QS-Tg-15-ASO-112	35%	46%
113	QS-Tg-15-ASO-113	64%	37%
114	QS-Tg-15-ASO-114	20%	7%
115	QS-Tg-15-ASO-115	89%	89%
116	QS-Tg-15-ASO-116	93%	93%
117	QS-Tg-15-ASO-117	87%	86%
118	QS-Tg-15-ASO-118	45%	29%
119	QS-Tg-15-ASO-119	31%	27%
120	QS-Tg-15-ASO-120	69%	60%
121	QS-Tg-15-ASO-121	82%	90%
122	QS-Tg-15-ASO-122	88%	94%
123	QS-Tg-15-ASO-123	88%	91%
124	QS-Tg-15-ASO-124	64%	83%
125	QS-Tg-15-ASO-125	87%	91%
126	QS-Tg-15-ASO-126	77%	87%
127	QS-Tg-15-ASO-127	97%	98%
128	QS-Tg-15-ASO-128	97%	99%
129	QS-Tg-15-ASO-129	97%	96%
130	QS-Tg-15-ASO-130	90%	89%
131	QS-Tg-15-ASO-131	90%	91%
132	QS-Tg-15-ASO-132	89%	89%
133	QS-Tg-15-ASO-133	56%	64%
134	QS-Tg-15-ASO-134	57%	60%
135	QS-Tg-15-ASO-135	80%	89%
136	QS-Tg-15-ASO-136	60%	65%
137	QS-Tg-15-ASO-137	79%	89%
138	QS-Tg-15-ASO-138	92%	95%
139	QS-Tg-15-ASO-139	87%	88%

FIG. 7

【 図 8 】

配列番号	ASO ID	CTR	DUP
41	QS-Tg-15-ASO-041	93%	91%
42	QS-Tg-15-ASO-042	89%	89%
43	QS-Tg-15-ASO-043	51%	56%
44	QS-Tg-15-ASO-044	57%	63%
45	QS-Tg-15-ASO-045	51%	54%
46	QS-Tg-15-ASO-046	90%	94%
47	QS-Tg-15-ASO-047	79%	77%
48	QS-Tg-15-ASO-048	87%	87%
49	QS-Tg-15-ASO-049	33%	37%
50	QS-Tg-15-ASO-050	66%	71%
51	QS-Tg-15-ASO-051	31%	33%
52	QS-Tg-15-ASO-052	57%	70%
53	QS-Tg-15-ASO-053	82%	81%
54	QS-Tg-15-ASO-054	46%	52%
55	QS-Tg-15-ASO-055	69%	79%
56	QS-Tg-15-ASO-056	35%	46%
57	QS-Tg-15-ASO-057	40%	43%
58	QS-Tg-15-ASO-058	39%	44%
59	QS-Tg-15-ASO-059	26%	32%
60	QS-Tg-15-ASO-060	74%	68%
61	QS-Tg-15-ASO-061	55%	55%
62	QS-Tg-15-ASO-062	43%	55%
63	QS-Tg-15-ASO-063	47%	58%
64	QS-Tg-15-ASO-064	N/A	80%
65	QS-Tg-15-ASO-065	32%	41%
66	QS-Tg-15-ASO-066	54%	70%
67	QS-Tg-15-ASO-067	61%	76%
68	QS-Tg-15-ASO-068	40%	51%
69	QS-Tg-15-ASO-069	90%	95%
70	QS-Tg-15-ASO-070	52%	71%
71	QS-Tg-15-ASO-071	58%	80%
72	QS-Tg-15-ASO-072	76%	87%
73	QS-Tg-15-ASO-073	69%	89%
74	QS-Tg-15-ASO-074	78%	78%
75	QS-Tg-15-ASO-075	69%	77%
76	QS-Tg-15-ASO-076	54%	52%
77	QS-Tg-15-ASO-077	64%	65%
78	QS-Tg-15-ASO-078	33%	58%
79	QS-Tg-15-ASO-079	26%	18%
80	QS-Tg-15-ASO-080	18%	29%

