

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7573966号  
(P7573966)

(45)発行日 令和6年10月28日(2024.10.28)

(24)登録日 令和6年10月18日(2024.10.18)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	Z N A
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	31/7115(2006.01)	A 6 1 K	31/7115	
A 6 1 K	31/712(2006.01)	A 6 1 K	31/712	
A 6 1 K	31/7125(2006.01)	A 6 1 K	31/7125	

請求項の数 9 (全153頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-536091(P2019-536091)  
 (86)(22)出願日 平成30年1月5日(2018.1.5)  
 (65)公表番号 特表2020-505330(P2020-505330  
 A)  
 (43)公表日 令和2年2月20日(2020.2.20)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2018/012672  
 (87)国際公開番号 WO2018/129384  
 (87)国際公開日 平成30年7月12日(2018.7.12)  
 審査請求日 令和2年12月23日(2020.12.23)  
 審判番号 不服2022-16808(P2022-16808/J  
 1)  
 審判請求日 令和4年10月20日(2022.10.20)  
 (31)優先権主張番号 62/443,514  
 (32)優先日 平成29年1月6日(2017.1.6)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関 最終頁に続く

(73)特許権者 518345192  
 アビディティーバイオサイエンシーズ  
 , インク .  
 アメリカ合衆国 92121 カリフォル  
 ニア州 サンディエゴ サイエンス・セン  
 ター・ドライブ 10578 スイート  
 125  
 (74)代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74)代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74)代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74)代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エクソンスキッピングを誘導する核酸ポリペプチド組成物および方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)を処置するための薬剤の製造におけるポリ核酸分子抱合体の使用であって、

ここで、前記ポリ核酸分子抱合体は、抗CD71モノクローナル抗体、および、単鎖オリゴヌクレオチドを含み、ここで、前記抗CD71モノクローナル抗体は2つの重鎖ドメインおよび2つの軽鎖ドメインを含み、

前記抗CD71モノクローナル抗体は、筋細胞の細胞表面上のCD71を認識し、

ここで、前記単鎖オリゴヌクレオチドは、DMD遺伝子の標的とされたmRNA前駆体の転写産物の受容体スプライス部位、供与体スプライス部位、またはエクソンスプライスエンハンサー因子にハイブリダイズし、そして、

ここで、前記単鎖オリゴヌクレオチドは、被験体の全身に投与された場合に、インビボにおいて、前記DMD遺伝子の標的とされたmRNA前駆体の転写産物においてエクソンスキッピングを誘発して、切断型mRNA転写産物を生成し、ここで、前記切断型mRNA転写産物は、未処理の筋細胞中の同じタンパク質と比較して、修飾されるタンパク質をコードし、それによって、被験体の前記DMDを処置する、  
 使用。

## 【請求項2】

前記単鎖オリゴヌクレオチドは、スプライシング事象は、DMD遺伝子のエクソン44、45、50、51、52、53、55、8、23、35、あるいは43におけるエクソ

ンスキッピングを誘発する、請求項1に記載の使用。

**【請求項3】**

前記ポリ核酸分子抱合体は、式(I)の構造を含み、

A - X - B

式I

式中、

Aは、2つの重鎖ドメインおよび2つの軽鎖ドメインを含む、前記抗CD71モノクローナル抗体を含み、

Bは前記単鎖オリゴヌクレオチドからなり、そして、

Xは単結合または第1のリンカーからなる、

請求項1または2に記載の使用。

10

**【請求項4】**

前記ポリ核酸分子抱合体は随意に、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチド、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも1つの逆脱塩基部分を含む、請求項1-3のいずれか1つに記載の使用。

**【請求項5】**

前記少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、モルホリノ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル(2'-O-MOE)、2'-O-アミノプロピル、2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-メチルアセトアミド(2'-O-NMA)修飾ヌクレオチド、ロックド核酸(LNA)、エチレン核酸(ENA)、またはペプチド核酸(PNA)を含む、請求項4に記載の使用。

**【請求項6】**

前記少なくとも1つの逆脱塩基部分は少なくとも1つの末端である、請求項4または5に記載の使用。

**【請求項7】**

前記少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合あるいはジチオリン酸結合を含む、請求項4-6のいずれか1つに記載の使用。

30

**【請求項8】**

前記ポリ核酸分子抱合体は、約1:1、2:1、3:1、または4:1の単鎖オリゴヌクレオチドと抗体との比を有する、請求項1-7のいずれか1つに記載の使用。

**【請求項9】**

Xは単結合またはC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル基である、請求項3-8のいずれか1つに記載の使用。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

相互参照

40

本出願は、2017年9月22日に出願された米国仮特許出願第62/561,939号の利益と、2017年1月6日に出願された米国仮特許出願第62/443,514号の利益を主張するものであり、当該文献はそれぞれ、全体として参照により本明細書に組み込まれる。

**【0002】**

配列表

本出願は配列表を包含しており、これは、ASCIIフォーマットで電子的に提出され、その全体を引用することで本明細書に組み込まれる。2017年12月22日に作成された上記ASCIIのコピーは、45532-715\_601\_SL.txtのファイル名であり、210,534バイトのサイズである。

50

## 【背景技術】

## 【0003】

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

## 【発明の概要】

10

## 【0004】

本明細書では、特定の実施形態において、RNAプロセシングを調節するための分子および医薬組成物が開示される。

## 【0005】

本明細書では、ある実施形態において、被験体の誤ってスプライシングされたmRNA転写産物によって引き起こされた疾患または障害を処置する方法が開示され、該方法は、被験体にポリ核酸分子抱合体を投与する工程を含み、ここで、ポリ核酸分子抱合体は細胞標的結合部分に共役し、ここで、ポリヌクレオチドは隨意に、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチド、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも1つの逆脱塩基部分を含み、ここで、ポリ核酸分子抱合体は、完全に処理されたmRNA転写産物を生成するために、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物中のエクソンスキッピングまたはエクソンインクルージョンを誘発するべく、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物の挿入、欠失、重複、あるいは改質を誘発し、および、ここで、完全に処理されたmRNA転写産物は、機能タンパク質をコードし、それによって、被験体の疾患または障害を処置する。いくつかの実施形態において、疾患または障害はさらに、mRNA中の1つ以上の突然変異を特徴とする。いくつかの実施形態において、疾患または障害は、神経筋疾患、遺伝病、癌、遺伝性疾患、あるいは心血管疾患を含む。いくつかの実施形態において、疾患または障害は筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態において、疾患または障害はデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態において、エクソンスキッピングは、DMD遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または、55のものである。いくつかの実施形態において、エクソンスキッピングはDMD遺伝子のエクソン23のものである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(I)の構造を含み、

A - X - B

式I

式中、

Aは結合部分を含み、

Bはポリヌクレオチドからなり、および、

Xは単結合または第1のリンカーからなる。

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(II)の構造を含み、

A - X - B - Y - C

式II

式中、

Aは結合部分を含み、

Bはポリヌクレオチドからなり、

Cはポリマーからなり、

Xは単結合または第1のリンカーからなり、および、

Yは単結合または第2のリンカーからなる。

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(III)の構造を含み、

A - X - C - Y - B

20

30

40

50

## 式 I I I

式中、

A は結合部分を含み、  
B はポリヌクレオチドからなり、  
C はポリマーからなり、

X は単結合または第 1 のリンカーからなり、および、

Y は単結合または第 2 のリンカーからなる。

いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチドは、モルホリノ、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル (2' - O - M O E)、2' - O - アミノプロピル、2' - デオキシ、T - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル (2' - O - A 10 P)、2' - O - ジメチルアミノエチル (2' - O - D M A O E)、2' - O - ジメチルアミノプロピル (2' - O - D M A P)、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル (2' - O - D M A E O E)、または、2' - O - N - メチルアセトアミド (2' - O - N M A) 修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチドは、ロックド核酸 (L N A)、エチレン核酸 (E N A)、あるいはペプチド核酸 (P N A) を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの逆塩基部分は少なくとも 1 つの末端である。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合あるいはジチオリン酸結合を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約 10 から約 30 ヌクレオチド長さである。  
20 いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、約 15 から約 30、約 18 から約 25、約 18 から約 24、約 19 から約 23、約 20 から約 22 ヌクレオチド長さの少なくとも 1 つである。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約 16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 5 % から約 10 0 % の修飾、約 10 0 % から約 100 0 % の修飾、約 20 0 % から約 100 0 % の修飾、約 30 0 % から約 100 0 % の修飾、約 40 0 % から約 100 0 % の修飾、約 50 0 % から約 100 0 % の修飾、約 60 0 % から約 100 0 % の修飾、約 70 0 % から約 100 0 % の修飾、約 80 0 % から約 10 0 % の修飾、および、約 90 0 % から約 100 0 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 0 % から約 90 0 % の修飾、約 20 0 % から約 90 0 % の修飾、約 30 0 % から約 90 0 % の修飾、約 40 0 % から約 90 0 % の修飾、約 50 0 % から約 90 0 % の修飾、約 60 0 % から約 90 0 % の修飾、約 70 0 % から約 90 0 % の修飾、および、約 80 0 % から約 100 0 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 0 % から約 80 0 % の修飾、約 20 0 % から約 80 0 % の修飾、約 30 0 % から約 80 0 % の修飾、約 50 0 % から約 80 0 % の修飾、約 60 0 % から約 80 0 % の修飾、および、約 70 0 % から約 80 0 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 0 % から約 70 0 % の修飾、約 20 0 % から約 70 0 % の修飾、約 30 0 % から約 70 0 % の修飾、約 40 0 % から約 70 0 % の修飾、約 50 0 % から約 70 0 % の修飾、および、約 60 0 % から約 70 0 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 0 % から約 60 0 % の修飾、約 30 0 % から約 60 0 % の修飾、約 40 0 % から約 60 0 % の修飾、約 60 0 % の修飾、および約 50 0 % から約 60 0 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 0 % から約 50 0 % の修飾、約 20 0 % から約 50 0 % の修飾、および約 40 0 % から約 50 0 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 0 % から約 40 0 % の修飾、約 20 0 % から約 40 0 % の修飾、および約 30 0 % から約 40 0 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 0 % から約 30 0 % の修飾、および約 20 0 % から約 30 0 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 10 0 % から約 20 0 % の修飾を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 15 0 % から約 90 0 %、約 20 0 % から約 80 0 %、約 30 0 % から約 70 0 %、あるいは  
30  
40  
50

は約40%から約60%の修飾を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は少なくとも約15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の修飾を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は少なくとも約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、または約22以上の修飾を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、またはそれ以上の修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は一本鎖を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は二本以上の鎖を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、二本鎖ポリ核酸分子を形成するために、第1のポリヌクレオチドと、第1のポリヌクレオチドにハイブリダイズされた第2のポリヌクレオチドとを含む。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドは少なくとも1つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはRNA分子である。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはs i RNA分子である。いくつかの実施形態において、XとYは独立して、単結合、分解性リンカー、非分解性リンカー、切断リンカー、あるいは非ポリマーリンカー基である。いくつかの実施形態において、Xは単結合である。いくつかの実施形態において、XはC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル基である。いくつかの実施形態において、YはC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル基である。いくつかの実施形態において、Xは、随意にC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル基に共役した、ホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態において、Yはホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態では、結合部分は、抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab2、一本鎖可変フラグメント(scfv)、ダイアボディ、ミニボディ(minibody)、ナノボディ、單一ドメイン抗体(sdAb)、またはラクダ抗体、あるいはその結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、Cはポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態では、Cは約5,000Daの分子量を有する。いくつかの実施形態において、A-XはBの5'末端へ共役し、Y-CはBの3'末端へ共役する。いくつかの実施形態において、Y-CはBの5'末端へ共役し、A-XはBの3'末端へ共役する。いくつかの実施形態において、A-X、Y-C、またはその組み合わせはヌクレオチド間結合群に共役する。いくつかの実施形態では、方法はDをさらに含む。いくつかの実施形態において、DはCあるいはAに共役する。いくつかの実施形態において、Dは、式(I V)に係る式(I I)の分子抱合体に共役し、

(A-X-B-Y-C<sub>c</sub>) - L - D

式 I V

式中、

Aは結合部分を含み、

Bはポリヌクレオチドからなり、

Cはポリマーからなり、

Xは単結合または第1のリンカーからなり、

Yは単結合または第2のリンカーからなり、

Lは単結合または第3のリンカーからなり、

Dはエンドソーム溶解性部分からなり、および、

cは0と1の間の整数であり、

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

いくつかの実施形態では、DはINF7またはメリチンである。いくつかの実施形態では

10

20

30

40

50

、LはC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル基である。いくつかの実施形態において、Lはホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態において、方法はさらに少なくとも第2の結合部分Aを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも第2の結合部分Aは、A、B、またはCに共役する。

【0006】

いくつかの実施形態において、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物中のエクソンスキッピングあるいはエクソンインクルージョンを誘発するために、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物の挿入、欠失、重複、または改質を誘発する方法が本明細書で開示され、前記方法が：標的細胞をポリ核酸分子抱合体に接触させる工程であって、ポリヌクレオチドが、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチド、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも1つの逆脱塩基部分を含む、結合と、エクソンスキッピングまたはエクソンインクルージョンを誘発するために、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物の挿入、欠失、重複あるいは改質を誘発するべく、標的細胞内の誤ってスプライシングされたmRNA転写産物へポリ核酸分子抱合体をハイブリダイズする工程であって、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物がタンパク質の機能形態をコードすることができる、工程と、および、前の工程の完全に処理されたmRNA転写産物のタンパク質の機能形態を翻訳する工程を、含む。いくつかの実施形態において、標的細胞は被験体の標的細胞である。いくつかの実施形態において、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物はさらに疾患または障害を誘発する。いくつかの実施形態において、疾患または障害はさらに、mRNA中の1つ以上の突然変異を特徴とする。いくつかの実施形態において、疾患または障害は、神経筋疾患、遺伝病、癌、遺伝性疾患、あるいは心血管疾患を含む。いくつかの実施形態において、疾患または障害は筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態において、疾患または障害はデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。いくつかの実施形態において、エクソンスキッピングは、DMD遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または、55のものである。いくつかの実施形態において、エクソンスキッピングはDMD遺伝子のエクソン23のものである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(I)の構造を含み、

A - X - B

式I

式中、

Aは結合部分を含み、

Bはポリヌクレオチドからなり、および、

Xは単結合または第1のリンカーからなる。

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(II)の構造を含み、

A - X - B - Y - C

式II

式中、

Aは結合部分を含み、

Bはポリヌクレオチドからなり、

Cはポリマーからなり、

Xは単結合または第1のリンカーからなり、および、

Yは単結合または第2のリンカーからなる。

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(III)の構造を含み、

A - X - C - Y - B

式III

式中、

Aは結合部分を含み、

Bはポリヌクレオチドからなり、

Cはポリマーからなり、

10

20

30

40

50

X は単結合または第 1 のリンカーからなり、および、  
Y は単結合または第 2 のリンカーからなる。

いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチドは、モルホリノ、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル (2' - O - M O E)、2' - O - アミノプロピル、2' - デオキシ、T - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル (2' - O - A P)、2' - O - ジメチルアミノエチル (2' - O - D M A O E)、2' - O - ジメチルアミノプロピル (2' - O - D M A P)、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル (2' - O - D M A E O E)、または、2' - O - N - メチルアセトアミド (2' - O - N M A) 修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチドは、ロックド核酸 (L N A)、エチレン核酸 (E N A)、ペプチド核酸 (P N A) を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの逆塩基部分は少なくとも 1 つの末端である。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合あるいはジチオリン酸結合を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約 10 から約 30 ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、約 15 から約 30、約 18 から約 25、約 18 から約 24、約 19 から約 23、約 20 から約 22 ヌクレオチド長さの少なくとも 1 つである。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約 16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 5 % から約 100 % の修飾、約 10 % から約 100 % の修飾、約 20 % から約 100 % の修飾、約 30 % から約 100 % の修飾、約 40 % から約 100 % の修飾、約 50 % から約 100 % の修飾、約 60 % から約 100 % の修飾、約 70 % から約 100 % の修飾、約 80 % から約 100 % の修飾、および、約 90 % から約 100 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 % から約 90 % の修飾、約 20 % から約 90 % の修飾、約 30 % から約 90 % の修飾、約 40 % から約 90 % の修飾、約 50 % から約 90 % の修飾、約 60 % から約 90 % の修飾、約 70 % から約 90 % の修飾、および、約 80 % から約 100 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 % から約 80 % の修飾、約 20 % から約 80 % の修飾、約 30 % から約 80 % の修飾、約 40 % から約 80 % の修飾、および、約 70 % から約 80 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 % から約 70 % の修飾、約 20 % から約 70 % の修飾、約 30 % から約 70 % の修飾、約 40 % から約 70 % の修飾、および、約 60 % から約 70 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 % から約 60 % の修飾、約 20 % から約 60 % の修飾、約 30 % から約 60 % の修飾、および約 50 % から約 60 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 % から約 50 % の修飾、約 20 % から約 50 % の修飾、約 30 % から約 50 % の修飾、および約 40 % から約 50 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 % から約 40 % の修飾、約 20 % から約 40 % の修飾、および約 30 % から約 40 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 10 % から約 30 % の修飾。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 10 % から約 20 % の修飾を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 15 % から約 90 %、約 20 % から約 80 %、約 30 % から約 70 %、あるいは約 40 % から約 60 % の修飾を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は少なくとも約 15 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、または 99 % の修飾を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は少なくとも約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、または約 22 以上の修飾

10

20

30

40

50

を含む。いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、またはそれ以上の修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は一本鎖を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は二本以上の鎖を含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、二本鎖ポリ核酸分子を形成するために、第1のポリヌクレオチドと、第1のポリヌクレオチドにハイブリダイズされた第2のポリヌクレオチドとを含む。いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドは少なくとも1つの修飾を含む。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはRNA分子である。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはsingle RNA分子である。いくつかの実施形態において、XとYは独立して、単結合、分解性リンカー、非分解性リンカー、切断リンカー、あるいは非ポリマーリンカー基である。いくつかの実施形態において、Xは単結合である。いくつかの実施形態において、XはC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル基である。いくつかの実施形態において、YはC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル基である。いくつかの実施形態において、Xは、随意にC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル基に共役した、ホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態において、Yはホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態では、結合部分は、抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体またはその結合フラグメントは、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価Fab'、二価Fab2、一本鎖可変フラグメント(scfv)、ダイアボディ、ミニボディ(minibody)、ナノボディ、單一ドメイン抗体(sdAb)、またはラクダ抗体、あるいはその結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、Cはポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態では、Cは約5,000Daの分子量を有する。いくつかの実施形態において、A-XはBの5'末端へ共役し、Y-CはBの3'末端へ共役する。いくつかの実施形態において、Y-CはBの5'末端へ共役し、A-XはBの3'末端へ共役する。いくつかの実施形態において、A-X、Y-C、またはその組み合わせはヌクレオチド間結合群に共役する。いくつかの実施形態では、方法はDをさらに含む。いくつかの実施形態において、DはCあるいはAに共役する。いくつかの実施形態において、Dは、式(IV)に係る式(II)の分子抱合体に共役し、

(A-X-B-Y-C<sub>c</sub>) - L - D

式IV

式中、

Aは結合部分を含み、

Bはポリヌクレオチドからなり、

Cはポリマーからなり、

Xは単結合または第1のリンカーからなり、

Yは単結合または第2のリンカーであり、

Lは単結合または第3のリンカーからなり、

Dはエンドゾーム溶解性部分からなり、および、

cは0と1の間の整数であり、

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

いくつかの実施形態では、DはINF7またはメリチンである。いくつかの実施形態では、LはC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル基である。いくつかの実施形態において、Lはホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの実施形態において、方法はさらに少なくとも第2の結合部分Aを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも第2の結合部分Aは、A、B、またはCに共役する。いくつかの実施形態において、方法はインビボ方法である。いくつかの実施形態において、方法はインビトロ方法である。いくつ

10

20

30

40

50

かの実施形態では、被験体はヒトである。

【0007】

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

【0008】

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

【0009】

ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体を含む組成物が本明細書で開示され、ここで、ポリ核酸分子抱合体は、SEQ ID NO: 54 - 972 に対して少なくとも 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドを含んでいる。ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体を含む組成物が本明細書で開示され、ここで、ポリ核酸分子抱合体は、SEQ ID NO: 54 - 972 に対して少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を有する配列を含むポリヌクレオチドを含んでいる。ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(I)の構造を含み、

A - X - B

式 I

式中、

A は結合部分を含み、

B はポリヌクレオチドからなり、および、

X は単結合または第1のリンカーからなる。

ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(II)の構造を含み、

A - X - B - Y - C

式 II

式中、

A は結合部分を含み、

B はポリヌクレオチドからなり、

C はポリマーからなり、

X は単結合または第1のリンカーからなり、および、

Y は単結合または第2のリンカーからなる。

ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式(III)の構造を含み、

A - X - C - Y - B

式 III

式中、

A は結合部分を含み、

B はポリヌクレオチドからなり、

C はポリマーからなり、

X は単結合または第1のリンカーからなり、および、

Y は単結合または第2のリンカーからなる。

ある実施形態において、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、モルホリノ、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル(2' - O - M O E)、2' - O - アミノプロピル、2' - デオキシ、T - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル(2' - O - A P)、2' - O - ジメチルアミノエチル(2' - O - D M A O E)、2' - O - ジメチルアミノプロピル(2' - O - D M A P)、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル(2' - O - D M A E O E)、または、2' - O - N - メチルアセトアミド(2' - O - N M A)修飾ヌ

10

20

30

40

50

クレオチドを含む。ある実施形態において、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチドはモルホリノを含む。