FIG. 8

【 図 9 】

配列番号	ASO ID	Rd 1	Rd 2
184	QS-Tg-17-ASO-001	32%	11%
185	QS-Tg-17-ASO-002	93%	82%
186	QS-Tg-17-ASO-003	73%	43%
187	QS-Tg-17-ASO-004	79%	59%
188	QS-Tg-17-ASO-005	53%	43%
189	QS-Tg-17-ASO-006	12%	22%
190	QS-Tg-17-ASO-007	27%	2%
191	QS-Tg-17-ASO-008	43%	25%
192	QS-Tg-17-ASO-009	90%	69%
193	QS-Tg-17-ASO-010	68%	45%
194	QS-Tg-17-ASO-011	55%	42%
195	QS-Tg-17-ASO-012	91%	76%
196	QS-Tg-17-ASO-013	77%	54%
197	QS-Tg-17-ASO-014	93%	79%
198	QS-Tg-17-ASO-015	87%	74%
199	QS-Tg-17-ASO-016	90%	76%
200	QS-Tg-17-ASO-017	2%	N/A
201	QS-Tg-17-ASO-018	69%	48%
202	QS-Tg-17-ASO-019	N/A	4%
203	QS-Tg-17-ASO-020	84%	64%
1	QS-Tg-15-ASO-001	25%	22%
4	QS-Tg-15-ASO-004	N/A	22%
5	QS-Tg-15-ASO-005	38%	43%
9	QS-Tg-15-ASO-009	22%	41%
15	QS-Tg-15-ASO-015	91%	70%
21	QS-Tg-15-ASO-021	44%	55%
25	QS-Tg-15-ASO-025	96%	92%
28	QS-Tg-15-ASO-028	N/A	20%
29	QS-Tg-15-ASO-029	76%	59%
32	QS-Tg-15-ASO-032	18%	8%
101	QS-Tg-15-ASO-101	36%	N/A
102	QS-Tg-15-ASO-102	88%	N/A
105	QS-Tg-15-ASO-105	18%	N/A
106	QS-Tg-15-ASO-106	61%	N/A
109	QS-Tg-15-ASO-109	29%	N/A
111	QS-Tg-15-ASO-111	29%	N/A
112	QS-Tg-15-ASO-112	37%	N/A
114	QS-Tg-15-ASO-114	53%	N/A
115	QS-Tg-15-ASO-115	90%	N/A
116	QS-Tg-15-ASO-116	62%	N/A
119	QS-Tg-15-ASO-119	27%	N/A
121	QS-Tg-15-ASO-121	61%	N/A

FIG. 9

【 図 10 】

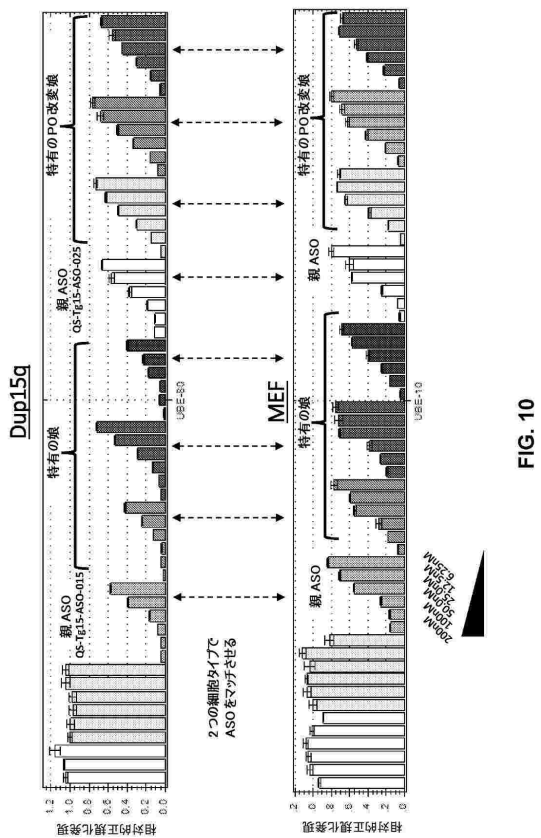


FIG. 10

10

20

30

40

50

【 図 1 1 】

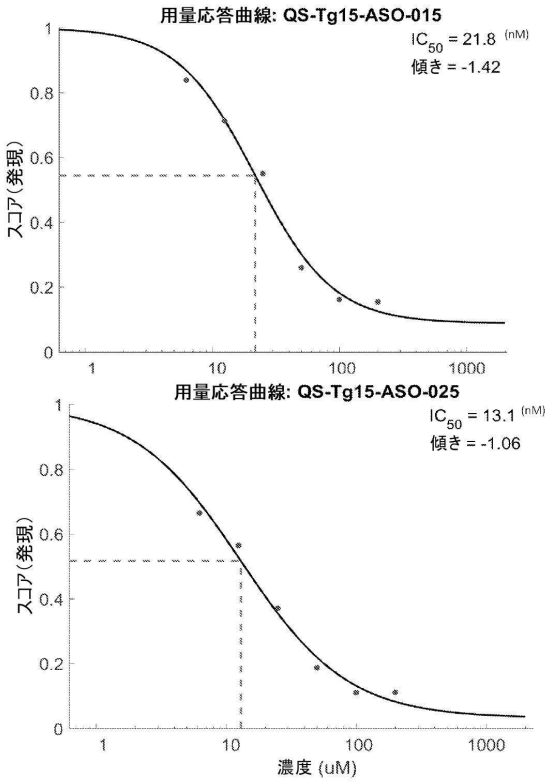


FIG. 11

【 図 1 2 】

ASO ID	400nM	200nM	100nM	50nM	25nM	12.5nM	6.25nM
1	83	60	55	38	28	14	4
5	82	72	57	60	46	28	18
6	92	71	60	37	34	22	14
8	93	91	88	87	80	74	61
11	87	80	78	76	62	42	29
13	85	86	78	73	61	30	11
15	90	90	87	86	80	66	53
17	88	83	76	74	52	24	13
23	83	79	72	58	41	8	3
25	85	87	84	80	71	54	32
26	82	81	75	71	62	42	27
29	77	59	46	60	41	13	22
30	83	82	74	68	38	56	43
36	51	26	19	12	14	3	N/A
101	93	96	91	88	69	52	28
102	89	89	85	75	49	48	27
103	52	47	34	29	24	11	8
104	76	74	70	46	51	28	6
105	55	48	30	23	N/A	18	10
106	83	86	81	68	66	42	25
107	84	82	75	65	47	22	12
108	74	72	56	51	27	25	10
115	82	83	82	66	66	51	28
116	89	90	85	84	68	59	27
117	80	85	82	84	70	57	34
121	77	70	63	47	34	7	12
122	85	86	78	75	45	38	13
127	91	87	88	74	61	27	9

FIG. 12

10

20

【 図 1 3 】

ASO ID	400nM	200nM	100nM	50nM	25nM	12.5nM	6.25nM
41	70	64	42	40	24	21	12
42	68	59	63	42	16	0	5
46	66	62	38	40	15	15	0
53	72	75	68	46	25	16	4
64	77	66	39	37	31	21	17
69	83	85	85	74	46	17	0
71	74	71	66	55	47	24	13
72	76	73	57	35	18	9	5
73	65	78	65	52	23	17	7

FIG. 13

【 図 1 4 】

ASO ID	400nM	200nM	100nM	50nM	25nM	12.5nM	6.25nM
185	79	75	74	71	55	21	9
192	85	87	82	75	66	39	19
195	84	84	80	68	47	26	4
197	90	90	83	66	37	12	5
198	79	82	72	61	36	21	9
199	88	88	78	68	47	28	6
203	85	72	57	54	41	42	23

FIG. 14

30

40

50

【 図 15 】

配列番号	ASO ID	200nM	100nM	50nM	25nM	12.5nM	6.25nM
140	QS-Tg-15-ASO-140	98	96	96	88	76	58
141	QS-Tg-15-ASO-141	96	94	87	71	48	29
142	QS-Tg-15-ASO-142	99	94	95	83	77	60
143	QS-Tg-15-ASO-143	96	86	71	51	38	27
144	QS-Tg-15-ASO-144	92	86	67	51	33	24
145	QS-Tg-15-ASO-145	95	85	71	55	44	33
146	QS-Tg-15-ASO-146	97	93	83	68	57	52
147	QS-Tg-15-ASO-147	97	95	84	80	59	63
148	QS-Tg-15-ASO-148	98	92	87	66	52	55
149	QS-Tg-15-ASO-149	91	87	77	52	30	18
150	QS-Tg-15-ASO-150	89	87	72	59	31	20
151	QS-Tg-15-ASO-151	90	81	73	48	36	14
152	QS-Tg-15-ASO-152	94	95	86	86	66	59
153	QS-Tg-15-ASO-153	95	94	84	76	69	57
154	QS-Tg-15-ASO-154	94	93	77	80	64	61
204	QS-Tg-17-ASO-021	92	87	78	64	52	35
205	QS-Tg-17-ASO-022	83	78	57	51	30	23
206	QS-Tg-17-ASO-023	93	87	74	59	52	35
207	QS-Tg-17-ASO-024	82	75	65	45	40	26
208	QS-Tg-17-ASO-025	77	74	56	49	43	36
209	QS-Tg-17-ASO-026	78	69	62	42	40	27
210	QS-Tg-17-ASO-027	91	84	61	58	46	34
211	QS-Tg-17-ASO-028	88	85	53	56	33	37
212	QS-Tg-17-ASO-029	89	78	52	51	41	34
213	QS-Tg-17-ASO-030	76	56	40	26	27	9
214	QS-Tg-17-ASO-031	80	75	41	48	28	23
215	QS-Tg-17-ASO-032	78	73	42	40	32	13
216	QS-Tg-17-ASO-033	76	63	53	39	38	24
217	QS-Tg-17-ASO-034	68	63	37	38	23	30
218	QS-Tg-17-ASO-035	70	55	48	29	38	19