【 0 0 1 0 】

ある実施形態において、疾患または障害を処置する方法が本明細書で開示され、該方法は、被験体にポリ核酸分子抱合体を投与する工程を含み、ポリ核酸分子抱合体が、標的細胞結合部分と、標的とされた m R N A 前駆体特異的スプライス調節ポリ核酸部分とを含み、標的細胞結合部分が標的とされた細胞に特異的に結合し、および、標的とされた m R N A 前駆体特異的スプライス調節ポリ核酸部分が、m R N A 転写産物を生成するために、標的とされた m R N A 前駆体の転写産物においてスプライシング事象を誘発するべく、標的とされた細胞中の標的とされた m R N A 前駆体の転写産物の挿入、欠失、重複、あるいは改質を誘発し、および、m R N A 転写産物は、未処理の標的細胞中の同じタンパク質と比較して、修飾されるタンパク質をコードし、それによって、被験体の疾患または障害を処置する。ある実施形態では、スプライシング事象はエクソンスキッピングである。ある実施形態では、スプライシング事象はエクソンインクルージョンである。ある実施形態において、疾患または障害はさらに、m R N A 前駆体中の 1 つ以上の突然変異を特徴とする。ある実施形態において、疾患または障害は、神経筋疾患、遺伝病、癌、遺伝性疾患、あるいは心血管疾患を含む。ある実施形態において、疾患または障害は筋ジストロフィーである。ある実施形態において、疾患または障害はデュシェンヌ型筋ジストロフィーである。ある実施形態において、スプライシング事象は、D M D 遺伝子のエクソン 8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または、55 のものである。ある実施形態において、スプライシング事象は D M D 遺伝子のエクソン 23 のものである。ある実施形態では、スプライシング事象は P A H、M S T N、または K - R a s 遺伝子のエクソンのものである。ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式 ( I ) の構造を含み、

A - X - B

式 I

式中、

A は結合部分を含み、

B はポリヌクレオチドからなり、および、

X は単結合または第 1 のリンカーからなる。

ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式 ( I I ) の構造を含み、

A - X - B - Y - C

式 I I

式中、

A は結合部分を含み、

B はポリヌクレオチドからなり、

C はポリマーからなり、

X は単結合または第 1 のリンカーからなり、および、

Y は単結合または第 2 のリンカーからなる。

ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、式 ( I I I ) の構造を含み、

A - X - C - Y - B

式 I I I

式中、

A は結合部分を含み、

B はポリヌクレオチドからなり、

C はポリマーからなり、

X は単結合または第 1 のリンカーからなり、および、

Y は単結合または第 2 のリンカーからなる。

ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は隨意に、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチド、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも 1 つの逆脱塩基部分を含む。ある実施形態において、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチドは、モル

10

20

30

40

50

ホリノ、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル(2' - O - M O E)、2' - O - アミノプロピル、2' - デオキシ、T - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル(2' - O - A P)、2' - O - ジメチルアミノエチル(2' - O - D M A O E)、2' - O - ジメチルアミノプロピル(2' - O - D M A P)、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル(2' - O - D M A E O E)、または、2' - O - N - メチルアセトアミド(2' - O - N M A)修飾ヌクレオチドを含む。ある実施形態において、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドは、ロックド核酸(L N A)、エチレン核酸(E N A)、あるいはペプチド核酸(P N A)を含む。ある実施形態において、少なくとも1つの2'修飾ヌクレオチドはモルホリノを含む。ある実施形態において、少なくとも1つの逆塩基部分は少なくとも1つの末端である。ある実施形態において、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合あるいはジチオリン酸結合を含む。ある実施形態において、ポリ核酸分子は、少なくとも約10から約30ヌクレオチド長さを含む。ある実施形態において、ポリ核酸分子は少なくとも約15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の修飾を含む。ある実施形態において、ポリ核酸分子は一本鎖を含む。ある実施形態において、ポリ核酸分子は二本以上の鎖を含む。ある実施形態において、ポリ核酸分子は、二本鎖ポリ核酸分子を形成するために、第1のポリヌクレオチドと、第1のポリヌクレオチドにハイブリダイズされた第2のポリヌクレオチドとを含む。ある実施形態において、第2のポリヌクレオチドは少なくとも1つの修飾を含む。ある実施形態において、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはR N A分子を含む。ある実施形態において、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドはs i R N A分子を含む。ある実施形態において、Xは単結合である。ある実施形態において、XとYは独立して、単結合、分解性リンカー、非分解性リンカー、切断リンカー、あるいは非ポリマーリンカー基である。ある実施形態において、XとYは独立して、単結合、分解性リンカー、非分解性リンカー、切断リンカー、あるいは非ポリマーリンカー基である。ある実施形態において、XはC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル基である。ある実施形態において、XまたはYはC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル基である。ある実施形態において、結合部分は、抗体またはその結合フラグメントである。ある実施形態において、結合部分は、抗体またはその結合フラグメントである。ある実施形態において、Cはポリエチレンギリコールである。ある実施形態において、Cはポリエチレンギリコールである。ある実施形態において、A - XはBの5'末端へ共役し、Y - CはBの3'末端へ共役する。ある実施形態において、Y - CはBの5'末端へ共役し、A - XはBの3'末端へ共役する。いくつかの実施形態では、方法はDをさらに含む。ある実施形態において、DはCまたはAに共役する。ある実施形態において、方法はさらに少なくとも第2の結合部分Aを含む。ある実施形態において、方法はさらに少なくとも第2の結合部分Aを含む。ある実施形態において、方法はさらに少なくとも第2の結合部分Aを含む。

### 【0011】

ある実施形態において、標的とされたm R N A前駆体の転写産物においてスプライシング事象を誘発する方法が本明細書で開示され、該方法は、(a)標的細胞をポリ核酸分子抱合体に接触させる工程であって、ポリ核酸分子抱合体が、標的細胞結合部分とポリ核酸部分を調節する標的とされたm R N A前駆体スプライスとを含む、工程と、(b)m R N A転写産物を產生するために標的とされたm R N A前駆体の転写産物においてスプライシング事象を誘発するべく、標的細胞内の標的とされたm R N A前駆体の転写産物へ、ポリ核酸部分を調節する標的とされたm R N A前駆体スプライスをハイブリダイズする工程と、(c)タンパク質を產生するために標的細胞において工程(b)のm R N A転写産物を随意に翻訳する工程を含む。ある実施形態では、スプライシング事象はエクソンスキッピングである。ある実施形態では、スプライシング事象はエクソンインクルージョンである。ある実施形態では、標的とされたm R N A前駆体の転写産物が疾患または障害を誘発する。ある実施形態において、疾患または障害は、神経筋疾患、遺伝病、癌、遺伝性疾患、

あるいは心血管疾患を含む。ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、

a ) 式 ( I ) の構造を含み、

A - X - B

式 I

式中、

A は結合部分を含み、

B はポリヌクレオチドからなり、および、

X は単結合または第 1 のリンカーからなり、

b ) 化式 ( I I ) の構造を含み、

A - X - B - Y - C

10

式 I I

式中、

A は結合部分を含み、

B はポリヌクレオチドからなり、

C はポリマーからなり、

X は単結合または第 1 のリンカーからなり、および、

Y は単結合または第 2 のリンカーからなり、または、

c ) 化式 ( I I I ) の構造を含み、

A - X - C - Y - B

20

式 I I I

式中、

A は結合部分を含み、

B はポリヌクレオチドからなり、

C はポリマーからなり、

X は単結合または第 1 のリンカーからなり、および、

Y は単結合または第 2 のリンカーからなる。

ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は隨意に、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチド、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチド間結合、あるいは少なくとも 1 つの逆脱塩基部分を含む。ある実施形態において、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチドは、モルホリノ、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル ( 2' - O - M O E )、2' - O - アミノプロピル、2' - O - デオキシ、T - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル ( 2' - O - A P )、2' - O - ジメチルアミノエチル ( 2' - O - D M A O E )、2' - O - ジメチルアミノプロピル ( 2' - O - D M A P )、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル ( 2' - O - D M A E O E )、または、2' - O - N - メチルアセトアミド ( 2' - O - N M A ) 修飾ヌクレオチドを含む。ある実施形態において、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチドは、ロックド核酸 ( L N A )、エチレン核酸 ( E N A )、ペプチド核酸 ( P N A ) を含む。ある実施形態において、少なくとも 1 つの 2' 修飾ヌクレオチドはモルホリノを含む。ある実施形態において、少なくとも 1 つの逆塩基部分は少なくとも 1 つの末端である。ある実施形態において、少なくとも 1 つの修飾されたヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合あるいはジチオリン酸結合を含む。ある実施形態において、ポリ核酸分子は、少なくとも約 10 から約 30 ヌクレオチド長さを含む。ある実施形態において、ポリ核酸分子は少なくとも約 15 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、または 99 % の修飾を含む。ある実施形態において、ポリ核酸分子は少なくとも約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、または約 22 以上の修飾を含む。ある実施形態において、X と Y は独立して、単結合、分解性リンカー、非分解性リンカー、切断リンカー、あるいは非ポリマーリンカー基である。ある実施形態において、X は単結合である。ある実施形態において、X は C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル基である。ある実施形態において、Y は C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル基である。ある実施形態において、X は、隨意に C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル基に共役した、ホモ二機能性リンカーあるいはヘテ

40

50

口二機能性リンカーである。ある実施形態において、Yはホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。ある実施形態において、結合部分は、抗体またはその結合フラグメントである。ある実施形態において、Cはポリエチレングリコールである。ある実施形態において、A-XはBの5'末端へ共役し、Y-CはBの3'末端へ共役する。ある実施形態において、Y-CはBの5'末端へ共役し、A-XはBの3'末端へ共役する。ある実施形態において、A-X、Y-C、またはその組み合わせはヌクレオチド間結合群に共役する。いくつかの実施形態では、方法はDをさらに含む。ある実施形態において、DはCまたはAに共役する。ある実施形態において、方法はさらに少なくとも第2の結合部分Aを含む。

## 【0012】

10

ある実施形態において、標的細胞結合部分と、標的とされたmRNA前駆体特異的スプライス調節ポリ核酸部分とを含むポリ核酸分子抱合体組成物が本明細書で開示され、標的とされたmRNA前駆体特異的スプライス調節ポリ核酸部分は、SEQ ID NO: 54-972に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する配列を含む。ある実施形態において、ポリ核酸分子抱合体は、

a) 式(I)の構造を含み、

A-X-B

式I

式中、

20

Aは結合部分を含み、

Bはポリヌクレオチドからなり、および、

Xは単結合または第1のリンカーからなり、

b) 化式(II)の構造を含み、

A-X-B-Y-C

式II

式中、

Aは結合部分を含み、

Bはポリヌクレオチドからなり、

Cはポリマーからなり、

30

Xは単結合または第1のリンカーからなり、および、

Yは単結合または第2のリンカーからなり、または、

c) 化式(III)の構造を含み、

A-X-C-Y-B

式III

式中、

Aは結合部分を含み、

Bはポリヌクレオチドからなり、

Cはポリマーからなり、

Xは単結合または第1のリンカーからなり、および、

40

Yは単結合または第2のリンカーからなる。

ある実施形態において、医薬組成物はナノ粒子製剤として製剤される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0013】

【図1】末端ヌクレオチドを拡張したホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(SEQ ID NO: 28)。

【図2A】末端ヌクレオチドを拡張したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド(SEQ ID NO: 29)。

【図2B-1】完全に拡張したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド(SEQ ID NO: 29)。

50

【図2B-2】完全に拡張したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド(PSASO)配列(SEQ ID NO: 29)を描く。

【図2B-3】完全に拡張したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド(PSASO)配列(SEQ ID NO: 29)を描く。

【図2B-4】完全に拡張したホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド(PSASO)配列(SEQ ID NO: 29)を描く。

【図3】Taqman qPCRを使用した、全RNAにおけるスキップされたMDmRNAを定量化するために使用される方法を描く。

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

10

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

【図5B】サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)方法1を使用した、產生された抗CD71 mAb-PMODAR1, 2のクロマトグラムを描く。

【図5C】サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)方法1を使用した、產生された抗CD71 mAb-PMODAR>2のクロマトグラムを描く。

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

【図6B】疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)方法2を使用した、產生された精製された抗CD71 mAb-PMODAR1, 2抱合体のクロマトグラムを描く。

20

【図6C】疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)方法2を使用した、產生された精製された抗CD71 mAb-PMODAR>2抱合体のクロマトグラムを描く。

【図7A】疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)方法3を使用した、抗CD71 Fab-PMOの高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)精製のクロマトグラムを描く。

【図7B】SEC方法1を使用した、產生された抗CD71 Fabのクロマトグラムを描く。

【図7C】SEC方法1を使用した、產生された抗CD71 Fab-PMODAR1抱合体のクロマトグラムを描く。

【図7D】SEC方法1を使用した、產生された抗CD71 Fab-PMODAR2抱合体のクロマトグラムを描く。

30

【図7E】SEC方法1を使用した、產生された抗CD71 Fab-PMODAR3抱合体のクロマトグラムを描く。

【図7F】HIC方法4を使用した、產生された抗CD71 Fabのクロマトグラムを描く。

【図7G】HIC方法4を使用した、產生された抗CD71 Fab-PMODAR1抱合体のクロマトグラムを描く。

【図7H】HIC方法4を使用した、產生された抗CD71 Fab-PMODAR2抱合体のクロマトグラムを描く。

【図7I】HIC方法4を使用した、產生された抗CD71 Fab-PMODAR3抱合体のクロマトグラムを描く。

40

【図8A】SAX方法2を使用して產生された抗CD71 mAb-PSASO反応混合物のクロマトグラムを描く。

【図8B】SEC方法1を使用した、產生された抗CD71 mAbのクロマトグラムを描く。

【図8C】SEC方法1を使用した、產生された抗CD71 mAb-PSASODAR1抱合体のクロマトグラムを描く。

【図8D】SEC方法1を使用した、產生された抗CD71 mAb-PSASODAR2抱合体のクロマトグラムを描く。

【図8E】SEC方法1を使用した、產生された抗CD71 mAb-PSASODA

50

R 3 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 8 F】SAX 方法 2 を使用した、産生された抗 CD71 mAb - PS ASO DA R 1 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 8 G】SAX 方法 2 を使用した、産生された抗 CD71 mAb - PS ASO DA R 2 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 8 H】SAX 方法 2 を使用した、産生された抗 CD71 mAb - PS ASO DA R 3 抱合体のクロマトグラムを描く。

【図 9】PMO および抗 CD71 mAb - PMO 抱合体を使用した、分化した C2C12 細胞におけるエクソン 23 スキッピングを検出するネスティッド PCR のアガロースゲルを描く。

【図 10】PMO、抗 CD71 mAb - PMO、および抗 CD71 mAb - PMO 抱合体を使用した、分化した C2C12 細胞におけるエクソン 23 スキッピングを検出するネスティッド PCR のアガロースゲルを描く。

【図 11】PMO、ASO、DAR1 (「ASC - DAR1」) の共役した抗 CD71 mAb - ASO、DAR2 (「ASC - DAR2」) の共役した抗 CD71 mAb - ASO、および、DAR3 (「ASC - DAR3」) の共役した抗 CD71 mAb - ASO を使用した、分化した C2C12 細胞におけるエクソン 23 スキッピングを検出するネスティッド PCR のアガロースゲルを描く。

【図 12 A】抗 CD71 mAb - PMO 抱合体の単回静脈内注射を投与された野生型のマウスの腓腹筋においてエクソン 23 スキッピングを検出するネスティッド PCR のアガロースゲルを描く。

【図 12 B】腓腹筋からの PCR 産物の定量化のグラフである。

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

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

【図 13 B】心臓筋からの PCR 産物の定量化のグラフである。

【図 14】スキッピングされた野生型の PCR 産物 (それぞれ SEQ ID NOS 976 - 977) からの DNA フラグメントの配列決定データを描く。

【図 15 A】Taqman qPCR を使用した、腓腹筋における野生型マウス中のインビボのエクソンスキッピングの定量化のグラフである。

【図 15 B】ネスティッド PCR を使用した、腓腹筋における野生型マウス中のインビボのエクソンスキッピングの定量化のグラフである。

【図 15 C】Taqman qPCR を使用した、横隔膜筋における野生型マウス中のインビボのエクソンスキッピングの定量化のグラフである。

【図 15 D】ネスティッド PCR を使用した、横隔膜筋における野生型マウス中のインビボのエクソンスキッピングの定量化のグラフである。

【図 15 E】Taqman qPCR を使用した、心臓筋における野生型マウス中のインビボのエクソンスキッピングの定量化のグラフである。

【図 15 F】ネスティッド PCR を使用した、心臓筋における野生型マウス中のインビボのエクソンスキッピングの定量化のグラフである。

【図 16 A】単回の静脈内 (i.v.) 注射後に野生型マウスにおける横隔膜筋組織中の MSTN エクソン 2 スキッピングの CD71 mAb - PMO 抱合体誘導を検出する PCR のアガロースゲルを描く。

【図 16 B】単回の静脈内 (i.v.) 注射後に野生型マウスにおける心臓筋組織中の MSTN エクソン 2 スキッピングの CD71 mAb - PMO 抱合体誘導を検出する PCR のアガロースゲルを描く。

【図 16 C】単回の静脈内 (i.v.) 注射後に野生型マウスにおける腓腹筋組織中の MSTN エクソン 2 スキッピングの CD71 mAb - PMO 抱合体誘導を検出する PCR のアガロースゲルを描く。

10

20

30

40

50

【図17】初代マウス肝細胞におけるP A Hエクソン11スキッピングのA S G P R m A b - P M O抱合体誘導を検出するP C Rのアガロースゲルを描く。

【図18】単回の静脈内(i.v.)注射後に野生型マウスの肝臓中のP A Hエクソン11スキッピングのA S G P R m A b - P M O抱合体誘導を検出するP C Rのアガロースゲルを描く。

【発明を実施するための形態】

【0014】

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

10

【0015】

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

20

【0016】

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

30

【0017】

R N Aプロセシング

R N Aは遺伝子発現と細胞生理の調節における中心的な役割を有する。R N Aの適切なプロセシングは機能タンパク質の翻訳のために重要である。R N Aの誤ったスプライシングの結果などのR N Aプロセシングの改質は疾患をもたらす可能性がある。例えば、スプライス部位の突然変異は、早熟な終止コドンの曝露、エクソンの喪失、あるいはイントロンのインクルージョンを引き起こす。いくつかの例では、R N Aプロセシングの改質は、挿入、欠失、あるいは重複をもたらす。いくつかの例では、R N Aプロセシングの改質は、エクソンの挿入、欠失、あるいは重複をもたらす。R N Aプロセシングの改質は、場合によっては、イントロンの挿入、欠失、あるいは重複をもたらす。

40

【0018】

代替的な転写またはスプライシングの事象は、限定されないが、エクソンスキッピング、代替的な3'スプライス部位の選択、代替的な5'スプライス部位の選択、イントロン保持、相互に排他的なエクソン、代替的なプロモーター使用法、および代替的なポリアデニル化を含む。いくつかの実施形態では、スプライシング事象は、例えば、エクソンスキッピングまたはエクソンインクルージョンによる、エクソンの挿入、欠失、あるいは重複をもたらす。

【0019】

エクソンスキッピング

エクソンスキッピングはR N Aスプライシングの形態である。場合によっては、エクソ

50

ンがプロセシングされたmRNAでスキッピングされるか、プロセシングされたmRNAからスプライシングされるときに、エクソンスキッピングが生じる。エクソンスキッピングの結果、プロセシングされたmRNAはスキッピングされたエクソンを含まない。いくつかの例では、エクソンスキッピングは改変された生成物の発現をもたらす。

#### 【0020】

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

10

#### 【0021】

##### エクソンインクルージョン

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

20

#### 【0022】

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

30

#### 【0023】

##### イントロン保持

いくつかの例では、RNA中の突然変異はイントロン保持をもたらす。イントロン保持は成熟mRNA転写産物中に残るイントロンをもたらす。いくつかの例では、保持されたイントロンの存在は、機能タンパク質の翻訳を防ぐか減少させる。いくつかの例では、イントロン保持は、コード領域、非コード領域、5'UTR、あるいは3'UTRで生じる。イントロン保持がコード領域で生じる場合、いくつかの例では、保持されたイントロンはフレーム内のアミノ酸をコードするか、あるいははずれており、これが終止コドンまたはフレームシフトにより切断されたタンパク質または非機能的なタンパク質を生成する。いくつかの例では、イントロンは、5'UTRに位置しているか、または、3'UTRに位置している2つのエクソン間で保持される。

40

#### 【0024】

いくつかの例では、AONは、保持されたイントロンの除去を開始するために、部分的にプロセシングされたmRNAをハイブリダイズするために使用される。いくつかの例では、AONはイントロンスプライシングエンハンサーあるいはイントロンスプライシングサイレンサーにハイブリダイズする。いくつかの例では、AONは、5'スプライス部位で、あるいは5'スプライス部位から距離をおいて、3'スプライス部位で、あるいは3'スプライス部位から距離をおいて、枝分かれ部位で、あるいは枝分かれ部位から距離をおいて

50

、ポリピリミジントラクトで、あるいはポリピリミジントラクトから距離をおいて、イントロンサイレンサー部位で、あるいはイントロンサイレンサー部位から距離をおいて、隠れたイントロンスプライス部位で、あるいは隠れたイントロンスプライス部位から距離をおいて、偽のスプライス部位で、あるいは偽のスプライス部位から距離をおいて、または、イントロンのイントロンエンハンサーで、あるいはイントロンのイントロンエンハンサーから距離をおいて、ハイブリダイズする。いくつかの例では、AONはイントロンの内部領域へハイブリダイズする。

#### 【0025】

##### 兆候

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子あるいは医薬組成物は、欠損したmRNAを特徴とする疾患または障害の処置に使用される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子あるいは医薬組成物は、スプライシング事象を誘発するために、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物の挿入、欠失、重複、あるいは改質を誘導することにより疾患または障害の処置に使用される。いくつかの実施形態では、スプライシング事象はエクソンスキッピングまたはエクソンインクルージョンである。いくつかの実施形態では、スプライシング事象はイントロン保持である。