FIG. 15

【 図 16 】

配列番号	ASO ID	200nM	100nM	50nM	25nM	12.5nM	6.25nM
140	QS-Tg-15-ASO-140	88	85	78	67	56	21
146	QS-Tg-15-ASO-146	94	92	92	80	73	57
152	QS-Tg-15-ASO-152	92	91	87	81	73	63
153	QS-Tg-15-ASO-153	92	91	83	81	72	66
155	QS-Tg-15-ASO-155	94	90	87	85	78	80
156	QS-Tg-15-ASO-156	93	90	85	83	78	81
157	QS-Tg-15-ASO-157	94	88	86	82	80	84
158	QS-Tg-15-ASO-158	88	84	79	60	42	42
159	QS-Tg-15-ASO-159	89	83	71	55	32	34
160	QS-Tg-15-ASO-160	84	80	73	50	29	23
161	QS-Tg-15-ASO-161	85	75	62	34	23	18
162	QS-Tg-15-ASO-162	82	69	49	28	12	10
163	QS-Tg-15-ASO-163	89	74	61	33	24	10
164	QS-Tg-15-ASO-164	91	86	82	63	61	41
165	QS-Tg-15-ASO-165	87	87	82	75	58	39
166	QS-Tg-15-ASO-166	80	77	67	54	29	7
167	QS-Tg-15-ASO-167	78	73	64	53	37	32
168	QS-Tg-15-ASO-168	83	74	64	44	33	5
169	QS-Tg-15-ASO-169	85	77	70	43	35	9
170	QS-Tg-15-ASO-170	82	70	54	37	20	9
171	QS-Tg-15-ASO-171	83	70	65	42	30	N/A
172	QS-Tg-15-ASO-172	95	94	95	87	78	65
173	QS-Tg-15-ASO-173	95	96	91	86	68	55
174	QS-Tg-15-ASO-174	90	82	71	36	27	12
175	QS-Tg-15-ASO-175	92	88	71	47	23	21
176	QS-Tg-15-ASO-176	90	79	66	32	19	8
177	QS-Tg-15-ASO-177	92	89	85	74	70	61
178	QS-Tg-15-ASO-178	92	85	85	58	45	39
179	QS-Tg-15-ASO-179	90	88	83	75	49	43
180	QS-Tg-15-ASO-180	90	84	86	70	55	52
181	QS-Tg-15-ASO-181	95	93	73	76	54	55
182	QS-Tg-15-ASO-182	95	90	84	71	55	50
183	QS-Tg-15-ASO-183	95	93	78	73	55	55
213	QS-Tg-17-ASO-030	95	87	79	54	38	30
214	QS-Tg-17-ASO-031	94	93	85	60	52	48
219	QS-Tg-17-ASO-038	95	93	90	78	58	47

FIG. 16

10

20

【 図 17 】

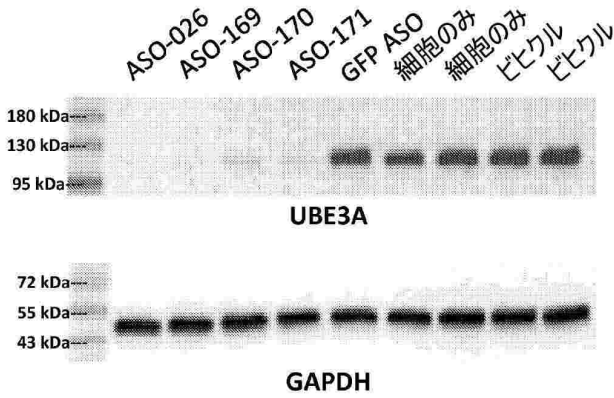


FIG. 17

【 図 18 】

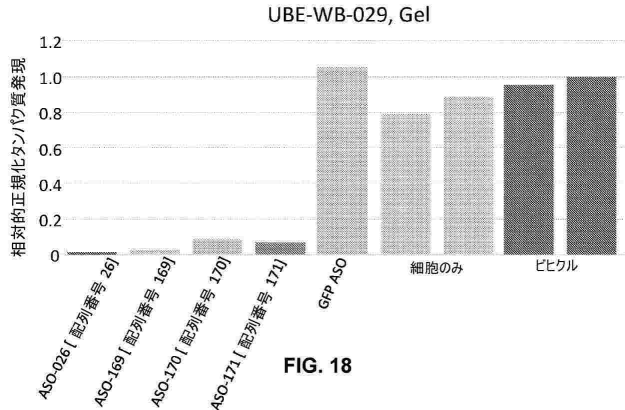


FIG. 18

30

40

50

【 図 1 9 】

配列番号	ASO ID	200nM	20nM
1	QS-Tg15-ASO-001	79%	20%
5	QS-Tg15-ASO-005	80%	30%
6	QS-Tg15-ASO-006	92%	65%
8	QS-Tg15-ASO-008	95%	82%
11	QS-Tg15-ASO-011	86%	75%
13	QS-Tg15-ASO-013	96%	47%
15	QS-Tg15-ASO-015	91%	69%
17	QS-Tg15-ASO-017	76%	56%
23	QS-Tg15-ASO-023	94%	10%
25	QS-Tg15-ASO-025	95%	46%
26	QS-Tg15-ASO-026	90%	N/A
29	QS-Tg15-ASO-029	86%	59%
30	QS-Tg15-ASO-030	N/A	83%
36	QS-Tg15-ASO-036	57%	0%
101	QS-Tg15-ASO-101	95%	71%
102	QS-Tg15-ASO-102	94%	85%
103	QS-Tg15-ASO-103	74%	0%
104	QS-Tg15-ASO-104	98%	39%
105	QS-Tg15-ASO-105	82%	25%
106	QS-Tg15-ASO-106	99%	74%
107	QS-Tg15-ASO-107	98%	44%
108	QS-Tg15-ASO-108	80%	0%
115	QS-Tg15-ASO-115	97%	47%
116	QS-Tg15-ASO-116	100%	84%
117	QS-Tg15-ASO-117	98%	56%
151	QS-Tg15-ASO-121	95%	39%
122	QS-Tg15-ASO-122	98%	62%
127	QS-Tg15-ASO-127	99%	19%

FIG. 19

【 図 2 0 】

配列番号	ASO ID	200nM	20nM
41	QS-Tg-15-ASO-041	N/A	0%
42	QS-Tg-15-ASO-042	99%	8%
46	QS-Tg-15-ASO-046	99%	53%
53	QS-Tg-15-ASO-053	99%	55%
64	QS-Tg-15-ASO-064	95%	49%
69	QS-Tg-17-ASO-069	95%	97%
71	QS-Tg-17-ASO-071	20%	0%
72	QS-Tg-17-ASO-072	89%	86%
73	QS-Tg-17-ASO-073	98%	0%
185	QS-Tg-17-ASO-002	87%	94%
192	QS-Tg-17-ASO-009	99%	76%
195	QS-Tg-17-ASO-012	99%	77%
197	QS-Tg-17-ASO-014	99%	82%
198	QS-Tg-17-ASO-015	91%	30%
199	QS-Tg-17-ASO-016	100%	87%
203	QS-Tg-17-ASO-020	100%	90%

FIG. 20

10

20

【 図 2 1 】

配列番号	ASO ID	200nM
204	QS-Tg-17-ASO-021	96%
205	QS-Tg-17-ASO-022	93%
206	QS-Tg-17-ASO-023	94%
207	QS-Tg-17-ASO-024	71%
208	QS-Tg-17-ASO-025	77%
209	QS-Tg-17-ASO-026	74%
210	QS-Tg-17-ASO-027	78%
211	QS-Tg-17-ASO-028	68%
212	QS-Tg-17-ASO-029	69%
213	QS-Tg-17-ASO-030	55%
214	QS-Tg-17-ASO-031	62%
215	QS-Tg-17-ASO-032	75%
216	QS-Tg-17-ASO-033	85%
217	QS-Tg-17-ASO-034	81%
218	QS-Tg-17-ASO-035	85%