#### 【0026】

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

#### 【0027】

ヒトのタンパク質コード遺伝子の大部分が代替的にスプライシングされる。いくつかの例では、突然変異は不適当にスプライシングされたか、部分的にスプライシングされたmRNAを引き起こす。例えば、突然変異は、タンパク質コード遺伝子、サイレンサーまたはエンハンサー配列、エクソン配列、あるいはイントロン配列中のスプライス部位の少なくとも1つにある。いくつかの例では、突然変異は遺伝子機能障害を引き起こす。いくつかの例では、突然変異は疾患または障害を引き起こす。

#### 【0028】

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

#### 【0029】

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

#### 【0030】

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

#### 【0031】

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

#### 【0032】

10

20

30

40

50

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

10

### 【0033】

いくつかの例では、不適当にスプライシングされたか、部分的にスプライシングされたmRNAは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを引き起こす。デュシェンヌ型筋ジストロフィーは重度の筋衰弱を引き起こし、機能的なジストロフィンの産生を消失させるDMD遺伝子中の突然変異によって引き起こされる。いくつかの例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、DMD遺伝子中のエクソンの突然変異の結果である。いくつかの例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、DMD遺伝子中のエクソン1、2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、および79の少なくとも1つの突然変異の結果である。いくつかの例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、DMD遺伝子中のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、および63の少なくとも1つの突然変異の結果である。いくつかの例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、DMD遺伝子中のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、および55の少なくとも1つの突然変異の結果である。いくつかの例では、多くのエクソンが突然変異する。例えば、エクソン48-50の突然変異はデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者において一般的である。いくつかの例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーはエクソン51の突然変異の結果である。いくつかの例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーはエクソン23の突然変異の結果である。いくつかの例では、突然変異は、エクソンの欠失に関与している。いくつかの例では、突然変異は、エクソンの重複に関与している。いくつかの例では、突然変異はエクソンを点突然変異に関与している。例えば、患者の中にはDMD遺伝子のエクソン51のナンセンス点突然変異を抱えているものもいることが示されている。

20

### 【0034】

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

30

### 【0035】

#### ポリ核酸分子

いくつかの実施形態において、エクソンスキッピングまたはエクソンインクルージョンを誘発するために、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物の挿入、欠失、重複、あるいは改質を誘発するポリ核酸分子が本明細書に記載される。いくつかの例では、ポリ

40

50

核酸分子は翻訳のリーディングフレームを回復させる。いくつかの例では、ポリ核酸分子は機能的かつ切断されたタンパク質をもたらす。

【0036】

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

【0037】

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

【0038】

上に記載されたように、ポリ核酸分子は、限定されないが、神経筋疾患、遺伝病、癌、遺伝性疾患、あるいは心血管疾患などの疾患または障害をもたらす誤ってプロセシングされたmRNA転写産物を標的とする。

【0039】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、疾患または障害を引き起こす遺伝子中で突然変異するエクソンを標的とする。例示的な疾患あるいは障害は、限定されないが、家族性自律神経不全(FD)、脊髄筋萎縮症(SMA)、中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ(MCAD)欠損症、ハッチンソン・ギルフォード早老症候群(HGPS)、筋緊張性ジストロフィー1型(DM1)、筋緊張性ジストロフィー2型(DM2)、常染色体優性網膜色素変性症(RP)、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)、小頭骨異形成原発性小人症(microcephalicsteodysplasticprimordial dwarfism)1型(MOPD1)(テイビ-リンダー症候群(Taybi-Linder syndrome)(TALS))、パーキンソン症候群-17(FTDP-17)を伴う前頭側頭型認知症、福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、高コレステロール血症、および囊胞性線維症(CF)を含む。疾患または障害に関する例示的な遺伝子は、限定されないが、IKBKA P、SMN2、MCAD、LMNA、DMPK、ZNF9、MAPT、FKTN、TDP-43、LDLR、CFTR、DMD、PAH、MSTN、およびK-Rasを含む。いくつかの実施形態において、遺伝子はDMD、PAH、MSTN、あるいはK-Rasである。

【0040】

いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、疾患または障害を引き起こす遺伝子のエクソンのエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。いくつかの実施形態において、遺伝子は、IKBKA P、SMN2、MCAD、LMNA、DMPK、ZNF9、MAPT、FKTN、TDP-43、LDLR、CFTR、DMD、PAH、MSTN、あるいはK-Rasである。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、MSTNのエクソン1、2、あるいは3のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、MSTNのエクソン2のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、PAHのエクソン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、PAHのエクソン11のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。

10

20

30

40

50

## 【0041】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、疾患または障害を引き起こす遺伝子のエクソンの少なくとも1つの5'イントロン・エクソン・ジャンクションあるいは3'エクソン・イントロンジャンクションのいずれかにある標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、遺伝子は、I K B K A P、S M N 2、M C A D、L M N A、D M P K、Z N F 9、M A P T、F K T N、T D P - 4 3、L D L R、C F T R、D M D、P A H、M S T N、あるいはK-Rasである。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、M S T Nのエクソン1、2、あるいは3の5'イントロン・エクソン・ジャンクションあるいは3'エクソン・イントロンジャンクションのいずれかを標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、M S T Nのエクソン2の5'イントロン・エクソン・ジャンクションあるいは3'エクソン・イントロンジャンクションのいずれかである領域を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、P A Hのエクソン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21の5'イントロン・エクソン・ジャンクションあるいは3'エクソン・イントロン・ジャンクションのいずれかである領域を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、P A Hのエクソン11の5'イントロン・エクソン・ジャンクションあるいは3'エクソン・イントロン・ジャンクションのいずれかである領域を標的とする。

10

## 【0042】

場合によっては、ポリ核酸分子は、疾患または障害を引き起こす遺伝子のエクソンの少なくとも1つの5'イントロン・エクソン・ジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、遺伝子は、I K B K A P、S M N 2、M C A D、L M N A、D M P K、Z N F 9、M A P T、F K T N、T D P - 4 3、L D L R、C F T R、D M D、P A H、M S T N、あるいはK-Rasである。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、M S T Nのエクソン1、2、あるいは3の5'イントロン・エクソン・ジャンクションにある領域を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、M S T Nのエクソン2の5'イントロン・エクソン・ジャンクションにある領域を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、P A Hのエクソン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21の5'イントロン・エクソン・ジャンクションにある領域を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、P A Hのエクソン11の5'イントロン・エクソン・ジャンクションにある領域を標的とする。

20

## 【0043】

場合によっては、ポリ核酸分子は、疾患または障害を引き起こす遺伝子のエクソンの少なくとも1つの3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、遺伝子は、I K B K A P、S M N 2、M C A D、L M N A、D M P K、Z N F 9、M A P T、F K T N、T D P - 4 3、L D L R、C F T R、D M D、P A H、M S T N、あるいはK-Rasである。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、M S T Nのエクソン1、2、あるいは3の3'エクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、M S T Nのエクソン2の3'エクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、P A Hのエクソン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21の3'エクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、P A Hのエクソン11の3'エクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。

30

## 【0044】

40

50

場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、疾患または障害を引き起こす遺伝子のエクソンのスプライス部位を標的とする。いくつかの実施形態において、遺伝子は、I K B K A P、S M N 2、M C A D、L M N A、D M P K、Z N F 9、M A P T、F K T N、T D P - 4 3、L D L R、C F T R、D M D、P A H、M S T N、あるいはK - R a sである。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、M S T Nのエクソン1、2、あるいは3のスプライス部位を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、M S T Nのエクソン2のスプライス部位を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、P A Hのエクソン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21のスプライス部位を標的とする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、P A Hのエクソン11のスプライス部位を標的とする。本明細書で使用されるように、スプライス部位は、エクソンスキッピングまたはエクソンインクルージョンを誘発するために、誤ってスプライシングされたm R N A 転写産物の挿入、欠失、重複、あるいは改質を誘発することができる、基準スプライス部位、隠れたスプライス部位、あるいは代替的なスプライス部位を含む。

#### 【0045】

いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、疾患または障害を引き起こす遺伝子のエクソンの（あるいは5'から）少なくとも1 0 0 0 ヌクレオチド(n t)、5 0 0 n t、4 0 0 n t、3 0 0 n t、2 0 0 n t、1 0 0 n t、8 0 n t、6 0 n t、5 0 n t、4 0 n t、3 0 n t、2 0 n t、1 0 n t、あるいは5 n t上流にある領域を標的とする。いくつかの実施形態において、遺伝子は、I K B K A P、S M N 2、M C A D、L M N A、D M P K、Z N F 9、M A P T、F K T N、T D P - 4 3、L D L R、C F T R、D M D、P A H、M S T N、あるいはK - R a sである。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、M S T N遺伝子のエクソン1、2、あるいは3の（あるいは5'から）少なくとも1 0 0 0 n t、5 0 0 n t、4 0 0 n t、3 0 0 n t、2 0 0 n t、1 0 0 n t、8 0 n t、6 0 n t、5 0 n t、4 0 n t、3 0 n t、2 0 n t、1 0 n t、あるいは5 n t上流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、M S T N遺伝子のエクソン2の（あるいは5'から）少なくとも1 0 0 0 n t、5 0 0 n t、4 0 0 n t、3 0 0 n t、2 0 0 n t、1 0 0 n t、8 0 n t、6 0 n t、5 0 n t、4 0 n t、3 0 n t、2 0 n t、1 0 n t、あるいは5 n t上流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、P A H遺伝子のエクソン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21の（あるいは5'から）少なくとも1 0 0 0 n t、5 0 0 n t、4 0 0 n t、3 0 0 n t、2 0 0 n t、1 0 0 n t、8 0 n t、6 0 n t、5 0 n t、4 0 n t、3 0 n t、2 0 n t、1 0 n t、あるいは5 n t上流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、P A H遺伝子のエクソン11の（あるいは5'から）少なくとも1 0 0 0 n t、5 0 0 n t、4 0 0 n t、3 0 0 n t、2 0 0 n t、1 0 0 n t、8 0 n t、6 0 n t、5 0 n t、4 0 n t、3 0 n t、2 0 n t、1 0 n t、あるいは5 n t上流にある領域を標的とする。

#### 【0046】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、疾患または障害を引き起こす遺伝子のエクソンの少なくとも1つの上流（あるいは5'）である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、遺伝子は、I K B K A P、S M N 2、M C A D、L M N A、D M P K、Z N F 9、M A P T、F K T N、T D P - 4 3、L D L R、C F T R、D M D、P A H、M S T N、あるいはK - R a sである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、M S T N遺伝子のエクソン1、2、あるいは3の少なくとも1つの上流（あるいは5'）である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、M S T N遺伝子のエクソン2の少なくとも1つの約5、10、15、20、50、100、200、300、4

10

20

30

40

50

00、あるいは500bp上流（あるいは5'）である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、PAH遺伝子のエクソン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21の少なくとも1つの上流（5'）である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、PAH遺伝子のエクソン11の少なくとも1つの約5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは500bp上流（あるいは5'）である標的領域にハイブリダイズする。

#### 【0047】

いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、疾患または障害を引き起こす遺伝子のエクソンの（あるいは3'から）少なくとも1000ヌクレオチド(nt)、500nt、400nt、300nt、200nt、100nt、80nt、60nt、50nt、40nt、30nt、20nt、10nt、あるいは5nt下流にある領域を標的とする。いくつかの実施形態において、遺伝子は、IKBKA P、SMN2、MCAD、LMNA、DMPK、ZNF9、MAPT、FKTN、TDP-43、LDLR、CFTTR、DMD、PAH、MSTN、あるいはK-Rasである。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、MSTN遺伝子のエクソン1、2、あるいは3の（あるいは5'から）少なくとも1000ヌクレオチド(nt)、500nt、400nt、300nt、200nt、100nt、80nt、60nt、50nt、40nt、30nt、20nt、10nt、あるいは3nt下流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、MSTN遺伝子のエクソン2の（あるいは3'から）少なくとも1000ヌクレオチド(nt)、500nt、400nt、300nt、200nt、100nt、80nt、60nt、50nt、40nt、30nt、20nt、10nt、あるいは5nt下流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、PAH遺伝子のエクソン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21の（あるいは3'から）少なくとも1000ヌクレオチド(nt)、500nt、400nt、300nt、200nt、100nt、80nt、60nt、50nt、40nt、30nt、20nt、10nt、あるいは5nt下流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、PAH遺伝子のエクソン11の（あるいは3'から）少なくとも1000ヌクレオチド(nt)、500nt、400nt、300nt、200nt、100nt、80nt、60nt、50nt、40nt、30nt、20nt、10nt、あるいは5nt下流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、PAH遺伝子のエクソン11の（あるいは3'から）少なくとも1000ヌクレオチド(nt)、500nt、400nt、300nt、200nt、100nt、80nt、60nt、50nt、40nt、30nt、20nt、10nt、あるいは5nt下流にある領域を標的とする。

#### 【0048】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、疾患または障害を引き起こす遺伝子のエクソンの少なくとも1つの下流（あるいは3'）である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、遺伝子は、IKBKA P、SMN2、MCAD、LMNA、DMPK、ZNF9、MAPT、FKTN、TDP-43、LDLR、CFTTR、DMD、PAH、MSTN、あるいはK-Rasである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、MSTN遺伝子のエクソン1、2、あるいは3の少なくとも1つの約5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは500bp下流（あるいは3'）である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、MSTN遺伝子のエクソン2の少なくとも1つの約5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは500bp下流（あるいは3'）である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、PAH遺伝子のエクソン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21の少なくとも1つの約5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは500bp下流（3'）である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、PAH遺伝子のエクソン11の少なくとも1つの約5、10、15、20、50、100、200、300、400、あるいは500bp下流（あるいは3'）である標的領域にハイブリダイズする。

10

20

30

40

50

## 【0049】

いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、疾患または障害を引き起こす遺伝子のエクソン内の内部領域を標的とする。いくつかの実施形態において、遺伝子は、I K B K A P、S M N 2、M C A D、L M N A、D M P K、Z N F 9、M A P T、F K T N、T D P - 4 3、L D L R、C F T R、D M D、P A H、M S T N、あるいはK - R a sである。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、M S T N遺伝子のエクソン1、2、あるいは3内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、M S T N遺伝子のエクソン2内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、P A H遺伝子の領域1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または21内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、P A H遺伝子のエクソン11内の内部領域を標的とする。

## 【0050】

場合によっては、ポリ核酸分子は、神経筋疾患または障害を引き起こす誤ってプロセシングされたm R N A転写産物を標的とする。場合によっては、神経筋疾患または障害は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、あるいは筋緊張性ジストロフィーである。場合によっては、ポリ核酸分子は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッcker型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、あるいは筋緊張性ジストロフィーを引き起こす誤ってプロセシングされたm R N A転写産物を標的とする。場合によっては、ポリ核酸分子は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを引き起こす誤ってプロセシングされたm R N A転写産物を標的とする。

## 【0051】

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

## 【0052】

いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、D M D遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、または55のエクソン・イントロン・ジャンクションにある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または55のエクソン・イントロン・ジャンクションにある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D遺伝子のエクソン8のエクソン・イントロン・ジャンクションにある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D遺伝子のエクソン23のエクソン・イントロン・ジャンクションにある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D遺伝子のエクソン35のエクソン・イントロン・ジャンクションにある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D遺伝子のエクソン43のエクソン・イントロン・ジャンクションにある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D遺伝子のエクソン44のエクソン・イントロン・ジャンクションにある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D遺伝子のエクソン45のエクソン・イントロン・ジャンクションにある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D遺伝子のエクソン50のエクソン・イントロン・ジャンクションにある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D遺伝子のエクソン51のエクソン・イントロン・ジャンクションにある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D遺伝子のエクソン52のエクソン・イントロン・ジャンクションにある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D遺伝子のエクソン53のエクソン・イントロン・ジャンクションにある領域を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D遺伝子のエクソン55のエクソン・イントロン・ジャンクションにある領域を標的とする。

10

20

30

40

50

エクソン 4 3 のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。場合によつては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 4 4 のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。場合によつては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 4 5 のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。場合によつては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 4 8 のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。場合によつては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 4 9 のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。場合によつては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 0 のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。場合によつては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 1 のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。場合によつては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 2 のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。場合によつては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 3 のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。場合によつては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 5 のエクソン・イントロンジャンクションにある領域を標的とする。

#### 【 0 0 5 3 】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 3、4、5、6、7、1  
8、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31  
、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、  
45、46、47、48、49、50、52、53、54、55、56、57、58、5  
9、60、61、62、および、63の少なくとも1つの5'イントロン・エクソン・ジャ  
ンクションあるいは3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダ  
イズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 8、23、35  
、43、44、45、50、51、52、53、または55の5'イントロン・エクソン・  
ジャンクションあるいは3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブ  
リダizesする。

#### 【 0 0 5 4 】

場合によつては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 3、4、5、6、7、18  
、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、  
32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、4  
5、46、47、48、49、50、52、53、54、55、56、57、58、59  
、60、61、62、および、63の少なくとも1つの5'イントロン・エクソン・ジャ  
ンクションにある標的領域にハイブリダizesする。場合によつては、ポリ核酸分子は、D M  
D 遺伝子のエクソン 8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または55の5'イントロン・エクソン・  
ジャンクションにある標的領域にハイブリダizesする。場合によつては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 8 の 5'イントロン・エクソン・  
ジャンクションにある標的領域にハイブリダizesする。場合によつては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 23 の 5'イントロン・エクソン・  
ジャンクションにある標的領域にハイブリダizesする。場合によつては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソ  
ン 35 の 5'イントロン・エクソン・ジャンクションにある標的領域にハイブリダizesする。  
場合によつては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 43 の 5'イントロン・エク  
ソン・ジャンクションにある標的領域にハイブリダizesする。場合によつては、ポリ核酸  
分子は、D M D 遺伝子のエクソン 44 の 5'イントロン・エクソン・ジャンクションにある  
標的領域にハイブリダizesする。場合によつては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエク  
ソン 45 の 5'イントロン・エクソン・ジャンクションにある標的領域にハイブリダizesす  
る。場合によつては、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 50 の 5'イントロン・エ  
クソン・ジャンクションにある標的領域にハイブリダizesする。場合によつては、ポリ核  
酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 51 の 5'イントロン・エクソン・ジャンクションにあ

10

20

30

40

50

る標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン52の5'イントロン・エクソン・ジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン53の5'イントロン・エクソン・ジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン55の5'イントロン・エクソン・ジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。

〔 0 0 5 5 〕

場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、および、63の少なくとも1つの3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または55の3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8の3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン23の3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン35の3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン43の3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン44の3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン45の3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン50の3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン51の3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン52の3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン53の3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン55の3'エクソン・イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。

〔 0 0 5 6 〕

いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、または63のスプライス部位を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8、23、35、43、44、45、50、51、52、53、または55のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン23のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン35のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン43のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン44のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン45の

スプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン48のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン49のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン50のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン51のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン52のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン53のスプライス部位を標的とする。場合によっては、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン55のスプライス部位を標的とする。本明細書で使用されるように、スプライス部位は、エクソンスキッピングまたはエクソンインクルージョンを誘発するために、誤ってスプライシングされたmRNA転写産物の挿入、欠失、重複、あるいは改質を誘発することができる、基準スプライス部位、隠れたスプライス部位、あるいは代替的なスプライス部位を含む。

#### 【0057】

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

#### 【0058】

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

から)少なくとも 1000 nt、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、あるいは 5 nt 上流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン 45 の(あるいは 5' から)少なくとも 1000 nt、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、あるいは 5 nt 上流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン 48 の(あるいは 5' から)少なくとも 1000 ヌクレオチド(nt)、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、あるいは 5 nt 上流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン 49 の(あるいは 5' から)少なくとも 1000 ヌクレオチド(nt)、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、あるいは 5 nt 上流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン 50 の(あるいは 5' から)少なくとも 1000 ヌクレオチド(nt)、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、あるいは 5 nt 上流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン 51 の(あるいは 5' から)少なくとも 1000 ヌクレオチド(nt)、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、あるいは 5 nt 上流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン 52 の(あるいは 5' から)少なくとも 1000 ヌクレオチド(nt)、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、あるいは 5 nt 上流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン 53 の(あるいは 5' から)少なくとも 1000 nt、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、あるいは 5 nt 上流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD 遺伝子のエクソン 55 の(あるいは 5' から)少なくとも 1000 nt、500 nt、400 nt、300 nt、200 nt、100 nt、80 nt、60 nt、50 nt、40 nt、30 nt、20 nt、10 nt、あるいは 5 nt 上流にある領域を標的とする。

#### 【0059】

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

## 【0060】

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

10

20

30

40

50

ド( nt )、5 0 0 nt 、4 0 0 nt 、3 0 0 nt 、2 0 0 nt 、1 0 0 nt 、8 0 nt 、6 0 nt 、5 0 nt 、4 0 nt 、3 0 nt 、2 0 nt 、1 0 nt 、あるいは5 nt 下流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン5 2の(あるいは3'から)少なくとも1 0 0 0 ヌクレオチド( nt )、5 0 0 nt 、4 0 0 nt 、3 0 0 nt 、2 0 0 nt 、1 0 0 nt 、8 0 nt 、6 0 nt 、5 0 nt 、4 0 nt 、3 0 nt 、2 0 nt 、1 0 nt 、あるいは5 nt 下流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン5 3の(あるいは3'から)少なくとも1 0 0 0 ヌクレオチド( nt )、5 0 0 nt 、4 0 0 nt 、3 0 0 nt 、2 0 0 nt 、1 0 0 nt 、8 0 nt 、6 0 nt 、5 0 nt 、4 0 nt 、3 0 nt 、2 0 nt 、1 0 nt 、あるいは5 nt 下流にある領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン5 5の(あるいは3'から)少なくとも1 0 0 0 ヌクレオチド( nt )、5 0 0 nt 、4 0 0 nt 、3 0 0 nt 、2 0 0 nt 、1 0 0 nt 、8 0 nt 、6 0 nt 、5 0 nt 、4 0 nt 、3 0 nt 、2 0 nt 、1 0 nt 、あるいは5 nt 下流にある領域を標的とする。