FIG. 21

【 図 2 2 】

配列番号	ASO ID	200nM
155	QS-Tg-15-ASO-155	96%
156	QS-Tg-15-ASO-156	96%
157	QS-Tg-15-ASO-157	94%
158	QS-Tg-15-ASO-158	92%
159	QS-Tg-15-ASO-159	93%
160	QS-Tg-15-ASO-160	94%
161	QS-Tg-15-ASO-161	99%
162	QS-Tg-15-ASO-162	96%
163	QS-Tg-15-ASO-163	94%
164	QS-Tg-15-ASO-164	99%
165	QS-Tg-15-ASO-165	99%
166	QS-Tg-15-ASO-166	99%
167	QS-Tg-15-ASO-167	98%
168	QS-Tg-15-ASO-168	98%
169	QS-Tg-15-ASO-169	98%
170	QS-Tg-15-ASO-170	91%
171	QS-Tg-15-ASO-171	94%
172	QS-Tg-15-ASO-172	90%
173	QS-Tg-15-ASO-173	86%
174	QS-Tg-15-ASO-174	90%
175	QS-Tg-15-ASO-175	91%
176	QS-Tg-15-ASO-176	85%
177	QS-Tg-15-ASO-177	84%
178	QS-Tg-15-ASO-178	98%
179	QS-Tg-15-ASO-179	97%
180	QS-Tg-15-ASO-180	98%
181	QS-Tg-15-ASO-181	95%
182	QS-Tg-15-ASO-182	92%
183	QS-Tg-15-ASO-183	89%
219	QS-Tg-17-ASO-036	95%