#### 【0 0 6 1】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、6 2、および、6 3の少なくとも1つの下流(または3')である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、6 2、および、6 3の少なくとも1つの約5、1 0、1 5、2 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、あるいは5 0 0 bp 下流(あるいは5')である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8、2 3、3 5、4 3、4 4、4 5、5 0、5 1、5 2、5 3、または5 5の少なくとも1つの約5、1 0、1 5、2 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、あるいは5 0 0 bp 下流(あるいは3')である標的領域にハイブリダイズする。

#### 【0 0 6 2】

いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3、4、5、6、7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、6 2、または6 3内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8、2 3、3 5、4 3、4 4、4 5、5 0、5 1、5 2、5 3、または5 5内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン8内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン2 3内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン3 5内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン4 3内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン4 4内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン4 5内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン4 8内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、DMD遺伝子のエクソン4 9内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本

10

20

30

40

50

明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 0 内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 1 内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 2 内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 3 内の内部領域を標的とする。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 5 5 内の内部領域を標的とする。

#### 【 0 0 6 3 】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 3、4、5、6、7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、6 2、および、6 3 の少なくとも 1 つの内部である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、D M D 遺伝子のエクソン 8、2 3、3 5、4 3、4 4、4 5、5 0、5 1、5 2、5 3、または 5 5 の少なくとも 1 つの内部にある標的領域にハイブリダイズする。

#### 【 0 0 6 4 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、エクソン 5 1 を含む部分的にスプライシングされた m R N A 配列を標的とする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン 5 1 に対して上流（あるいは 5'）である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン 5 1 の約 5、1 0、1 5、2 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、あるいは 5 0 0 b p 上流（あるいは 5'）である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン 5 1 に対して下流（あるいは 3'）である標的領域にハイブリダイズする。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン 5 1 の約 5、1 0、1 5、2 0、5 0、1 0 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、あるいは 5 0 0 b p 下流（あるいは 3'）である標的領域にハイブリダイズする。

#### 【 0 0 6 5 】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、エクソン 5 1 内にある標的領域にハイブリダイズする。場合によっては、ポリ核酸分子は、5' イントロン・エクソン 5 1 ジャンクションあるいは 3' エクソン 5 1 ・ イントロンジャンクションにある標的領域にハイブリダイズする。

#### 【 0 0 6 6 】

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

10

20

30

40

50

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

#### 【0067】

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

#### 【0068】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は RNA または DNA を含む。場合によっては、ポリ核酸分子は RNA を含む。いくつかの例では、RNA は低分子干渉 RNA (siRNA)、低分子ヘアピン型 RNA (shRNA)、マイクロ RNA (miRNA)、二本鎖 RNA (dsRNA)、転移 RNA (tRNA)、リボソーム RNA (rRNA)、またはヘテロ核 RNA (hnRNA) を含む。いくつかの例では、RNA は shRNA を含む。いくつかの例では、RNA は miRNA を含む。いくつかの例では、RNA は dsRNA を含む。いくつかの例では、RNA は tRNA を含む。いくつかの例では、RNA は rRNA を含む。いくつかの例では、RNA は hnRNA を含む。いくつかの例では、RNA は siRNA を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は siRNA を含む。

#### 【0069】

いくつかの実施形態では、核酸ポリマーは、約 10 から約 50 ヌクレオチド長さである。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、約 10 から約 30、約 15 から約 30、約 18 から約 25、約 18 から約 24、約 19 から約 23、あるいは約 20 から約 22 ヌクレオチド長さである。

#### 【0070】

いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、約 50 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 45 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 40 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 35 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 30 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 25 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 20 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 19 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 18 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 17 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 16 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 15 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 14 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 13 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 12 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 11 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 10 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 10 から約 50 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約 10 から約 45 ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、約

10

20

30

40

50

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

#### 【0071】

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

10

#### 【0072】

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

#### 【0073】

いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約50ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約45ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約40ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約35ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約20ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約19ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約18ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約17ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約16ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約15ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約14ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約13ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約12ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約11ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約10ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約10から約50ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約10から約45ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約10から約40ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約10から約35ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約10から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約10から約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約10から約20ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約15から約25ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約15から約30ヌクレオチド長さである。いくつかの例では、第1のポリヌクレオチドは、約12から約30ヌクレオチド長さである。

20

#### 【0074】

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

30

40

50

る。いくつかの実施形態において、第2のポリヌクレオチドは、約10から約30、約15から約30、約18から約25、約18から約24、約19から約23、あるいは約20から約22ヌクレオチド長さである。

#### 【0075】

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

#### 【0076】

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

#### 【0077】

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

10

20

30

40

50

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

## 【0078】

10

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

## 【0079】

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

20

## 【0080】

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

30

## 【0081】

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

## 【0082】

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

40

50

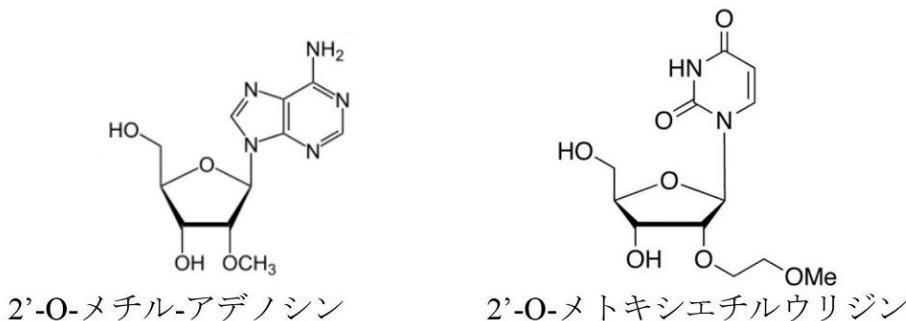
ノを含む。

【0083】

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

【0084】

【化1】



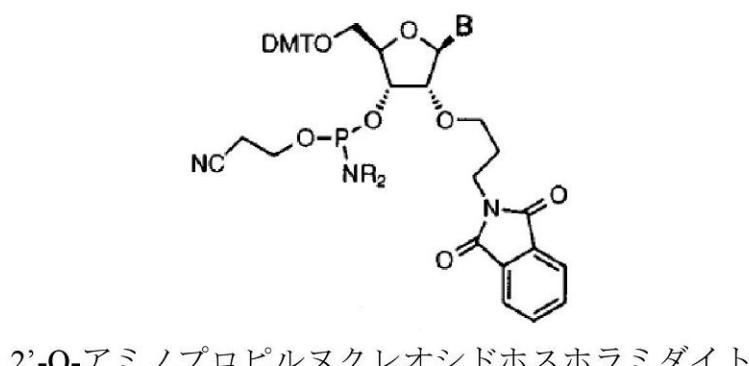
10

【0085】

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

【0086】

【化2】



30

【0087】

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

【0088】

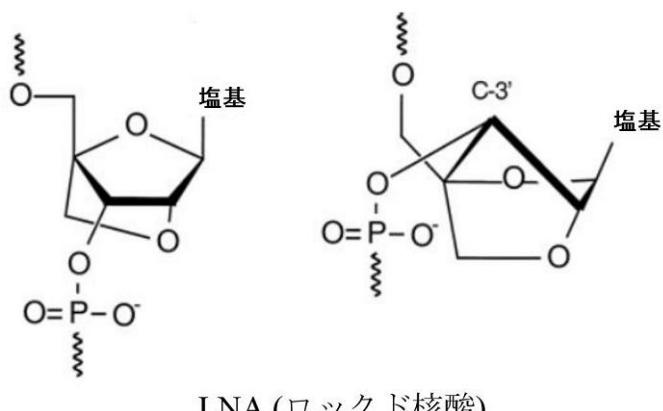
LNA(ロックド核酸)

【0089】

40

50

## 【化3】



10

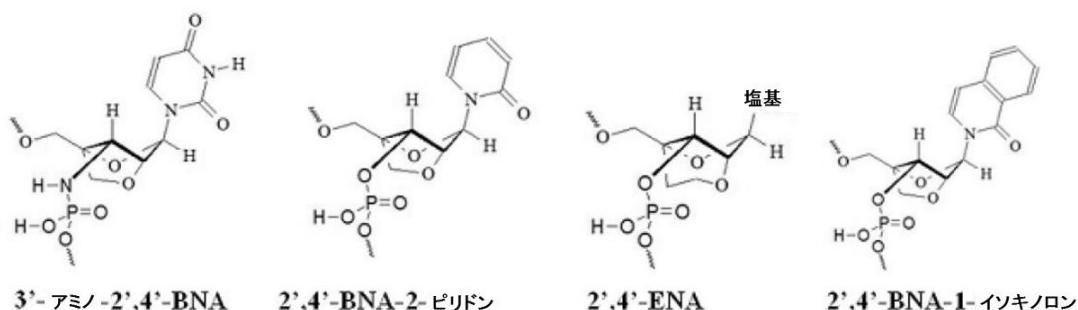
## 【0090】

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

## 【0091】

20

## 【化4】



30

## 【0092】

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

## 【0093】

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

40

50

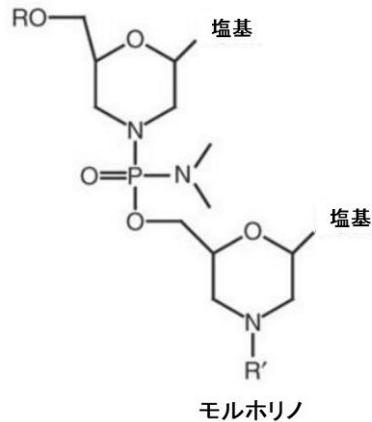
および置換されたナフチル基、N 6 - メチルアデノシンなどのO - およびN - アルキル化プリンおよびピリミジン、5 - メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン、5 - オキシ酢酸、ピリジン - 4 - オン、ピリジン - 2 - オン、フェニル、および、アミノフェノールまたは2 , 4 , 6 - トリメトキシベンゼンなどの修飾フェニル基、G クランプヌクレオチドとして作用する修飾されたシトシン、8 - 置換されたアデニンおよびグアニン、5 - 置換されたウラシルおよびチミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシアルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルアミノアルキルヌクレオチド、および、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

【 0 0 9 4 】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチドアナログは、モルホリノ、ペプチド核酸 ( P N A ) 、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、2' - フルオロN 3 - P 5 ' - ホスホラミダイト、1' , 5 ' - アンヒドロヘキシトール核酸 ( H N A ) 、またはそれらの組み合わせをさらに含む。モルホリノまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴ ( P M O ) は合成分子を含み、その構造は、正常な糖およびリン酸塩構造からの偏差 ( d e v i a t e s ) によって天然の核酸構造を模倣している。いくつかの例では、5員のリボース環は、4つの炭素、1つの窒素、および1つの酸素を含有している6員のモルホリノ環で置換される。いくつかの場合では、リボース単量体は、リン酸基の代わりにホスホロジアミデート基によって結合される。場合によっては、骨格の変質は、荷電オリゴヌクレオチドによって使用されるような細胞送達剤 ( c e l l u l a r d e l i v e r y a g e n t s ) の助けを借りることなく細胞膜を横断することができるモルホリノ中性分子を作るすべての正および負の電荷を除去する。

【 0 0 9 5 】

【化 5 】



【 0 0 9 6 】

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

【 0 0 9 7 】

10

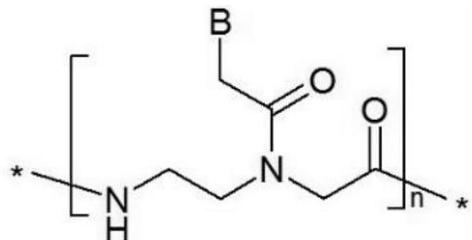
20

30

40

50

## 【化6】



## PNA

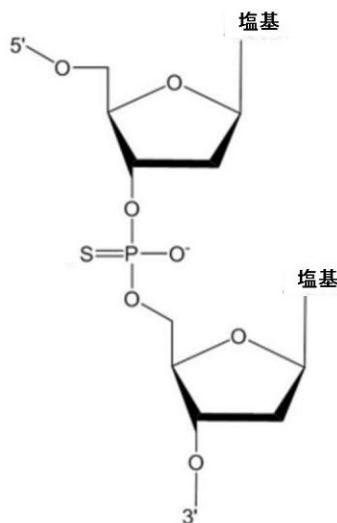
10

## 【0098】

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

## 【0099】

## 【化7】



20

30

40

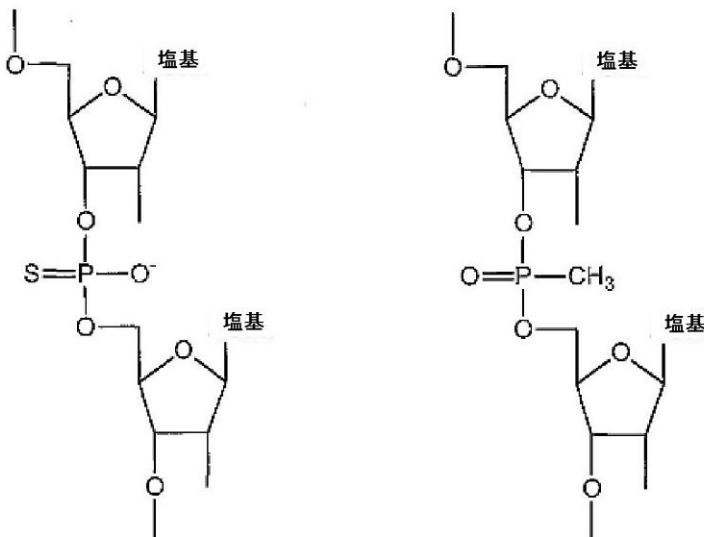
## 【0100】

50

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

【0101】

【化8】



10

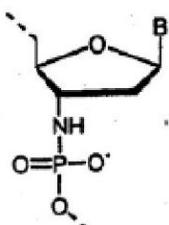
20

【0102】

いくつかの例では、修飾されたヌクレオチドは、限定されないが、以下のように例示される 2' - フルオロ N 3 - P 5' - ホスホロアミダイトを含む：

【0103】

【化9】



30

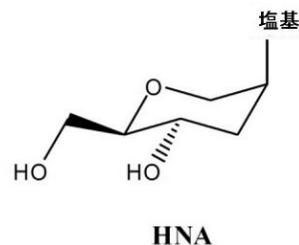
N3'-P5' ホスホロアミダイト

【0104】

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

【0105】

【化10】



40

【0106】

50

いくつかの実施形態において、1つ以上の修飾はさらに、リボース部分、リン酸塩骨格、およびヌクレオシドの修飾、あるいは3'または5'末端のヌクレオチドアナログ修飾を含む。例えば、3'末端は随意に3'カチオン基を含み、あるいは、3'-3'結合を含む3'-末端でヌクレオシドを反転することによって3'カチオン基を含む。別の代替物では、3'-末端は随意に、アミノアルキル基、例えば、3'5C-アミノアルキルdTと共に役する。追加の代替物では、3'-末端は随意に、脱塩基部位、例えば、アプリン酸またはアピリミジン酸部位と共に役する。いくつかの例では、5'-末端は、アミノアルキル基、例えば、5'-O-アミノアルキル置換基と共に役する。場合によっては、5'-末端は、脱塩基部位、例えば、アプリン酸またはアピリミジン酸部位と共に役する。

#### 【0107】

10

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

#### 【0108】

40

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

#### 【0109】

50

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

ら約 9 0 % の修飾、および、約 8 0 % から約 1 0 0 % の修飾。

【 0 1 1 0 】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 1 0 % から約 8 0 % の修飾、約 2 0 % から約 8 0 % の修飾、約 3 0 % から約 8 0 % の修飾、約 4 0 % から約 8 0 % の修飾、約 5 0 % から約 8 0 % の修飾、約 6 0 % から約 8 0 % の修飾、および、約 7 0 % から約 8 0 % の修飾。

【 0 1 1 1 】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 1 0 % から約 7 0 % の修飾、約 2 0 % から約 7 0 % の修飾、約 3 0 % から約 7 0 % の修飾、約 4 0 % から約 7 0 % の修飾、約 5 0 % から約 7 0 % の修飾、および、約 6 0 % から約 7 0 % の修飾。

10

【 0 1 1 2 】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、以下の少なくとも 1 つを含む：約 1 0 % から約 6 0 % の修飾、約 2 0 % から約 6 0 % の修飾、約 3 0 % から約 6 0 % の修飾、約 4 0 % から約 6 0 % の修飾、および約 5 0 % から約 6 0 % の修飾。

【 0 1 1 3 】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 1 0 % から約 5 0 % の修飾、約 2 0 % から約 5 0 % の修飾、約 3 0 % から約 5 0 % の修飾、および約 4 0 % から約 5 0 % の修飾。

【 0 1 1 4 】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 1 0 % から約 4 0 % の修飾、約 2 0 % から約 4 0 % の修飾、および約 3 0 % から約 4 0 % の修飾。

20

【 0 1 1 5 】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は以下の少なくとも 1 つを含む：約 1 0 % から約 3 0 % の修飾、および約 2 0 % から約 3 0 % の修飾。

【 0 1 1 6 】

場合によっては、ポリ核酸分子は約 1 0 % から約 2 0 % の修飾を含む。

【 0 1 1 7 】

場合によっては、ポリ核酸分子は約 1 5 % から約 9 0 % 、約 2 0 % から約 8 0 % 、約 3 0 % から約 7 0 % 、あるいは約 4 0 % から約 6 0 % の修飾を含む。

30

【 0 1 1 8 】

さらなる場合には、ポリ核酸分子は少なくとも約 1 5 % 、2 0 % 、3 0 % 、4 0 % 、5 0 % 、6 0 % 、7 0 % 、8 0 % 、9 0 % 、9 5 % 、または 9 9 % の修飾を含む。

【 0 1 1 9 】

いくつかの実施形態では、ポリ核酸分子は、少なくとも約 1 、約 2 、約 3 、約 4 、約 5 、約 6 、約 7 、約 8 、約 9 、約 1 0 、約 1 1 、約 1 2 、約 1 3 、約 1 4 、約 1 5 、約 1 6 、約 1 7 、約 1 8 、約 1 9 、約 2 0 、約 2 1 、約 2 2 、またはそれ以上の修飾を含む。

【 0 1 2 0 】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、少なくとも約 1 、約 2 、約 3 、約 4 、約 5 、約 6 、約 7 、約 8 、約 9 、約 1 0 、約 1 1 、約 1 2 、約 1 3 、約 1 4 、約 1 5 、約 1 6 、約 1 7 、約 1 8 、約 1 9 、約 2 0 、約 2 1 、約 2 2 、またはそれ以上の修飾されたヌクレオチドを含む。

40

【 0 1 2 1 】

いくつかの例では、約 5 % から約 1 0 0 % のポリ核酸分子は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 5 % 、1 0 % 、1 5 % 、2 0 % 、2 5 % 、3 0 % 、3 5 % 、4 0 % 、4 5 % 、5 0 % 、5 5 % 、6 0 % 、6 5 % 、7 0 % 、7 5 % 、8 0 % 、8 5 % 、9 0 % 、9 5 % 、または 1 0 0 % は、本明細書に記載される人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 5 % は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 1 0 % は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 1 5 % は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナロ

50

グを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 20 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 25 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 30 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 35 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 40 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 45 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 50 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 55 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 60 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 65 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 70 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 75 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 80 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 85 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 90 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 95 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子の約 100 %は、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態では、人工ヌクレオチドアナログは、  
2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル (2' - O - MOE)、2' - O - アミノプロピル、2' - デオキシ、T - デオキシ - 2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル (2' - O - AP)、2' - O - ジメチルアミノエチル (2' - O - DMAOE)、2' - O - ジメチルアミノプロピル (2' - O - DMAP)、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル (2' - O - DMAEOE)、あるいは、修飾された 2' - O - N - メチルアセトアミド (2' - O - NMA)、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホスホナートヌクレオチド、チオールホスホナートヌクレオチド、2' - フルオロN3 - P5' - ホスホラミダイト、あるいはこれらの組み合わせを含む。

#### 【0122】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 1 ~ 約 25 の修飾の含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 1 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 2 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 3 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 4 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 5 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 6 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 7 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 8 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 9 の修飾を含

10

20

30

40

50

み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 1 0 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 1 1 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 1 2 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 1 3 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 1 4 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 1 5 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 1 6 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 1 7 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 1 8 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 1 9 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 2 0 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 2 1 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 2 2 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 2 3 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 2 4 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は約 2 5 の修飾を含み、ここで、修飾は本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログを含む。

#### 【 0 1 2 3 】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は 2 つの別個のポリヌクレオチドから組み立てられ、ここで、1 つのポリヌクレオチドはセンス鎖を含み、第 2 のポリヌクレオチドはポリ核酸分子のアンチセンス鎖を含む。他の実施形態では、センス鎖はリンカー分子によってアンチセンス鎖に接続され、これは、いくつかの例では、ポリヌクレオチドリンカーあるいは非ヌクレオチドリンカーである。

#### 【 0 1 2 4 】

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

#### 【 0 1 2 5 】

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

#### 【 0 1 2 6 】

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

10

20

30

40

50

中に存在する場合、2' - デオキシ - プリンヌクレオチドを含む。

【0127】

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

【0128】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖はアンチセンス鎖の3' 末端にリン酸塩骨格修飾を含む。いくつかの例では、リン酸塩骨格修飾は、ホスホロチオエートである。