FIG. 22

30

40

50

【 図 2 3 】

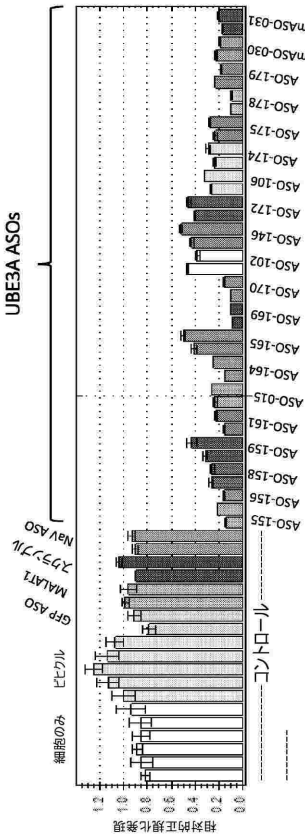


FIG. 23

【 図 2 4 】

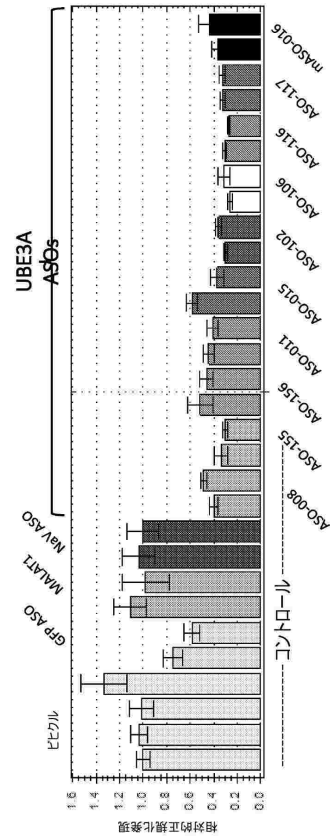


FIG. 24

10

20

【 図 2 5 】

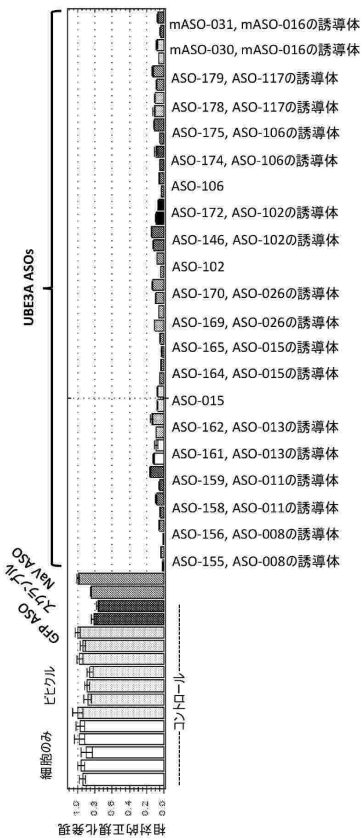


FIG. 25

【 図 2 6 】

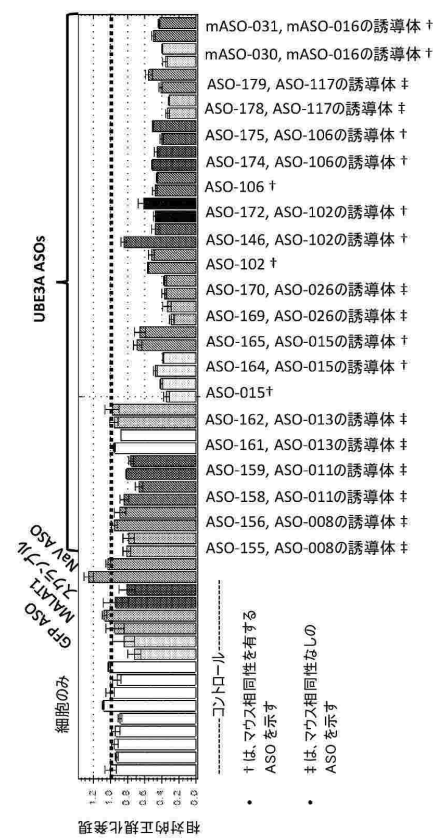


FIG. 26

30

40

50

【 27 】

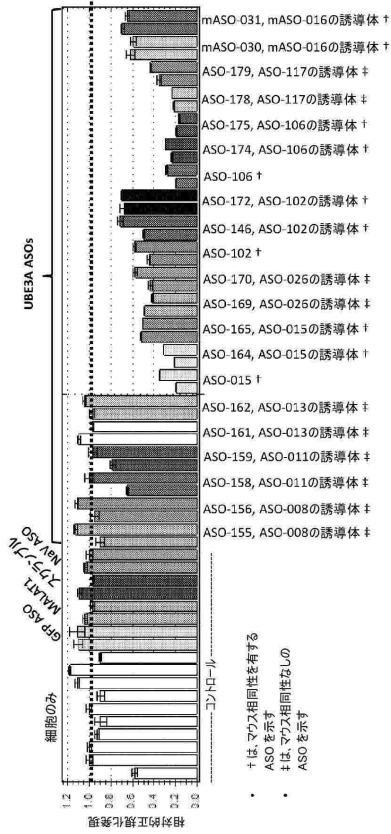


FIG. 27

【 28 】

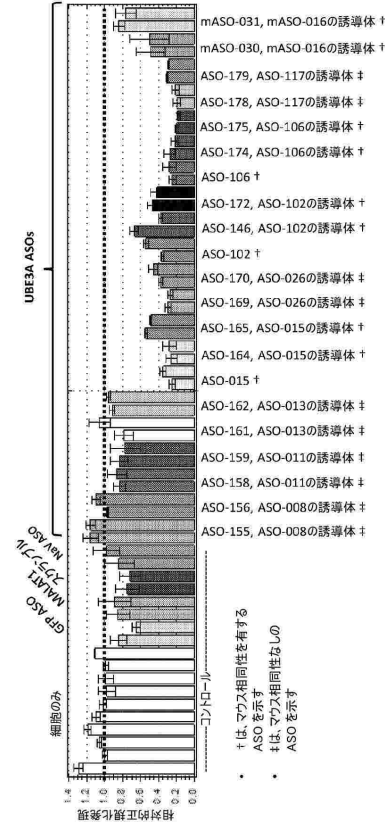


FIG. 28

10

20

30

40

50

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和5年10月27日(2023.10.27)

【 手続補正1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2024506709000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/16842

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC - C12N 15/113; C07H 21/00; A61K 31/7088 (2022.01)
 CPC - C12N 15/113; C12Y 603/02019; C12N 2310/14; C12N 2310/315; C12N 2310/321

10

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	US 2010/0249052 A1 (BENSON et al.) 30 September 2010 (30.09.2010). Especially para [0039], [0069], [0084], SEQ ID NO: 719	1-4, 9-12, 17
Y		5-8, 13, 15, 16
Y	US 2018/0002695 A1 (IONIS PHARMACEUTICALS, INC.) 04 January 2018 (04.01.2018). Especially para [0235],[0307], [0310], [0339], [0370], [0377]	5-8, 13, 15, 16

20

30

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "D" document cited by the applicant in the international application
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
6 May 2022

Date of mailing of the international search report
JUL 29 2022

40

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer
Kari Rodriguez
Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/16842

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

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

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

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

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
----Go to Extra Sheet for continuation----

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-13, 15-17

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/16842

Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+: Claims 1-17, drawn to a composition comprising a synthetic antisense oligonucleotide (ASO) that inhibits expression of a ubiquitin ligase protein. The composition will be searched to the extent that the antisense oligonucleotide (ASO) is the first named, SEQ ID NO: 1. It is believed that claims 1-13, 15-17 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1. Additional antisense oligonucleotides will be searched upon payment of additional fees. Applicant must specify the claims that encompass any additional elected target ASOs. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: SEQ ID NO: 155 (claims 1-17).

10

Group II: Claim 18, drawn to a method of treating Dup15q syndrome by administering an ASO composition that knocks down expression of the UBE3A gene.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Technical Features:

Group I+ has the special technical feature of composition comprising a synthetic antisense oligonucleotide (ASO) that inhibits expression of a ubiquitin ligase protein, not required by Group II.

Group II has the special technical feature of administering an ASO composition to knock-down UBE3A expression and treat Dup15q syndrome, not required by Group I+.

20

No technical features are shared between the antisense oligonucleotide sequences of Group I+ and accordingly, this group lacks unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ inventions and Group II were considered to share the technical features of:

- 1. Group I+ inventions share claim 1.
- 2. Groups I+ and II share the technical feature of an antisense oligonucleotide that knocks-down expression of UBE3A.

However, said shared technical features do not represent a contribution over the prior art, and are disclosed by US 2010/0249052 A1 to Benson et al. (hereinafter "Benson").

As to shared technical feature #1 (claim 1), Benson discloses a composition comprising: a synthetic antisense oligonucleotide (ASO) that inhibits expression of a ubiquitin ligase protein (para [0039]; "As used herein, "E6AP" refers to the ubiquitin protein ligase E3A (ube3A, also referred to as E6-associated protein or E6AP) gene or protein"; claim 1; "A double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) for inhibiting the expression of a human E6AP gene in a cell, wherein said dsRNA comprises at least two sequences that are complementary to each other and wherein a sense strand comprises a first sequence and an antisense strand comprises a second sequence comprising a region of complementarity which is substantially complementary to at least a part of a mRNA encoding E6AP, and wherein said region of complementarity is less than 30 nucleotides in length and wherein said dsRNA, upon contact with a cell expressing said E6AP, inhibits expression of said E6AP gene by at least 40%.")

30

As to shared technical feature #2, Benson discloses an antisense oligonucleotide that knocks-down expression of UBE3A (para [0039], claim 1).

As the shared technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered shared special technical features that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I+ and II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7125(2006.01)	A 6 1 K 31/712	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7125	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 K 47/55 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	
A 6 1 K 47/56 (2017.01)	A 6 1 K 47/55	
	A 6 1 K 47/56	

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

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 フィンク , ジェイムズ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9 - 4 2 3 8 , ケンブリッジ , シドニー ストリー
 ト 1 7 9 , キュー - ステート バイオサイエンシーズ , インコーポレイテッド

(72)発明者 ウィリアムズ , ルイス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9 - 4 2 3 8 , ケンブリッジ , シドニー ストリー
 ト 1 7 9 , キュー - ステート バイオサイエンシーズ , インコーポレイテッド

(72)発明者 リワーク , ケイトリン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9 - 4 2 3 8 , ケンブリッジ , シドニー ストリー
 ト 1 7 9 , キュー - ステート バイオサイエンシーズ , インコーポレイテッド

(72)発明者 ガーバー , デイビッド

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 4 , サマービル , バーナム ストリート 3 3

(72)発明者 ブラウン , ダンカン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9 - 4 2 3 8 , ケンブリッジ , シドニー ストリー
 ト 1 7 9 , キュー - ステート バイオサイエンシーズ , インコーポレイテッド

(72)発明者 アグラワル , スディール

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9 - 4 2 3 8 , ケンブリッジ , シドニー ストリー
 ト 1 7 9 , キュー - ステート バイオサイエンシーズ , インコーポレイテッド

(72)発明者 デンプシー , グラハム ティー .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 6 , サドベリー , パトリッジ レーン 2 7

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC01 CC29 CC41 DD69 EE01 EE41 EE59

4C084 AA13 NA14 ZA021 ZA022 ZA061 ZA062 ZA221 ZA222 ZA941 ZA942
 ZC201 ZC202

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA06 ZA22 ZA94
 ZC20