10

【0129】

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

【0130】

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

20

30

【0131】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、ここで、センス鎖は、約1～約25、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または、1つ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、あるいは10以上）の2' - デオキシ、2' - O - メチル、2' - デオキシ - 2' - フルオロ、ならびに/あるいは、1つ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上）の普遍的な塩基修飾ヌクレオチド、ならびに、隨意にセンス鎖の3' - 末端、5' - 末端、あるいは3' - と5' - の末端の両方で末端キャップ分子を含み；および、アンチセンス鎖は、約1から約25の、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および/または、1つ以上（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、あるいは10以上）の2' - デオキシ、2' - O - メチル、

40

50

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

#### 【0132】

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

#### 【0133】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子はセンス鎖とアンチセンス鎖を含み、ここで、アンチセンス鎖は、約 1 から 約 25 の、例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および / または、1 つ以上 (例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、あるいは 10 以上) の 2' - デオキシ、2' - O - メチル、2' - デオキシ - 2' - フルオロ、ならびに / あるいは、1 つ以上 (例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 以上) の普遍的な塩基修飾ヌクレオチド、ならびに、隨意にセンス鎖の 3' - 末端、5' - 末端、あるいは 3' - と 5' - の末端の両方で末端キャップ分子を含み、および、アンチセンス鎖は、約 1 から 約 25 の、例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合、および / または、1 つ以上 (例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、あるいは 10 以上) の 2' - デオキシ、2' - O - メチル、2' - デオキシ - 2' - フルオロ、ならびに / あるいは、1 つ以上 (例えば、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 以上) の普遍的な塩基修飾ヌクレオチド、ならびに、隨意にアンチセンス鎖の 3' - 末端、5' - 末端、あるいは 3' - と 5' - の末端の両端の両 50

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

#### 【0134】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、ポリ核酸分子の各鎖において、約1～約25、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20以上のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を有する化学修飾された短干涉核酸分子である。 10

#### 【0135】

別の実施形態では、本明細書に記載されたポリ核酸分子は2' - 5' ヌクレオチド間結合を含む。いくつかの例では、2' - 5' ヌクレオチド間結合は、一方または両方の配列の3' - 末端、5' - 末端、あるいは3' - 末端と5' - 末端の両方にある。追加の例では、2' - 5' ヌクレオチド間結合は、存在する一方あるいは両方の配列鎖内の様々な他の位置に存在し、例えば、ポリ核酸分子の一方または両方の鎖中のピリミジンヌクレオチドのすべてのヌクレオチド間結合の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上は、2' - 5' ヌクレオチド間結合を含み、あるいは、ポリ核酸分子の一方または両方の鎖中にプリンヌクレオチドのすべてのヌクレオチド間結合の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上は、2' - 5' ヌクレオチド間結合を含む。 20

#### 【0136】

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子は、細胞中のRNAi活性を媒介するか、インビトロ系で再構成された単鎖ポリ核酸分子であり、ここで、ポリ核酸分子は、標的核酸配列に対する相補性を有する単鎖ポリヌクレオチドを含み、および、ポリ核酸中に存在する1つ以上のピリミジンヌクレオチドは、2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり（例えば、ここで、ピリミジンヌクレオチドはすべて2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドであり、あるいは、代替的に、複数のピリミジンヌクレオチドは2' - デオキシ-2' - フルオロピリミジンヌクレオチドである）、および、ポリ核酸中に存在する任意のプリンヌクレオチドは、2' - デオキシプリンヌクレオチドであり（例えば、すべてのプリンヌクレオチドは2' - デオキシプリンヌクレオチドであるか、あるいは代替的に、複数のプリンヌクレオチドは2' - デオキシプリンヌクレオチドである）、および、末端のキャップ修飾は、アンチセンス配列の3' - 末端、5' - 末端、あるいは3' と5' - 末端の両方で随意に存在する。ポリ核酸分子は、ポリ核酸分子の3' 末端に約1～約4（例えば約1、2、3、あるいは4）の末端2' - デオキシリボヌクレオチドを随意にさらに含み、ここで、末端のヌクレオチドはさらに、1つ以上（例えば、1、2、3、あるいは4）のホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含み、および、ポリ核酸分子は随意に5' - 末端リン酸基などの末端リン酸基をさらに含む。 30

#### 【0137】

場合によっては、本明細書に記載された人工ヌクレオチドアナログの1つ以上は、天然のポリ核酸分子と比較して、例えば、RNase Hなどのリボヌクレアーゼ、DNaseなどのデオキシリボヌクレアーゼ、または、5' - 3' エキソヌクレアーゼや3' - 5' エキソヌクレアーゼなどのエキソヌクレアーゼなどのヌクレアーゼに対して抵抗性である。いくつかの例では、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル（2' - O - MOE）、2' - O - アミノプロピル、2' - デオキシ、T - デオキシ-2' - フルオロ、2' - O - アミノプロピル（2' - O - AP）、2' - O - ジメチルアミノエチル（2' - O - DMAOE）、2' - O - ジメチルアミノプロピル（2' - O - DMAAP）、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル（2' - O - DMAEOE）、あるいは、修飾された2' - O - N - メチルアセトアミド（2' - O - NMA）、LNA、ENA、PNA、HNA、モルホリノ、メチルホス 40

ホナートヌクレオチド、チオールホスホナートヌクレオチド、2' - フルオロN3 - P5' - ホスホラミダイト、あるいは、これらの組み合わせを含む人工ヌクレオチドアナログは、RNaseHなどのリボヌクレアーゼ、DNaseなどのデオキシリボヌクレアーゼ、または、5' - 3' エキソヌクレアーゼや3' - 5' エキソヌクレアーゼなどのエキソヌクレアーゼなどのヌクレアーゼに対して抵抗性である。いくつかの例では、2' - Oメチル修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' O - メトキシエチル（2' - O - MOE）修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' - O - アミノプロピル修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' - O - デオキシ修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、T - デオキシ - 2' - O - フルオロ修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' - O - アミノプロピル（2' - O - AP）修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' - O - ジメチルアミノエチル（2' - O - DMAOE）修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' - O - ジメチルアミノプロピル（2' - O - DMAAP）修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、T - O - ジメチルアミノエチルオキシエチル（2' - O - DMAEOE）修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' - O - N - メチルアセトアミド（2' - O - NMA）修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、LNA修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、ENA修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、HNA修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、モルホリノは、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、PNA修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼに対する耐性を有する（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）。いくつかの例では、メチルホスホナートヌクレオチド修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、チオールホスホナートヌクレオチド修飾ポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、2' - フルオロN3 - P5' - ホスホラミダイトを含むポリ核酸分子は、ヌクレアーゼ抵抗性（例えば、RNaseH、DNase、5' - 3' エキソヌクレアーゼ、あるいは3' - 5' エキソヌクレアーゼ抵抗性）である。いくつかの例では、本明細書に記載された5' 抱合体は5' - 3' エキソヌクレアーゼ切断を阻害する。い 50

くつかの例では、本明細書に記載された3'抱合体は3' - 5'エキソヌクレアーゼ切断を阻害する。

【0138】

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

【0139】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、キラル純粋（あるいはステレオ純粋）なポリ核酸分子、あるいは単一のエナンチオマーを含むポリ核酸分子である。いくつかの例では、ポリ核酸分子はL-ヌクレオチドを含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子はD-ヌクレオチドを含む。いくつかの例において、ポリ核酸分子組成物は、その鏡像異性体の30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、あるいは1%以下を含む。場合によっては、ポリ核酸分子組成物は、ラセミ混合物の30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、あるいは1%以下を含む。いくつかの例では、ポリ核酸分子は、米国特許出願公開第：2014/194610号と2015/211006号；WO2015107425に記載されるポリ核酸分子である。

【 0 1 4 0 】

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

[ 0 1 4 1 ]

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

【 0 1 4 2 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、限定されないが、I K B K A P、S M N 2、M C A D、L M N A、D M P K、Z N F 9、M A P T、F K T N、T D P - 4 3、L D L R、C F T R、D M D、P A H、M S T N、あるいはK - R a sなどの疾患または障害に関する遺伝子によってコードされたR N Aの発現を調節するR N A i活性を有する。いくつかの例では、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、I K B K A P、S M N 2、M C A D、L M N A、D M P K、Z N F 9、M A P T、F K T N、T D P - 4 3、L D L R、C F T R、D M D、P A H、M S T N、あるいはK - R a sの少なくとも1つの発現をダウンレギュレートする二本鎖s i R N A分子であり、ここで、二本鎖s i R N A分子の鎖の1つは、I K B K A P、S M N 2、M C A D、L M N A、D M P K、Z N F 9、M A P T、F K T N、T D P - 4 3、L D L R、C F T R、D M D

10

20

30

40

50

、PAH、MSTN、あるいはK-Rasの少なくとも1つ、または、IKBKA P、SMN2、MCAD、LMNA、DMPK、ZNF9、MAPT、FKTN、TDP-43、LDLR、CFTR、DMD、PAH、MSTN、あるいはK-Rasの少なくとも1つによってコードされたRNA、またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、および、二本鎖siRNA分子の鎖の第2の鎖は、IKBKA P、SMN2、MCAD、LMNA、DMPK、ZNF9、MAPT、FKTN、TDP-43、LDLR、CFTR、DMD、PAH、MSTN、あるいはK-Rasの少なくとも1つ、または、IKBKA P、SMN2、MCAD、LMNA、DMPK、ZNF9、MAPT、FKTN、TDP-43、LDLR、CFTR、DMD、PAH、MSTN、あるいはK-Rasの少なくとも1つによってコードされたRNA、またはその一部のヌクレオチド配列に実質的に類似するヌクレオチド配列を含む。場合によっては、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、IKBKA P、SMN2、MCAD、LMNA、DMPK、ZNF9、MAPT、FKTN、TDP-43、LDLR、CFTR、DMD、PAH、MSTN、あるいはK-Rasの少なくとも1つの発現をダウンレギュレートする二本鎖siRNA分子であり、ここで、siRNA分子のそれぞれの鎖は、約15～25、18～24、あるいは19～約23のヌクレオチドを含み、および、それぞれの鎖は、別の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約14、17、あるいは19のヌクレオチドを含む。場合によっては、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、IKBKA P、SMN2、MCAD、LMNA、DMPK、ZNF9、MAPT、FKTN、TDP-43、LDLR、CFTR、DMD、PAH、MSTN、あるいはK-Rasの少なくとも1つの発現をダウンレギュレートする二本鎖siRNA分子であり、ここで、siRNA分子のそれぞれの鎖は約19～約23のヌクレオチドを含み、および、それぞれの鎖は、別の鎖のヌクレオチドに相補的な少なくとも約19のヌクレオチドを含む。いくつかの例では、RNAi活性は細胞内で生じる。他の例では、RNAi活性は再構成されたインビトロ系で生じる。

#### 【0143】

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

#### 【0144】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるポリ核酸分子は、DMD遺伝子に

10

20

30

40

50

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

#### 【0145】

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

#### 【0146】

場合によっては、ポリ核酸分子は、自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域を有する、二重の、非対称的で二重の、ヘアピン型の、または非対称的なヘアピン型の二次構造を有するポリヌクレオチドであり、ここで、アンチセンス領域は、別の標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有する。他の場合には、ポリ核酸分子は、2つ以上のループ構造と、自己相補的なセンス領域とアンチセンス領域を含む基部とを有する、環状の単鎖ポリヌクレオチドであり、ここで、アンチセンス領域は、標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、センス領域は標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列を有し、環状ポリヌクレオチドは、RNAiを媒介することが可能な活性なポリ核酸分子を生成するためにインビオまたはインビトロで処理される。さらなる場合には、ポリ核酸分子はさらに、標的核酸分子またはその一部のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有する単鎖ポリヌクレオチドを含み（例えば、そのようなポリ核酸分子は、標的核酸配列またはその一部に対応するヌクレオチド配列のポリ核酸分子内に存在することを必要としない）、単鎖ポリヌクレオチドはさらに、5' - リン酸塩（例えば、Martinez et al., 2002, Cell., 110, 563-574 and Schwarz et al., 2002, Molecular Cell, 10, 537-568を参照）あるいは5', 3' - ニリン酸塩などの末端のリン酸基を含む。

#### 【0147】

いくつかの例では、アンチセンス領域と、ヌクレオチドあるいは非ヌクレオチドを含むループ部分と、センス領域とを含む、線形のポリ核酸分子が非対称的であり、センス領域がアンチセンス領域を有する塩基対に対して十分相補的なヌクレオチドを有し、ループを有する二重鎖を形成する程度に、アンチセンス領域よりも少ないヌクレオチドを含む。例

10

20

30

40

50

えば、非対称的なヘアピン型のポリ核酸分子は、細胞中またはインビトロ系で RNAi を媒介するのに十分な長さを有するアンチセンス領域（例えば約 19 ~ 約 22 のヌクレオチド）、および約 4 ~ 約 8 のヌクレオチドを含むループ領域、ならびにアンチセンス領域に相補的な約 3 ~ 約 18 のヌクレオチドを有するセンス領域を含む。場合によっては、非対称的なヘアピン型のポリ核酸分子はさらに、化学修飾された 5' 末端のリン酸基を含む。さらなる場合には、非対称的なヘアピン型のポリ核酸分子のループ部分は、ヌクレオチド、非ヌクレオチド、リンカーモノマー、あるいは抱合体分子を含む。

#### 【 0148 】

いくつかの実施形態において、非対称的な二重鎖は、センス領域およびアンチセンス領域を含む 2 つの別々の鎖を有するポリ核酸分子であり、センス領域は、センス領域がアンチセンス領域との塩基対に対して十分な相補的なヌクレオチドを有し、かつ、二重鎖を形成する程度で、アンチセンス領域よりも少ないヌクレオチドを含む。例えば、非対称的な二重のポリ核酸分子は、細胞中またはインビトロ系で RNAi を媒介するのに十分な長さを有するアンチセンス領域（例えば約 19 約 22 のヌクレオチド）、および、アンチセンス領域に相補的な約 3 ~ 約 18 のヌクレオチドを有するセンス領域を含む。

10

#### 【 0149 】

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

20

#### 【 0150 】

##### ポリ核酸分子合成

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたポリ核酸分子は、当該技術分野で知られている手順を用いて、化学合成および / または酵素ライゲーション反応を用いて構築される。例えば、ポリ核酸分子は、自然発生のヌクレオチドを使用して、あるいは、分子の生体安定性を増大させるために、または、ポリ核酸分子と標的核酸との間で形成された二重鎖の物理安定度を増大させるために設計されたさまざまな修飾ヌクレオチドを用いて、化学合成される。例示的な方法は、米国特許第 5,142,047 号；第 5,185,444 号；第 5,889,136 号；第 6,008,400 号；および、第 6,111,086 号；PCT 公開公報第 WO 2009099942 号；あるいは、欧州公開公報第 1579015 号に記載されるものを含む。追加の例示的な方法は、以下に記載されるものを含む：Griffey et al., "2'-O-aminopropyl ribonucleotides: a zwitterionic modification that enhances the exonuclease resistance and biological activity of antisense oligonucleotides," J. Med. Chem. 39(26): 5100 - 5109 (1997)；Obika, et al. "Synthesis of 2'-O, 4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3, -endo sugar pucker," Tetrahedron Letters 38(50): 8735 (1997)；Koizumi, M. "ENA oligonucleotides as therapeutics." Current opinion in molecular therapeutics 8(2): 144 - 149 (2006)；and Abramova et al., "Novel oligonucleotide analogues based on morpholino nucleoside subunits - antisense technologies: new chemical possibilities," India 40

30

40

50

n Journal of Chemistry 48B: 1721 - 1726 (2009) 代替的に、ポリ核酸分子は、ポリ核酸分子がアンチセンス配向にサブクローン化された発現ベクターを用いて生物学的に生成される(つまり、挿入されたポリ核酸分子の転写されたRNAは所望の標的ポリ核酸分子に対してアンチセンス配向になる)。

【0151】

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

【0152】

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

【0153】

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

【0154】

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

【0155】

核酸ポリペプチド抱合体

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

10

20

30

30

40

50

部分に共役する。

【0156】

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

【0157】

10

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

【0158】

20

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

30

【0159】

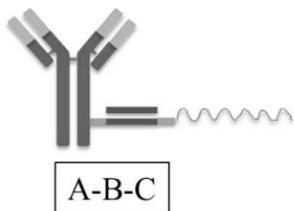
40

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

【0160】

50

【化11】



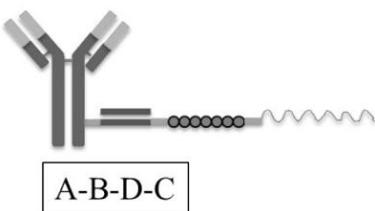
【0161】

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

10

【0162】

【化12】



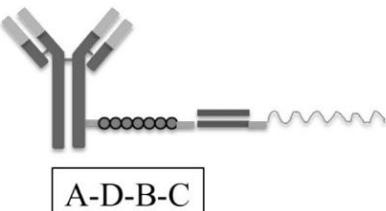
【0163】

20

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

【0164】

【化13】



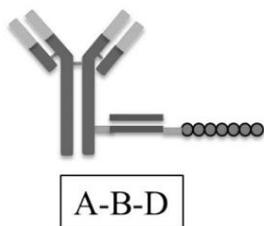
30

【0165】

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

【0166】

【化14】



40

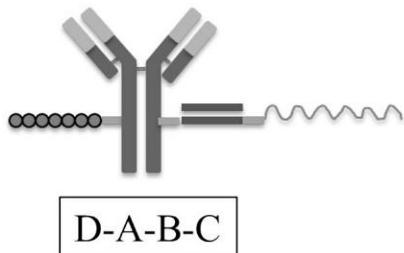
【0167】

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

【0168】

50

【化15】



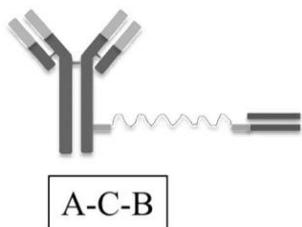
10

【0169】

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

【0170】

【化16】



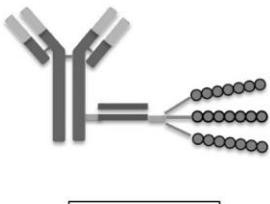
20

【0171】

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

【0172】

【化17】



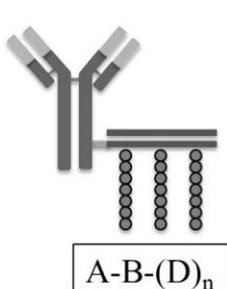
30

【0173】

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

【0174】

【化18】



40

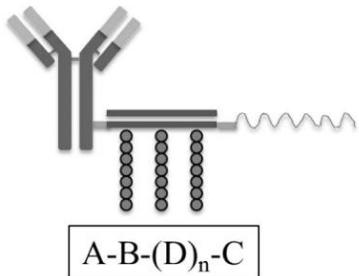
【0175】

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

【0176】

50

【化19】



10

【0177】

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

【0178】

【化20】



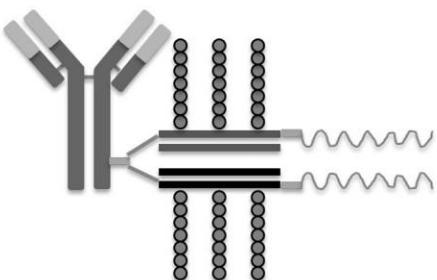
20

【0179】

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

【0180】

【化21】



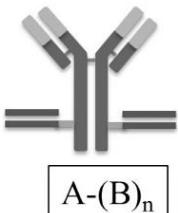
30

【0181】

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

【0182】

【化22】



40

【0183】

上記に示されるような

【0184】

50

## 【化23】



は、例示目的のために過ぎず、ヒト化抗体またはその結合フラグメント、キメラ抗体またはその結合フラグメント、モノクローナル抗体またはその結合フラグメント、一価 F a b '、二価 F a b 2、一本鎖可変フラグメント ( s c F v )、ダイアボディ、ミニボディ ( m i n i b o d y )、ナノボディ、單ードメイン抗体 ( s d A b )、またはラクダ抗体、あるいはその結合フラグメントを包含する。

## 【0185】

## 結合部分

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

## 【0186】

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

## 【0187】

いくつかの実施形態では、結合部分 A は、二重特異性抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、二重特異性抗体は三機能性抗体あるいは二重特異性ミニ抗体である。場合によっては、二重特異性抗体は三機能性抗体である。いくつかの例では、三機能性抗体は、2 つの異なる抗原のための結合部位を含む完全長のモノクローナル抗体である。

## 【0188】

場合によっては、二重特異性抗体は二重特異性ミニ抗体である。いくつかの例では、二重特異性ミニ抗体は、二価 F a b 2、F ( a b ) ' 3 フラグメント、ビス - s c F v ( s c F v ) 2、ダイアボディ、ミニボディ、三重特異性抗体、四重特異性抗体、あるいは二重

10

20

30

40

50

特異性 T 細胞エンゲージャー ( B i T E ) を含む。いくつかの実施形態において、二重特異性 T 細胞エンゲージャーは、2 つの s c F v s が 2 つの異なる抗原のエピトープを標的とする 2 つの单鎖可変フラグメント ( s c F v s ) を含む融合タンパク質である。

【 0 1 8 9 】

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

【 0 1 9 0 】

いくつかの実施形態において、結合部分 A は三重特異性抗体である。いくつかの例では、三重特異性抗体は F ( a b ) ' 3 フラグメントあるいは三重特異性抗体を含む。いくつかの例では、A は三重特異性 F ( a b ) ' 3 フラグメントである。場合によっては、A は三重特異性抗体である。いくつかの実施形態において、A は、D i m a s 、 et a l . , " D e v e l o p m e n t o f a t r i s p e c i f i c a n t i b o d y d e s i g n e d t o s i m u l t a n e o u s l y a n d e f f i c i e n t l y t a r g e t t h r e e d i f f e r e n t a n t i g e n s o n t u m o r c e l l s , " M o l . P h a r m a c e u t i c s , 1 2 ( 9 ) : 3 4 9 0 - 3 5 0 1 ( 2 0 1 5 ) に記載されるような三重特異性抗体である。

【 0 1 9 1 】

いくつかの実施形態において、結合部分 A は、細胞表面タンパク質を認識する抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、結合部分 A は、筋細胞上の細胞表面タンパク質を認識する抗体またはその結合フラグメントである。抗体あるいはその結合フラグメントによって認識される例示的な細胞表面タンパク質は、限定されないが、S c a - 1 、 C D 3 4 、 M y o - D 、 ミオゲニン 、 M R F 4 、 N C A M 、 C D 4 3 、 および C D 9 5 ( F a s ) を含む。

【 0 1 9 2 】

いくつかの例では、細胞表面タンパク質は、分化 ( C D ) 細胞表面マーカーのクラスタを含む。例示的な C D 細胞表面マーカーは、限定されないが、C D 1 、 C D 2 、 C D 3 、 C D 4 、 C D 5 、 C D 6 、 C D 7 、 C D 8 、 C D 9 、 C D 1 0 、 C D 1 1 a 、 C D 1 1 b 、 C D 1 1 c 、 C D 1 1 d 、 C D w 1 2 、 C D 1 3 、 C D 1 4 、 C D 1 5 、 C D 1 5 s 、 C D 1 6 、 C D w 1 7 、 C D 1 8 、 C D 1 9 、 C D 2 0 、 C D 2 1 、 C D 2 2 、 C D 2 3 、 C D 2 4 、 C D 2 5 、 C D 2 6 、 C D 2 7 、 C D 2 8 、 C D 2 9 、 C D 3 0 、 C D 3 1 、 C D 3 2 、 C D 3 3 、 C D 3 4 、 C D 3 5 、 C D 3 6 、 C D 3 7 、 C D 3 8 、 C D 3 9 、 C D 4 0 、 C D 4 1 、 C D 4 2 、 C D 4 3 、 C D 4 4 、 C D 4 5 、 C D 4 5 R O 、 C D 4 5 R A 、 C D 4 5 R B 、 C D 4 6 、 C D 4 7 、 C D 4 8 、 C D 4 9 a 、 C D 4 9 b 、 C D 4 9 c 、 C D 4 9 d 、 C D 4 9 e 、 C D 4 9 f 、 C D 5 0 、 C D 5 1 、 C D 5 2 、 C D 5 3 、 C D 5 4 、 C D 5 5 、 C D 5 6 、 C D 5 7 、 C D 5 8 、 C D 5 9 、 C D w 6 0 、 C D 6 1 、 C D 6 2 E 、 C D 6 2 L ( L - セレクチン ) 、 C D 6 2 P 、 C D 6 3 、 C D 6 4 、 C D 6 5 、 C D 6 6 a 、 C D 6 6 b 、 C D 6 6 c 、 C D 6 6 d 、 C D 6 6 e 、 C D 7 9 ( 例えは、 C D 7 9 a 、 C D 7 9 b ) 、 C D 9 0 、 C D 9 5 ( F a s ) 、 C D 1 0 3 、 C D 1 0 4 、 C D 1 2 5 ( I L 5 R A ) 、 C D 1 3 4 ( O X 4 0 ) 、 C D 1 3 7 ( 4 - 1 B B ) 、 C D 1 5 2 ( C T L A - 4 ) 、 C D 2 2 1 、 C D 2 7 4 、 C D 2 7 9 ( P D - 1 ) 、 C D 3 1 9 ( S L A M F 7 ) 、 C D 3 2 6 ( E p C A M ) などを含む。

【 0 1 9 3 】

いくつかの例では、制限する部分 A は抗体あるいはその結合フラグメントである、それは C D 細胞表面マーカーを認識する。いくつかの例では、結合部分 A は、 C D 1 、 C D 2

10

20

30

40

50

、 CD 3 、 CD 4 、 CD 5 、 CD 6 、 CD 7 、 CD 8 、 CD 9 、 CD 10 、 CD 11 a 、 CD 11 b 、 CD 11 c 、 CD 11 d 、 CD w 12 、 CD 13 、 CD 14 、 CD 15 、 CD 15 s 、 CD 16 、 CD w 17 、 CD 18 、 CD 19 、 CD 20 、 CD 21 、 CD 22 、 CD 23 、 CD 24 、 CD 25 、 CD 26 、 CD 27 、 CD 28 、 CD 29 、 CD 30 、 CD 31 、 CD 32 、 CD 33 、 CD 34 、 CD 35 、 CD 36 、 CD 37 、 CD 38 、 CD 39 、 CD 40 、 CD 41 、 CD 42 、 CD 43 、 CD 44 、 CD 45 、 CD 45 R O 、 CD 45 R A 、 CD 45 R B 、 CD 46 、 CD 47 、 CD 48 、 CD 49 a 、 CD 49 b 、 CD 49 c 、 CD 49 d 、 CD 49 e 、 CD 49 f 、 CD 50 、 CD 51 、 CD 52 、 CD 53 、 CD 54 、 CD 55 、 CD 56 、 CD 57 、 CD 58 、 CD 59 、 CD w 60 、 CD 61 、 CD 62 E 、 CD 62 L ( L - セレクチン ) 、 CD 62 P 、 CD 63 、 CD 64 、 CD 65 、 CD 66 a 、 CD 66 b 、 CD 66 c 、 CD 66 d 、 CD 66 e 、 CD 79 ( 例えれば、 CD 79 a 、 CD 79 b ) 、 CD 90 、 CD 95 ( F a s ) 、 CD 103 、 CD 104 、 CD 125 ( I L 5 R A ) 、 CD 134 ( O X 40 ) 、 CD 137 ( 4 - 1 B B ) 、 CD 152 ( C T L A - 4 ) 、 CD 221 、 CD 274 、 CD 279 ( P D - 1 ) 、 CD 319 ( S L A M F 7 ) 、 CD 326 ( E p C A M ) 、 または、これらの組み合わせを認識する抗体あるいはその結合フラグメントである。

#### 【 0194 】

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

#### 【 0195 】

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

#### 【 0196 】

いくつかの実施形態において、 1 つ以上のポリ核酸分子 ( B ) は結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、 11 、 12 、 13 、 14 、 15 、 16 あるいはそれ以上のポリ核酸分子は、 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 1 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 2 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 3 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 4 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 5 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 6 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 7 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 8 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 9 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 10 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 11 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 12 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。い

10

20

30

40

50

くつかの例では、約 1 3 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 1 4 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 1 5 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。いくつかの例では、約 1 6 のポリ核酸分子が 1 つの結合部分 A に共役する。場合によっては、1 つ以上のポリ核酸分子が同じである。他の例では、1 つ以上のポリ核酸分子が異なる。

#### 【 0 1 9 7 】

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

#### 【 0 1 9 8 】

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

#### 【 0 1 9 9 】

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

10

20

30

40

50

- 。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、6 である
- 。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、8 である
- 。いくつかの例では、結合部分 A に対するポリ核酸分子 (B) の D A R 比率は、12 である。

#### 【 0 2 0 0 】

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

#### 【 0 2 0 1 】

いくつかの実施形態において、抗体またはその結合フラグメントは、単独あるいは組み合わせて、当該技術分野で知られている従来の技術を使用して、例えば、アミノ酸の欠失、挿入、置換、追加を用いることによって、および / または、組換え、ならびに / あるいは、当該技術分野で知られている他の修飾（例えば、グリコシリ化とリン酸化などの翻訳後および化学的な修飾）によって、さらに修飾される。いくつかの例では、修飾は、F<sub>c</sub>受容体との相互作用を調節するための修飾をさらに含む。いくつかの例では、1 つ以上の修飾は、例えば、国際公開第 WO 97 / 34631 に記載されるものを含み、当該文献は F<sub>c</sub>ドメインと F<sub>c</sub>R<sub>n</sub>受容体との間の相互作用を関与するアミノ酸残基を開示している。抗体またはその結合フラグメントのアミノ酸配列の基礎となる核酸配列にそのような修飾を導入する方法は、当業者に周知である。

#### 【 0 2 0 2 】

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

#### 【 0 2 0 3 】

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

#### 【 0 2 0 4 】

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

#### 【 0 2 0 5 】

いくつかの実施形態において、本明細書で使用されるように、～との結合または～による相互作用とは、互いに少なくとも 2 つの抗原相互作用部位の結合 / 相互作用を定義する。いくつかの例では、抗原相互作用部位は、特異性抗原または抗原の特異的な群との特定の相互作用の能力を示すポリペプチドのモチーフを定義する。場合によっては、結合 / 相互作用は特定の認識を定義するとも理解される。そのような場合、特定の認識は、抗体あるいはその結合フラグメントが、標的分子の各々の少なくとも 2 つのアミノ酸に特異的に相互作用および / または結合することができるということを指す。例えば、特定の認識は

10

20

30

40

50

、抗体分子の特異性、あるいは標的分子の特定の範囲を区別するその能力に関する。追加の例では、抗原相互作用部位のその特異性抗原との特定の相互作用は、例えば、抗原の立体配座の変化、抗原のオリゴマー化などの誘導による、シグナルの開始をもたらす。さらなる実施形態では、結合は「鍵と鍵穴の原則 (key-lock-principle)」の特異性によって例証される。したがって、いくつかの例では、抗原相互作用部位および抗原のアミノ酸配列における特定のモチーフは、上記構造の第2の修飾の結果と同様に、その1次、2次、または3次構造の結果として互いに結合する。そのような場合、抗原相互作用部位のその特異性抗原との特定の相互作用は、その部位の抗原への簡単な結合をもたらす。

## 【0206】

10

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

## 【0207】

## 共役化学

いくつかの実施形態において、ポリ核酸分子Bは結合部分に共役する。いくつかの例では、結合部分はアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、抗原、毒素、ホルモン、脂質、ヌクレオチド、ヌクレオシド、糖類、炭水化物、ポリエチレンギリコールとポリプロピレンギリコールなどのポリマー、同様に、これらのクラスの物質のすべてのアナログあるいは誘導体を含む。結合部分の追加の例はさらに、コレステロール、リン脂質、ジアシルグリセロールおよびトリアシルグリセロール、脂肪酸、炭化水素(例えば、飽和、不飽和、または、置換を含む)、酵素基質、ビオチン、ジゴキシゲニン、および多糖類などのステロイドを含む。いくつかの例では、結合部分は、抗体またはその結合フラグメントである。いくつかの例では、ポリ核酸分子はさらにポリマーに共役され、随意にエンドソーム溶解性部分に共役する。

## 【0208】

30

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

40

50

## 【0209】

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

## 【0210】

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

## 【0211】

いくつかの例では、ポリ核酸分子は、酵素触媒プロセスを利用する部位指定的な方法によって共役する。いくつかの例では、部位指定的な方法は SMARTag (商標) 技術 (Redwood) を利用する。いくつかの例では、SMARTag (商標) 技術は、アルデヒドタグの存在下での酸化プロセスを介するホルミルグリシン生成酵素 (FGE) によるシステインからのホルミルグリシン (FGly) 残留物の生成、および、ヒドラジノ-Pictet-Spengler (HIPS) ライゲーションを介するアルキルヒドラジン機能化ポリ核酸分子への FGly のその後の共役を含む。  
(Wu et al., "Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using the genetically encoded aldehyde tag," PNAS 106 (9): 3000-3005 (2009); Agarwal, et al., "A Pictet-Spengler ligation for protein chemical modification," PNAS 110 (1): 46-51 (2013) を参照)

## 【0212】

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

## 【0213】

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

## 【0214】

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

10

20

30

40

50

## 【0215】

抗体あるいはその結合フラグメントの產生

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

## 【0216】

いくつかの例では、抗体あるいはその結合フラグメントは組換え発現され、抗体またはその結合フラグメントをコードする核酸は、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから組み立てられ（例えばKutmeier et al., 1994, *Biotechniques* 17: 242に記載されるように）、これは、PCRを抗体をコードする配列の重複するオリゴヌクレオチド含有部分の合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングとライゲーション、およびその後のライゲートされたオリゴヌクレオチドの増幅の合成を含んでいる。

10

## 【0217】

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

20

## 【0218】

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

30

## 【0219】

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

40

## 【0220】

いくつかの実施形態において、単鎖抗体 (U.S. Pat. No. 4,694,778; Bird, 1988, *Science* 242: 423-42; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; and Ward et al., 1989, *Nature*

50

334 : 544 - 54) の生成のために記載された技術は、単鎖抗体を生成するのに適している。単鎖抗体は、アミノ酸ブリッジによって Fv 領域の重鎖または軽鎖のフラグメントを結合することによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じさせる。大腸菌中の機能的な Fv フラグメントの組み立てのための技術も隨意に使用される (Skerra et al., 1988, Science 242: 1038 - 1041)。

【0221】

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

【0222】

いくつかの実施形態において、様々な宿主発現ベクター系は、本明細書に記載される抗体またはその結合フラグメントを発現するために利用される。そのような宿主発現系は、抗体のコード配列が生成され、その後精製されるビヒクルを表すが、適切なヌクレオチドコード配列で変形されるかトランスフェクトされるときに、抗体またはその結合フラグメントをインサイチュで発現する細胞を表す。これらは、限定されないが、組み換え体バクテリオファージDNA、プラスミドDNA、あるいは抗体またはその結合フラグメントコード配列を含むコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、大腸菌と枯草菌）などの微生物；抗体あるいはその結合フラグメントコード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、サッカロミケス・ピキア）；抗体あるいはその結合フラグメントコード配列を含む組替えウイルス発現ベクターに感染した昆虫細胞系（例えばバキュロウイルス）；組替えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）およびタバコモザイクウイルス（TMV））に感染した、または、抗体あるいはその結合フラグメントコード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された植物細胞系；あるいは、哺乳動物細胞（例えば、メタロチオネイン・プロモーター）のゲノム、あるいは、哺乳動物ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）に由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を保護する哺乳動物細胞系（例えば、COS、CHO、BH、293、293T、3T3細胞）を含む。

【0223】

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

【0224】

いくつかの例では、限定されないが、それぞれ tk-、hprt-、あるいは aprt- 細胞で採用される単純疱疹ウイルス・チミジンキナーゼ (Wigler et al., 1977, Cell 11: 223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシリトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202)、およびアデニンホスホリボシリトランスフェラーゼ (Lowy et al., 1980, Cell 22: 817) 遺伝子を含む、多くの選択系が使用される。同様に、代謝拮抗薬の耐性は、以下

10

20

30

40

50

の遺伝子のための選定基準として使用される：メトトレキサートに対する耐性を与えるdhfr (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527)；ミコフェノール酸に対する耐性を与えるgpt (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072)；アミノグリコシドG-418に対する耐性を与えるneo (Clinical Pharmacy 12: 488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan, 1993, Science 260: 926-932; and Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5): 155-215)、およびヒグロマイシンに対する耐性を与えるhygro (Santerre et al., 1984, Gene 30: 147)。使用可能な組換えDNA技術の当該技術分野で知られている既知の方法は一般に、Ausubel et al. (eds., 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds.), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150: 1) に記載される。  
10

#### 【0225】

いくつかの例では、抗体の発現レベルはベクター増幅によって増大する（レビューのために、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987を参照）。抗体を発現するベクター系中のマーカーが増幅可能であるとき、宿主細胞の培養物中に存在する阻害剤のレベルの増大は、標識遺伝子のコピーの数を増大させる。増幅された領域が抗体のヌクレオチド配列に関連しているため、抗体の産生も増加する (Crouse et al., 1983, Mol. Cell Biol. 3: 257)。  
20

#### 【0226】

いくつかの例では、抗体または抗体抱合体の精製あるいは分析のための当該技術分野で知られているいかなる方法が、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、とりわけ、プロテインAの後の特異性抗原への親和性、および、サイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、差次的溶解性、あるいはタンパク質の精製のための他の標準的な技術によって使用される。例示的なクロマトグラフィー方法としては、限定されないが、強力な陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、および高速タンパク質液体クロマトグラフィーが挙げられる。  
30

#### 【0227】

##### ポリマー共役部分

いくつかの実施形態において、ポリマー部分Cはさらに、本明細書に記載されたポリ核酸分子、本明細書に記載される結合部分、あるいはこれらの組み合わせに共役する。いくつかの例では、ポリマー部分Cはポリ核酸分子に共役する。場合によっては、ポリマー部分Cは結合部分に共役する。他の場合には、ポリマー部分Cはポリ核酸分子結合部分分子  
40

に共役する。さらなる場合には、ポリマー部分 C は上で例証されるように共役する。

【0228】

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

10

【0229】

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

20

【0230】

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

30

【0231】

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

40

【0232】

いくつかの実施形態において、C はポリアルキレンオキシド（例えば PEG）であり、約 200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、37

50

50、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。いくつかの実施形態において、CはPEGであり、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000、または100,000 Daの分子量を有する。いくつかの例では、Cの分子量は約2000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約3000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約4000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約5000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約6000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約7000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約8000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約9000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約10000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約12000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約13000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約14000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約14500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約15000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約16000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約17000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約18000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約19000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約20000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約21000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約22000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約23000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約24000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約25000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約26000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約27000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約28000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約29000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約30000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約32500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約33500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約35000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約37500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約40000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約42500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約45000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約46000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約47500Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約50000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約55000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約60000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約65000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約70000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約75000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約80000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約100000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約120000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約200000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約350000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約400000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約400000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約500000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約600000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約600000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約600000Daである。いくつかの例では、Cの分子量は約1000000Daである。

### 【0233】

いくつかの実施形態において、ポリアルキレンオキシド（例えばPEG）は、別々のエチレンオキシド単位（例えば、4～約48のエチレンオキシド単位）を含む。いくつかの

10

20

30

40

50

例では、別々エチレンオキシド単位を含むポリアルキレンオキシドは直鎖である。他の症例では、別々エチレンオキシド単位を含むポリアルキレンオキシドは分枝鎖である。

【 0 2 3 4 】

いくつかの例では、ポリマー部分Cは別々エチレンオキシド単位を含むポリアルキレンオキシド（例えばPEG）である。場合によっては、ポリマー部分Cは約4～約48エチレンオキシド単位を含む。場合によっては、ポリマー部分Cは、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、または約48エチレンオキシド単位を含む。

10

【 0 2 3 5 】

20

30

40

50

位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約31エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約32エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約33エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約34エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約35エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約36エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約37エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約38エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約39エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約40エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約41エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約42エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約43エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約44エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約45エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約46エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約47エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。場合によっては、ポリマー部分Cは、例えば、約48エチレンオキシド単位を含む別々のPEGである。

【0236】

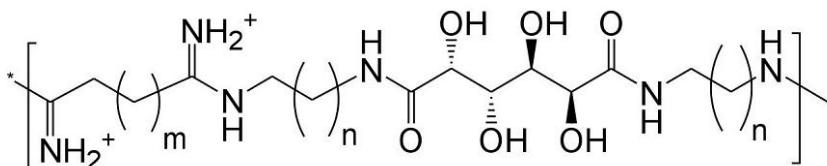
場合によっては、ポリマー部分Cは、dPEGR (Quanta Biodesign Ltd)である。

【0237】

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

【0238】

【化24】



式V

【0239】

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

【0240】

いくつかの例では、cMAPはさらにPEG部分に共役され、cMAP-PEGコポリマー、mPEG-cMAP-PEGmトリブロックポリマー、あるいはcMAP-PEG-cMAPトリブロックポリマーを生成する。いくつかの例では、PEG部分は約500Da～約50,000Daまでの範囲である。いくつかの例では、PEG部分は、約500Daから約1000Da、1000Da以上～約5000Da、5000Da以上～約10,000Da、10,000Da以上～約25,000Da、25,000Da以上～約

10

20

30

40

50

50,000Da、あるいはこれらの範囲の2以上の任意の組み合わせである。

【0241】

いくつかの例では、ポリマー部分Cは、cMAP-PeGコポリマー、mPeG-cMAP-PeGmトリブロックポリマー、あるいはcMAP-PeG-cMAPトリブロックポリマーである。場合によっては、ポリマー部分CはcMAP-PeGコポリマーである。他の場合には、ポリマー部分CはmPeG-cMAP-PeGmトリブロックポリマーである。さらなる場合には、ポリマー部分CはcMAP-PeG-cMAPトリブロックポリマーである。

【0242】

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

10

【0243】

エンドソーム溶解性部分

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

20

【0244】

エンドソーム溶解性ポリペプチド

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

30

【0245】

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

40

【0246】

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

50

## 【0247】

いくつかの例では、ムチンは、サソリ (*Mesobuthus eupeus*) の毒液腺に由来する抗菌ペプチド (AMP) である。いくつかの例では、ムチンはムチン-13から構成され、これらの配列は、IFGAIAGLLKNIF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 8) を含み、ムチン-18配列は、FFGHLFKLATKIIPLSLFQ (SEQ ID NO: 9) を含む。

## 【0248】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性ポリペプチドは、その配列がINF7あるいはその誘導体に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、あるいは99%の配列同一性であるポリペプチド、メリチンあるいはその誘導体、または、ムチンあるいはその誘導体を含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、INF7またはその誘導体、メリチンまたはその誘導体、あるいはムチンまたはその誘導体を含む。

10

## 【0249】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はINF7またはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1-5に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 1に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 2-5に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 2-5を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 1からなる。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 2-5からなる。

20

## 【0250】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はメリチンまたはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 6または7に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 6に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 7に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 6を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 7を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 6からなる。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はSEQ ID NO: 7からなる。

30

## 【0251】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分はムチンまたはその誘導体である。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 8または9に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、SEQ ID NO: 8に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

40

50

0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは1 0 0 %の配列同一性を有するポリペプチドを含む。いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、S E Q I D N O : 9 に対して少なくとも5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは1 0 0 %の配列同一性を有するポリペプチドを含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はS E Q I D N O : 8 を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はS E Q I D N O : 9 を含む。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はS E Q I D N O : 8 からなる。場合によっては、エンドソーム溶解性部分はS E Q I D N O : 9 からなる。

【0 2 5 2】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は表1で例証されるような配列を含む。

【0 2 5 3】

10

20

30

40

50

## 【表1-1】

表1.

名称	起源	アミノ酸配列	SEQ ID NO:	タイプ
Pep-1	サルウイルス40 ラジ抗原およびHIVの逆転写酵素からのNLS	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	10	一次両親媒性
pVEC	VE-カドヘリン	LLIILRRRRIRKQAHHSK	11	一次両親媒性
VT5	合成ペプチド	DPKGDPKGVTVTVTGTGKDP KPD	12	β-シート両親媒性
C105Y	I-アンチトリブシン	CSIPPEVKFNKPFVYLI	13	-
トランスポーター	ガラニンとマストバラン	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALA KKIL	14	一次両親媒性
TP10	ガラニンとマストバラン	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	15	一次両親媒性
MPG	HIV gp41の融合配列とSV40 T抗原のNLSからの疎水性ドメイン	GALFLGFLGAAGSTMGA	16	β-シート両親媒性
gH625	I型HSVの糖タンパク質gH	HGLASTLTRWAHYNALIRAF	17	二次両親媒性α-ヘリックス
CADY	PPTG1ペプチド	GLWRALWRLRLSLWRLLWRA	18	二次両親媒性α-ヘリックス
GALA	合成ペプチド	WEAALAEALAEALAEHLAEALAE ALEALAA	19	二次両親媒性α-ヘリックス
INF	インフルエンザHA2融合ペプチド	GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC	20	二次両親媒性α-ヘリックス/pH依存性膜活性ペプチド
HA2E5-TAT	インフルエンザウイルスX31菌株融合ペプチドのインフルエンザHA2サブユニット	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG	21	二次両親媒性α-ヘリックス/pH依存性膜活性ペプチド
HA2-ペネトラン	インフルエンザウイルスX31菌株融合ペプチドのインフルエンザHA2サブユニット	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGRQIKI WFQNRMRKW KK-アミド	22	pH-依存性膜活性ペプチド
HA-K4	インフルエンザウイルスX31菌株融合ペプチドのインフルエンザHA2サブユニット	GLFGAIAGFIENGWEGMIDG- SSKKKK	23	pH-依存性膜活性ペプチド

10

20

30

40

## 【0254】

【表1-2】

	ト			
HA2E4	インフルエンザウイルス X31 菌株融合ペプチドのインフルエンザ HA2 サブユニット	GLFEAIAGFIENGWEGMIDGGGYC	24	pH-依存性膜活性ペプチド
H5WYG	HA2 アナログ	GLFHAIAHFIHGGWH GLIHGWYG	25	pH-依存性膜活性ペプチド
GALA-INF3-(PEG)6-NH	INF3 融合ペプチド	GLFEAIEGFIENGWEGLAEALAEAL EALAA-(PEG)6-NH2	26	pH-依存性膜活性ペプチド
CM18-TAT11	セクロビン-A-メリチン <sub>2-12</sub> (CM <sub>18</sub> ) 融合ペプチド	KWKLFKKIGAVLKVLTTG-YGRKKRRQRRR	27	pH-依存性膜活性ペプチド

## 【0255】

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

## 【0256】

いくつかの例では、エンドソーム溶解性部分は、PCT公開公報 WO 2013/166155 号または WO 2015/069587 号に記載されるようなポリペプチド (例えば、細胞透過性ポリペプチド) を含む。

## 【0257】

## リンカー

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

## 【0258】

場合によっては、リンカーは非ポリマーリンカーである。非ポリマーリンカーは、重合プロセスによって生成された単量体の反復単位を含まないリンカーを指す。例示的な非ポリマーリンカーとしては、限定されないが、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル基 (例えば、C<sub>5</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>、あるいは C<sub>1</sub> アルキル基)、ホモ二機能性架橋リンカー、ヘテロ二機能性架橋リンカー、ペプチドリンカー、トレースレスリンカー、自壊性リンカー、マレイミドベースのリンカー、あるいはこれらの組み合わせが挙げられる。場合によっては、非ポリマーリンカーは、C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> アルキル基 (例えば、C<sub>5</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>、あるいは C<sub>1</sub> アルキル基)、ホモ二機能性架橋リンカー、ヘテロ二機能性架橋リンカー、ペプチドリンカー、トレースレスリンカー、自壊性リンカー、マレイミドベースのリンカー、あるいはこれらの組み合わせを含む。さらなる場合には、非ポリマーリンカーは、2つを超える同じタイプのリンカー、例えば、2つを超えるホモ二機能性架橋リンカー、あるいは2つを超えるペプチドリンカーを含まない。さらなる場合には、非ポリマーリンカーは随意に1つ以上の反応性官能基を含む。

## 【0259】

10

20

30

40

50

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

#### 【0260】

いくつかの例では、リンカーはホモ二機能性リンカーを含む。例示的なホモ二機能性リンカーは、限定されないが、Lomantの試薬ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）DSP、3'3'-ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロブリオネート（DTSSP）、ジスクシンイミジルスベリン酸塩（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベリン酸塩（BS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホDST）、エチレングリコビス（スクシンイミジルスクシネット）、ジスクシンイミジルグルタル酸塩（DSG）（EGS））、N、N'-ジスクシンイミジル炭酸塩（DSC）、アジプイミド酸ジメチル（DMA）、ジメチルピメリミデートピメリミデート（DMP）、ジメチルスベリミデート（DMS）、ジメチル-3,3'-ジチオビスプロピオンイミデート（DTBP）、1,4-ジ-3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド）ブタン（DPDPB）、ビスマレイミドヘキサン（BMH）、例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン、1,3-ジフルオロ-4,6-ジニトロベンゼンなどのハロゲン化アリール含有化合物（DFDNB）、4,4'-ジフルオロ-3,3'-ジニトロフェニルスルホン（DFDNP）、ビス-[-(4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィド（BASED）、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、1,4-ブタンジオール・ジグリシジルエーテル、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、o-トルイジン、3,3'-ジメチルベンジジン、ベンジジン、-p-ジアミノジフェニル、ジヨード-p-キシレン・スルホン酸、N,N'-エチレンビス（ヨードアセトアミド）、あるいは、N,N'-ヘキサメチレン-ビス（ヨードアセトアミド）を含む。

#### 【0261】

いくつかの実施形態では、リンカーはヘテロ二機能性リンカーを含む。例示的なヘテロ二機能性リンカーは、限定されないが、アミン反応的およびスルフヒドリル架橋リンカー、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸塩（SPD-P）、長鎖N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸塩（LC-SPDP）、水溶性の長鎖N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸塩（スルホ-LC-sPDP）、スクシンイミジルオキシカルボニル- -メチル- --(2-ピリジルジチオ)トルエン（SMP-T）、スルホスクシンイミジル-6-[ -メチル- --(2-ピリジルジチオ)トルアミド]ヘキサン酸塩（スルホLC-sMPT）、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸塩（SMCC）、スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸塩（スルホ-sMCC）、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBs）、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル（スルホ-MB）、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノ安息香酸塩（SIAAB）、スルホスクシンイミジル(4-iodoacteyl)アミノ安息香酸塩（スルホ-sIAB）、スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)酪酸塩（SMPB）、スルホスクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)酪酸塩、N-(-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド・エステル（GMB）（スルホ-sMPB）-N-(-マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステル（スルホ-GMB）、スクシンイミジル-6-((ヨードアセチル)アミノ)ヘキサン酸塩（SIAAX）、スクシンイミジル-6-[6-((ヨードアセチル)アミノ)ヘキサノイル]アミノ]ヘキサン酸塩（SIAAXX）、スクシンイミジル-4-((ヨードアセチル)アミノ)メチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸塩（SIAAC）、スクシンイミジル-6-(((4-ヨードアセチル)アミノ)メチル)シクロヘキサン-1-カルボニル)アミノ)ヘキサン酸塩（SIACX）、p-ニトロフェニルヨード

10

20

30

40

50

酢酸塩 (N P I A)、4 - (4 - N - マレイミドフェニル) 酪酸ヒドラジド (M P B H)、4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシル - ヒドラジド - 8 (M 2 C 2 H)、3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオニルヒドラジド (P D P H) などのカルボニル反応的およびスルフヒドリル反応的な架橋リンカー、アミン反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、N - ヒドロキシスクシンイミジル - 4 - アジドサリチル酸 (N H - A s A)、N - ヒドロキシスルホスクシンイミジル - 4 - アジドサリチル酸 (スルホ - N H - A s A)、スルホスクシンイミジル - (4 - アジドサリチルアミド) ヘキサン酸塩 (スルホ - N H - L C - A s A)、スルホスクシンイミジル - 2 - ( - アジドサリチルアミド) エチル - 1, 3' - ジチオプロピオネート (s A s D)、N - ヒドロキシスクシンイミジル - 4 - アジド安息香酸塩 (H s A B)、N - ヒドロキシスルホスクシンイミジル - 4 - アジド安息香酸塩 (スルホ - H s A B)、N - スクシンイミジル - 6 - (4' - アジド - 2' - ニトロフェニルアミノ) ヘキサン酸塩 (s A N P A H)、スルホスクシンイミジル - 6 - (4' - アジド - 2' - ニトロフェニルアミノ) ヘキサン酸塩 (スルホ - s A N P A H)、N - 5 - アジド - 2 - ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド (A N B - N O s)、スルホスクシンイミジル - 2 - (m - アジド - o - ニトロベンズアミド) - エチル - 1, 3' - ジチオプロピオネート (s A N D)、N - スクシンイミジル - 4 (4 - アジドフェニル) 1, 3' - ジチオプロピオネート (s A D P)、N - スルホスクシンイミジル (4 - アジドフェニル) - 1, 3' - ジチオプロピオネート (スルホ - s A D P)、スルホスクシンイミジル 4 - ( - アジドフェニル) 酪酸塩 (スルホ - s A P B)、スルホスクシンイミジル 2 - (7 - アジド - 4 - メチルクマリン - 3 - アセトアミド) エチル - 1, 3' - ジチオプロピオネート (s A E D)、スルホスクシンイミジル 7 - アジド - 4 - メチルクマリン - 3 - 酢酸塩 (スルホ - s A M C A)、 - ニトロフェニル・ジアゾピルバート (N P D P)、 - ニトロフェニル - 2 - ジアゾ - 3, 3, 3 - トリフルオロプロピオネート (P N P - D T P)、スルフヒドリル反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、1 - ( - アジドサリチルアミド) - 4 - (ヨードアセトアミド) プタン (A s I B)、N - [4 - ( - アジドサリチルアミド) プチル] - 3' - (2' - ピリジルジチオ) プロピオンアミド (A P D P)、ベンゾフェノン - 4 - ヨードアセトアミド、ベンゾフェノン - 4 - マレイミドカルボニル反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、 - アジドベンゾイルヒドラジド (A B H)、カルボン酸塩反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、4 - ( - アジドサリチルアミド) プチルアミン (A s B A)、および、アルギニン反応的および光反応性の架橋リンカー、例えば、 - アジドフェニルグリオキサール (A P G) を含む。

#### 【0262】

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

#### 【0263】

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

#### 【0264】

いくつかの実施形態において、マレイミド基は自己安定化マレイミドである。いくつか

10

20

30

40

50

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

10

#### 【0265】

いくつかの実施形態では、リンカーはペプチド部分を含む。いくつかの例では、ペプチドは少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のアミノ酸残基を。いくつかの例では、ペプチド部分は切断可能なペプチド部分（例えば、酵素的または化学的に）である。いくつかの例では、ペプチド部分は切断不可能なペプチド部分である。いくつかの例では、ペプチド部分は、Val-Cit（バリン-シトルリン）、Gly-Gly-Phe-Gly（SEQ ID NO: 973）、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu（SEQ ID NO: 974）、またはGly-Phe-Leu-Gly（SEQ ID NO: 975）を含む。いくつかの例では、リンカーは、などのペプチド部分を含む：Val-Cit（バリン-シトルリン）、Gly-Gly-Phe-Gly（SEQ ID NO: 973）、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu（SEQ ID NO: 974）、またはGly-Phe-Leu-Gly（SEQ ID NO: 975）によっては、リンカーはVal-Citを含む。場合によっては、リンカーはVal-Citである。

20

#### 【0266】

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

30

#### 【0267】

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

40

#### 【0268】

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

#### 【0269】

50

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

#### 【0270】

いくつかの実施形態において、リンカーは、トレースレスリンカーであるか、または、切斷後に、結合部分A、ポリヌクレオチドB、ポリマーC、あるいはエンドソーム溶解性部分Dに対するリンカー部分（例えば、原子あるいはリンカー基）を残さないリンカーである。例示的なトレースレスリンカーは、限定されないが、ゲルマニウムリンカー、ケイ素リンカー、硫黄リンカー、セレンリンカー、窒素リンカー、リンリンカー、ホウ素リンカー、クロムリンカー、あるいはフェニルヒドラジドリンカーを含む。場合によっては、リンカーは、Hejesen, et al., "A traceless aryl-triazene linker for DNA-directed chemistry," *Org Biomol Chem* 11(15): 2493-2497 (2013)に記載されるようなトレースレスアリール-トリアゼンリンカーである。いくつかの例では、リンカーは、Blaney, et al., "Traceless solid-phase organic synthesis," *Chem. Rev.* 102: 2607-2024 (2002)に記載されるトレースレスリンカーである。いくつかの例では、リンカーは米国特許第6,821,783号に記載されるトレースレスリンカーである。

10

20

#### 【0271】

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

30

#### 【0272】

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

#### 【0273】

いくつかの例では、Xは単結合あるいはリンカー、例えば、非ポリマーリンカーである。いくつかの例では、Xは単結合である。いくつかの例では、Xは非ポリマーリンカーである。いくつかの例では、非ポリマーリンカーはC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル基である。場合によっては、Xは、例えば、C<sub>5</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>、あるいはC<sub>1</sub>アルキル基などのC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル基である。場合によっては、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル基は非置換のC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル基である。非ポリマーリンカーの文脈において、とりわけ、Xの文脈において使用されるように、アルキルは最大で6つの炭素原子を含む飽和した直鎖または分岐鎖の炭化水素ラジカルを意味する。いくつかの例では、Xは上方で記載されたホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーを含む。場合によっては、Xはヘテロ二機能性リンカーを含む。場合によっては、XはsMCCを含む。他の例では、XはC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル基に随意に共役したヘテロ二機能性リンカーを含む。他の例では、XはC<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>アルキル基に随意に共役したsMCCを含める。追加の例では、Xはポリマー部分Cによって包含されるポリマーを包含せず、例えば、Xはポリアルキレンオキシド（例えばPEG分子）を包含しない。

40

#### 【0274】

いくつかの例では、Yは単結合あるいはリンカー、例えば、非ポリマーリンカーである。いくつかの例では、Yは単結合である。他の場合には、Yは非ポリマーリンカーである

50

。いくつかの実施形態において、YはC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル基である。いくつかの例では、Yは上方で記載されたホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの例では、Yは上方で記載されたホモ二機能性リンカーである。いくつかの例では、Yは上方で記載されたヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの例では、Yは、上に記載されたマレイミドカブロイル(m c)などのマレイミド基、あるいは自己安定化マレイミド基を含む。いくつかの例では、YはV a l - C i tなどのペプチド部分を含む。いくつかの例では、YはP A B Aなどの安息香酸基を含む。さらなる例では、Yは、マレイミド基、ペプチド部分、および/または、安息香酸基の組み合わせを含む。追加の例では、Yはm c基を含む。追加の例では、Yはm c - v a l - c i t基を含む。追加の例では、Yはv a l - c i t - P A B A基を含む。追加の例では、Yはm c - v a l - c i t - P A B A基を含む。場合によっては、Yはポリマー部分Cによって包含されるポリマーを包含せず、例えば、Yはポリアルキレンオキシド(例えばP E G分子)を包含しない。

#### 【0275】

いくつかの例では、Lは単結合またはリンカー、随意に非ポリマーリンカーを含む。場合によっては、Lは単結合である。他の場合には、Lは任意にリンカー、随意に非ポリマーリンカーである。いくつかの実施形態において、LはC<sub>1</sub> - C<sub>6</sub>アルキル基である。いくつかの例では、Lは上方で記載されたホモ二機能性リンカーあるいはヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの例では、Lは上方で記載されたホモ二機能性リンカーである。いくつかの例では、Lは上方で記載されたヘテロ二機能性リンカーである。いくつかの例では、Lは、上に記載されたマレイミドカブロイル(m c)などのマレイミド基、あるいは自己安定化マレイミド基を含む。いくつかの例では、LはV a l - C i tなどのペプチド部分を含む。いくつかの例では、LはP A B Aなどの安息香酸基を含む。さらなる例では、Lは、マレイミド基、ペプチド部分、および/または、安息香酸基の組み合わせを含む。追加の例では、Lはm c基を含む。追加の例では、Lはm c - v a l - c i t基を含む。追加の例では、Lはv a l - c i t - P A B A基を含む。追加の例では、Lはm c - v a l - c i t - P A B A基を含む。場合によっては、Lが随意に非ポリマーリンカーとしてある場合には、ポリマー部分Cによって包含されるポリマーを包含せず、例えば、Yはポリアルキレンオキシド(例えばP E G分子)を包含しない。

#### 【0276】

##### 医薬製剤

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される医薬製剤は、限定されないが、非経口(例えば、静脈内、皮下、筋肉内)、経口、鼻腔内、頬側、局所、直腸、または経皮の投与経路を含む複数の投与経路によって、被験体に投与される。いくつかの例では、本明細書に記載される医薬組成物は、非経口(例えば、静脈内、皮下、筋肉内、動脈内、腹腔内、髄腔内、大脳内、脳室内、頭蓋内)投与のために製剤される。他の例において、本明細書に記載される医薬組成物は経口投与のために製剤される。また他の例において、本明細書に記載される医薬組成物は経鼻投与のために製剤される。

#### 【0277】

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

#### 【0278】

いくつかの例では、医薬製剤は多粒子製剤を含む。いくつかの例では、医薬製剤はナノ粒子製剤を含む。いくつかの例では、ナノ粒子はc M A P、シクロデキストリン、あるいは脂質を含む。場合によっては、ナノ粒子は、固体脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、自己乳化ナノ粒子、リポソーム、マイクロエマルジョン、あるいはミセル溶液を含む。さらなる例示的なナノ粒子は、限定されないが、常磁性ナノ粒子、超常磁性ナノ粒子、金属ナノ粒子、フラーレン様材料、無機ナノチューブ、デンドリマー(共有結合した金属キレー

10

20

30

40

50

トを有するものなど)、ナノファイバー、ナノホーン、ナノオニオン、ナノロッド、ナノロープ、および量子ドットを含む。いくつかの例では、ナノ粒子は、金属ナノ粒子、例えば、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、イットリウム、ジルコニウム、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、銀、カドミウム、ハフニウム、タンタル、タングステン、レニウム、オスミウム、イリジウム、白金、金、ガドリニウム、アルミニウム、ガリウム、インジウム、スズ、タリウム、鉛、ビスマス、マグネシウム、カルシウム、ストロンチウム、バリウム、リチウム、ナトリウム、カリウム、ホウ素、シリコン、リン、ゲルマニウム、ヒ素、アンチモン、およびこれらの組み合わせ、その合金またはオキシドのナノ粒子である。

## 【0279】

10

いくつかの例では、ナノ粒子は、コア、あるいは、コア・シェル・ナノ粒子におけるように、コアとシェルを含む。

## 【0280】

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

20

## 【0281】

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

## 【0282】

30

いくつかの例では、ナノ粒子製剤は、常磁性ナノ粒子、超常磁性ナノ粒子、金属ナノ粒子、フラーレン様材料、無機ナノチューブ、デンドリマー(共有結合した金属キレートを有するものなど)、ナノファイバー、ナノホーン、ナノオニオン、ナノロッド、ナノロープ、または量子ドットを含む。いくつかの例では、本明細書に記載されたポリ核酸分子あるいは結合部分は、ナノ粒子に直接的あるいは間接的に共役する。いくつかの例では、本明細書に記載された少なくとも1、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、あるいは100以上のポリ核酸分子あるいは結合部分は、ナノ粒子に直接的あるいは間接的に共役する。

## 【0283】

40

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

## 【0284】

50

いくつかの実施形態において、医薬製剤は、本明細書に開示される組成物との適合性ならびに所望の投与形態の放出プロフィール特性に基づいて選択された担体または担体材料を含む。模範的な担体物質としては、例えば、結合剤、懸濁剤、崩壊剤、充填剤、界面活性剤、可溶化剤、安定化剤、滑沢剤、加湿剤、希釈剤などが含まれる。薬学的に適合可能な担体材料は、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、マルトデキストリン、グリセリン、ケイ酸マグネシウム、ポリビニ

ルピロリドン( P V P )、コレステロール、コレステロールエステル、カゼイン酸ナトリウム、大豆レシチン、タウロコール酸、ホスファチジルコリン、塩化ナトリウム、リン酸三カルシウム、リン酸二カリウム、セルロースおよびセルロース抱合体、糖ステアロイル乳酸ナトリウム( *sugars sodium stearoyl lactylate* )、カラギーナン、モノグリセリド、ジグリセリド、化デンプンなどを含むが、これらに限定されない。参考( 例えればレミングトン ) : *The Science and Practice of Pharmacy*, Nineteenth Ed ( Easton, Pa . : Mack Publishing Company, 1995 )、Hoover, John E . , *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co . , Easton, Pennsylvania 1975, Liberman, H . A . and Lachman, L . , Eds . , *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Decker, New York, N . Y . , 1980、および、 *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Seventh Ed . ( Lippincott Williams & Wilkins 1999 ) ( Lippincott Williams & Wilkins 1999 )。

#### 【 0285 】

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

#### 【 0286 】

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

#### 【 0287 】

いくつかの例では、医薬製剤は、より多くの安定した環境を提供することから化合物を安定させるために使用される希釈剤をさらに含む。緩衝液中に溶解した塩( pH の制御あるいは維持ももたらす ) は、限定されないが、リン酸緩衝生理食塩水を含む当該技術分野の希釈剤として利用される。特定の例において、希釈剤は、圧縮を促進するか、またはカプセル充填のための均質混合のために十分な大きさ( bulk )を作成するために、組成物の大きさを増大させる。そのような化合物は、例えはラクトース、デンプン、マンニトール、ソルビトール、デキストロース、Avicel ( 登録商標 ) などの微結晶性セルロース；リン酸水素カルシウム、リン酸カルシウム二水和物；リン酸三カルシウム、リン酸カルシウム；無水乳糖、噴霧乾燥したラクトース；化デンプン、Di - Pac ( 登録商標 ) ( Amstar ) などの圧縮可能な糖；マンニトール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース・アセタート・ステアラート、スクロース系の希釈剤、粉砂糖；一塩基の硫酸カルシウム一水和物、硫酸カルシウム二水和物；乳酸カルシウム三水和物、デキストラート( dextrates )；加水分解したシリアル固体物、アミロース；粉末セルロース、炭酸カルシウム；グリシン、カオリン；マンニトール、塩化ナトリウム；イノシトール、ベントナイトなどを含む。

#### 【 0288 】

場合によっては、医薬製剤は、物質の分解または崩壊を促進するための崩壊剤( disintegration agents )または錠剤分解物質( disintegrant )

10

20

30

40

50

t s ) を含む。用語「分解する」は、胃腸液と接触した際の剤形の溶解と分散の両方を含む。崩壊剤の例は、デンプン、例えば天然のデンプン、例えばトウモロコシデンプンまたはジャガイモデンプン、化デンプン、例えばNational 1551またはAmijel (登録商標)、またはナトリウムデンブングリコラート、例えばPromogel (登録商標) またはExplotab (登録商標)、セルロース、例えば木製品、メチル結晶セルロース、例えばAvicel (登録商標)、Avicel (登録商標) PH101、Avicel (登録商標) PH102、Avicel (登録商標) PH105、E1cema (登録商標) P100、EmcoCel (登録商標)、Vivace1 (登録商標)、Min-Tia (登録商標)、およびSolkka-F1°C (登録商標) )、メチルセルロース、クロスカルメロース、または架橋セルロース、例えば架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム (Ac-Di-Sol (登録商標) )、架橋カルボキシメチルセルロース、または架橋クロスカルメロース、の架橋デンプン、例えばナトリウムデンブングリコラート、クロスボビドンなどの架橋ポリマー、架橋ポリビニルピロリドン、アルギン酸塩、例えばアルギン酸またはアルギン酸ナトリウムなどのアルギン酸の塩、Veegum (登録商標) HV (ケイ酸アルミニウムマグネシウム) などの粘土、ゴム (寒天、グアー、ローカストビーン、カラヤ、ペクチン、またはトラガカントなど)、ナトリウムデンブングリコラート、ペントナイト、天然のスポンジ、界面活性剤、陽イオン交換樹脂などの樹脂、柑橘類のパルプ、ラウリル硫酸ナトリウム、デンプンを組み合わせたラウリル硫酸ナトリウムなど、を含む。などが挙げられる。

## 【0289】

いくつかの例では、医薬製剤は、ラクトース、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、第二リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、微結晶性セルロース、セルロース粉末、デキストロース、デキストラート、デキストラン、デンプン、化デンプン、スクロース、キシリトール、ラクチトール、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウム、ポリエチレンリコールなどの充填剤を含む。

## 【0290】

潤滑剤と滑剤も、材料の癒着あるいは摩擦を防ぎ、減少させ、阻害するための本明細書に記載される医薬製剤に随意に含まれる。典型的な潤滑剤は、例えばステアリン酸、水酸化カルシウム、タルク、ナトリウム・ステアリル・フマラート、鉛油などの炭化水素、水素添加大豆油 (Sterotex (登録商標) ) などの硬化植物油、高級脂肪酸、およびアルカリ金属とアルカリ土類金属塩、例えばアルミニウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛、ステアリン酸、ステアリン酸ナトリウム、グリセロール、タルク、ワックス、Seatrowet (登録商標) 、ホウ酸、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ロイシン、ポリエチレンリコール (例えばPEG-4000) またはメトキシポリエチレン・グリコール、例えばCarbowax (商標) 、オレイン酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、ベヘン酸グリセリル、ポリエチレンリコール、ラウリル硫酸マグネシウムまたはラウリル硫酸ナトリウム、Soyloid (商標) などのコロイダルシリカ、Cabil-O-Sil (登録商標) 、トウモロコシデンプンなどのデンプン、シリコーン油、界面活性剤などを含む。

## 【0291】

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

## 【0292】

可溶化剤は、トリアセチン、クエン酸トリエチル、オレイン酸エチル、カプリル酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、ドクサートナトリウム、ビタミンE TPGS、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、N-ヒドロキシエチルピロリドン、ポリビニルピ

10

20

30

40

50

ロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルシクロデキストリン、エタノール、n-ブタノール、イソプロピルアルコール、コレステロール、胆汁塩、ポリエチレングリコール200-600、グリコフロール、トランスクトール、プロピレングリコール、およびジメチルイソソルビドなどの化合物を含む。

【0293】

安定剤は、任意の抗酸化剤、緩衝液、酸、防腐剤などの化合物を含む。

【0294】

懸濁化剤は、ポリビニルピロリドン、例えば、ポリビニルピロリドンK12、ポリビニルピロリドンK17、ポリビニルピロリドンK25、あるいは、ポリビニルピロリドンK30、ビニルピロリドン/酢酸ビニルコポリマー(S630)、ポリエチレングリコール(例えば、ポリエチレングリコールは、約300から約600まで、約3350から約4000まで、または約7000から約5400までの分子量を有し)、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロースステアリン酸アセテート、ポリソルベート80、ヒドロキシエチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、例えば、トラガカントゴム、アラビアゴム、グアーゴム、キサンタンゴムを含むキサンタンなどの、ゴム、糖、セルロース系、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリソルベート80、アルギン酸ナトリウム、ポリエトキシル化ソルビタンモノラウレート、ポリエトキシル化ソルビタンモノラウレート、ポビドンなどの、化合物を含む。

10

【0295】

界面活性剤は、ラウリル硫酸ナトリウム、ナトリウムドクセート、Tween60または80、トリアセチン、ビタミンE TPGS、ソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレン・ソルビタンモノオレート、ポリソルベート、ポロクサマー(polaxomer)、胆汁塩、グリセリルモノステアレート、エチレンオキシドおよびプロピレンオキシドのコポリマー、例えば、Pluronics(登録商標)(BASF)などの化合物を含む。付加的な界面活性剤は、ポリオキシエチレン脂肪酸グリセリドおよび植物油(例えばポリオキシエチレン(60)水素化ヒマシ油)；および、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとアルキルフェニルエーテル、例えば、オクトキシノール10、オクトキシノール40などが挙げられる。しばしば、界面活性剤は、物理的安定性を高めるために、または他の目的のために含まれる。

20

【0296】

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

30

【0297】

湿潤剤は、オレイン酸、モノステアリン酸グリセリル、モノオレイン酸ソルビタン、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ドクサートナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ドキュセートナトリウム、トリアセチン、Tween80、ビタミンE TPGS、アンモニウム塩などの化合物を含む。

40

【0298】

治療レジメン

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される医薬組成物は治療用途のために投与される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は1日当たり一度、1日当たり2度、1日当たり3度、またはそれ以上投与される。医薬組成物は、毎日、1日おき、週5日、週1日、1週おき、1か月当たり2週、1か月当たり3週、月1回、月2回、1か月当たり3回、またはそれ以上投与される。医薬組成物は、少なくとも1か月、2か月、3か

50

月、4か月、5か月、6か月、7か月、8か月、9か月、10か月、11か月、12か月、18か月、2年、3年、またはそれ以上の間投与される。

【0299】

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

【0300】

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

【0301】

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

【0302】

いったん患者の状態が改善すると、必要に応じて維持量が投与される。その後、投与量または投与頻度、あるいはその両方は、症状に応じて、改善された疾患、障害、または疾病が保持されるレベルにまで減少可能である。

【0303】

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

【0304】

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

【0305】

いくつかの実施形態において、こうした治療レジメンの毒性と治療の有効性は、限定されないが、LD<sub>50</sub>（母集団の50%までの致死投与量）と、ED<sub>50</sub>（母集団の50%に治療上有効な投与量）の決定を含む、細胞培養または実験動物における標準的な製薬手順によって決定される。毒性と治療効果との間の用量比が治療指数であり、これはLD<sub>5</sub>

10

20

30

40

50

0とED50との間の比率として表される。高い治療指数を示す化合物が好ましい。細胞培養アッセイと動物研究から得られたデータは、ヒトで使用される一連の投与量を製剤するのに使用される。こうした化合物の投与量は好ましくは、最小限の毒性を備えるED50を含む一連の循環濃度内に位置する。投与量は、使用された剤形と利用される投与経路に応じてこの範囲内で変わる。

#### 【0306】

##### キット / 製品

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

10

#### 【0307】

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

20

#### 【0308】

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

#### 【0309】

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

#### 【0310】

1つの実施形態では、ラベルが容器上にあるか容器に付随する。1つの実施形態において、ラベルを形成する文字、数字または他の表示が、容器自体に貼り付けられるか、成形されるかまたは刻まれている場合は、ラベルは容器上に取付けられる。ラベルは、例えば添付文書として容器を保持するレセプタクルまたは運搬装置内に存在するとき、容器に付随する。の実施形態において、ラベルは、内容物が特定の治療用途に用いられるべきものであるということを示すために用いられる。ラベルは、例えば、本明細書に記載の方法で、内容物を用いる使用するための指示を示すように使用されてもよい。

30

#### 【0311】

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

40

#### 【0312】

##### 特定の用語

別段の定めのない限り、本明細書で使用される技術用語と科学用語はすべて、主題が属する当該技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。前述の一般的な記載と以下の詳細な記載は典型的で説明的なものに過ぎず、任意の主題に限定される

50

ものではないことが理解されよう。本出願では、単数の使用は、特別に別記しない限り、複数を含む。明細書および添付の請求項内で用いられる通り、単数形「a」、「an」、および「the」は、その文脈が明確に他のことを定めていない限り、複数の指示対象を含む。本出願において、「または」の使用は特に明記しない限り、「および/または」を意味する。さらに、用語「含んでいる(including)」の使用は、「含む(include)」、「含む(includes)」、および「含まれる(included)」といった他の形態と同じく、限定的なものではない。

#### 【0313】

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

10

#### 【0314】

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

#### 【0315】

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

20

#### 【0316】

本明細書で使用されるように、用語「DMD」、「DMD遺伝子」、およびその同等物は、タンパク質ジストロフィンをコードするDMD遺伝子を指す。加えて、「DMD」、「DMD遺伝子」という用語は交換可能に使用され、両方の用語はジストロフィン遺伝子を指す。

#### 【実施例】

#### 【0317】

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

30

#### 【0318】

実施例1. アンチセンスオリゴヌクレオチド配列および合成

#### 【0319】

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

#### 【0320】

PMO配列は5' G G C C A A A C C T C G G C T T A C C T G A A A T 3' 一級アミン（SEQ ID NO: 28）であり、末端ヌクレオチドの拡張した状態で図1で見られる。PMOは共役する分子の3'末端にG<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>抱合体ハンドルを含む。PMOは、標準的な固相合成プロトコルを使用して固相上で完全に組み立てられ、HPLCで精製された。

40

#### 【0321】

PS A SO配列はアミン-C<sub>6</sub>-G G C C A A A C C U C G G C U U A C C U (SEQ ID NO: 29)であり、末端ヌクレオチドの拡張した状態で図2A-2Bで見られる。PS A SOの構造は、100%のホスホロチオエート結合だったリン酸塩骨格を含んでおり、リボース糖類はすべて2'、2' OMe修飾を含んでいた。PS A SOは、共役する分子の5'末端にC<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>抱合体ハンドルを含んでいた。PMOは、標準的な固相ホスホラミダイト化学を使用して固相上で完全に組み立てられ、HPLCで精製された。

#### 【0322】

ASOは、標準的な固相ホスホラミダイト化学を使用して固相上で完全に組み立てられ

50

、HPLCで精製された。ASOは、共役する分子の5'末端にC6-NH2抱合体ハンドルを含んでいた。

【0323】

実施例2：DMDエクソンスキッピングの検出

【0324】

分化したC1C12細胞におけるDMDエクソン23スキッピングを判定するための方法

【0325】

マウス筋芽細胞C2C12細胞は、0.5mLの10%FBS RPMI 1640培地中の24ウェルプレート中で50,000-100,000/ウェルで蒔かれ、5%のCO<sub>2</sub>を用いて37°Cで夜通しインキュベートされた。2日目に、細胞を分化培地(2%のウマ血清RPMI 1640と1μMインスリン)に移し、3-5日間インキュベートした。インキュベーション後、サンプルを加え、24時間インキュベートした。サンプル処置の後、1mLの新鮮な培地(化合物を含まない)を2日間毎日変えた。処置開始後72時間目に、細胞を採取した。InviTrap RNA細胞HTS 96キット(B-Bridge International #7061300400)を用いてRNAを単離して、High Capacity cDNA逆転写キット(Thermo Fisher #4368813)を使用して逆転写した。DreamTaq™ PCRマスターMix(Thermo Fisher #K1072)を使用してPCR反応を実施した。表2のプロトコルを使用して、スキッピングされたおよびスキッピングされていない分子を増幅するために、一次PCRは、エクソン20(Ex20F 5'-CAGAATTCT GCCAATTGCTGAG)(SEQ ID NO:30)およびエクソン26(Ex26R 5'-TTCTTCAGCTTGTCATCC)(SEQ ID NO:31)においてプライマーを使用した。

【0326】

【表2】

表2. PCRプロトコル

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

【0327】

ネステッドPCRについては、一次PCR反応を水で100Xに希釈し、ネストPCR反応に5μlが使用された(50μl総反応量)。表3のプロトコルを使用して、スキッピングされたおよびスキッピングされていない分子を増幅するために、ネステッドPCRは、エクソン20(Ex20F2: 5'-ACCCAGTCTACCCACCTATC)(SEQ ID NO:32)およびエクソン25(Ex25R: 5'-CTCTTTATCTTCTGCCAACCTT)(SEQ ID NO:33)中のプライマーを使用した。

【0328】

10

20

30

40

50

## 【表 3】

表 3. ネステッド PCR プロトコル

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

10

## 【0329】

PCR 反応は、4 % の TAE アガロースゲルを使用して分析された。野生型の (WT) DMD 生成物は、予想されたサイズの 788 の塩基対と 575 の塩基対のスキッピングされた DMD 23 を有していた。

## 【0330】

動物

20

## 【0331】

動物研究は、「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」と同様に USDA Animal Welfare Act で概説された規則を厳守する、Explora Biolabs の International Animal Care and Use Committee (IACUC) に基づくプロトコルに従って行われた。マウスはすべて Charles River Laboratories または Harlan Laboratories のいずれかから入手した。

## 【0332】

インビボのマウスモデル

30

## 【0333】

WT CD-1 マウス (4 - 6 週齢) に、指示されたアンチセンス抱合体 (ASC) および投与量で静脈内 (i.v.) 注射によって投薬した。「ネイキッド」PMO あるいは ASO を、指示された投与量で筋肉内注射によって投薬した。4、7、あるいは 14 日後、心臓と腓腹筋の組織を採取して液体窒素で急速凍結した。RNA を Trizol and RNeasy Plus 96 Kit (Qiagen, #74192) で単離し、High Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Thermo Fisher #4368813) を用いて逆転写した。ネステッド PCR 反応を記載されるように実施した。PCR 反応を、デンシトメトリーによって定量化された 4 % (あるいは 1 %) の TAE アガロースゲル中で分析した。

40

## 【0334】

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

## 【0335】

スキッピングされた DMD mRNA のコピー数を定量的に決定するために、qPCR プライマー / プローブセットは、スキッピングされたおよび WT DMD mRNA (図 3) を定量化するために設計された。qPCR 定量化標準が設計され、表 4 で見られるような設計された PCR プライマーを使用して、PCR で生成された。WT と DMD のための qPCR 標準については、PCR の後で、733 の塩基対フラグメントをアガロースゲルから単離した。スキッピングされた DMA の qPCR 標準については、ネステッドプライ

50

マーは使用された。

【0336】

qPCR プライマー / プローブの増幅効率は、予想される効率の 10 % 以内にあると判定された。qPCR 反応は、メーカーの説明書に従って、Quant Studio 7 および Taqman (商標) PCR Universal Mastermix II (Thermo Fisher #4440041) で実施された。

【0337】

【表4】

表4.

	SEQ ID NO	プライマー / プローブ	配列
Ex23 スキッピングに関する DMD Δ-23,	34	フォワードプライマー	5' GCGCTATCAGGAGACAATGAG
	35	リバースプライマー	5' GTTTTATGTGATTCTGTAATTCCC
	36	プローブ	5' CTCTCTGTACCTTATCTTAGTGT
WT DMD のみについて DMD Ex22-23	37	フォワードプライマー	5' TGGAGGAGAGACTCGGGAAA
	38	リバースプライマー	5' TTGAAGCCATTTGTTGCTCTT
	39	プローブ	5' ACAGGCTCTGCAAAGT
すべての DMD について DMD Ex20-21	40	フォワードプライマー	5' AACAGATGACAACACTGCCGAAA
	41	リバースプライマー	5' TTGGCTCTGATAGGGTGGTAGAC
	42	プローブ	5' CTTGTTGAAAACCC
WT 及びすべての DMD について qPCR 標準	43	フォワードプライマー	5' TGAGGGTGTAAATGCTGAAAGTA
	44	リバースプライマー	5' CACCAACTGGGAGGAAAGTT

【0338】

実施例 3 : 抱合体合成

【0339】

分析および精製方法

【0340】

分析および精製方法は表 5 - 11 に従って行われた。

【0341】

10

20

30

40

50

## 【表 5】

表 5. サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 方法

サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 方法	カラム	移動相	流量
方法 1	TOSOH Biosciences, TSKgelG3000SW XL, 7.8 X 300 mm, 5 $\mu$ M	150 mM リン酸緩衝液	20 分間 1.0 mL/分
方法 2	TOSOH Biosciences, TSKgelG3000SW, 21.5 X 600 mm, 5 $\mu$ M	PBS pH 7.4	180 分間 1.0 mL/分

10

## 【0 3 4 2】

## 【表 6】

表 6. 疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 方法 1

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

20

## 【0 3 4 3】

## 【表 7】

表 7. 疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 方法 2

30

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

40

## 【0 3 4 4】

50

【表 8】

表 8. 疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 方法 3

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

10

【0345】

【表 9】

表 9. 疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 方法 4

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

20

【0346】

【表 10】

表 10. 強力な陰イオン交換クロマトグラフィー (SAX) 方法 1

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

30

【0347】

【表 11】

表 11. 強力な陰イオン交換クロマトグラフィー (SAX) 方法 2

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

40

50

## 【0348】

抗トランスフェリン受容体抗体

## 【0349】

使用された抗マウストランスフェリン受容体抗体すなわち抗 C D 7 1 m A b は、マウス C D 7 1 すなわちマウストランスフェリン受容体 1 ( m T f R 1 ) に結合するラット Ig G 2 a サブクラスモノクローナル抗体であった。抗体は B i o X c e 1 1 によって產生され、市販で入手可能である ( カタログ # B E 0 1 7 5 )。

## 【0350】

抗 C D 7 1 抗体モルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチド抱合体 ( 抗 C D 7 1 m A b - P M O )

10

## 【0351】

抗 C D 7 1 m A b - P M O 抱合体

## 【0352】

ホウ酸塩緩衝液 ( 2 5 mM の四ホウ酸ナトリウム、 2 5 mM の N a C l 、 1 mM のジエチレントリアミンペンタ酢酸、 pH 8 . 0 ) 中の抗 C D 7 1 抗体 ( 1 0 m g / m L ) は、 水中に 4 当量のトリス ( 2 - カルボキシエチル ) ホスフィン ( T C E P ) を加え、 および 4 時間 3 7 ° C でインキュベートすることによって、 還元された。 1 時間 D M S O 中の 1 0 当量の S M C C ( 1 0 m g / m L ) を用いて D M S O 中の P M O ( 5 0 m g / m L ) をインキュベートすることにより、 4 ( N - マレイミドメチル ) シクロヘキサンカルボン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル ( S M C C ) を、 ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー ( P M O ) の 3 ' 末端で一級アミンに結合させた。 非共役 S M C C は、 3 k D a の M W C O を有する A m i c o n U l t r a - 1 5 遠心濾過機ユニットを使用して、 限外濾過により除去された。 P M O - S M C C は、 緩衝酢酸溶液 ( 1 0 mM の酢酸ナトリウム、 pH 6 . 0 ) を用いて 3 回洗浄され、 すぐに使用された。 還元された抗体を、 2 . 2 5 当量の P M O - S M C C と混合し、 4 ° C で夜通しインキュベートした。 その後、 反応混合物の pH を 7 . 5 まで減らし、 8 当量の N - エチルマレイミドを 3 0 分間室温で混合物に加えて、 未反応のシステインをクエンチした。 疎水性相互作用クロマトグラフィー ( H I C ) 方法 2 による反応混合物の分析は、 未反応の抗体および P M O と共に抗体 - P M O 抱合体を示した ( 図 4 )。 図 4 は、 H I C 方法 2 で產生された抗 C D 7 1 m A b - P M O 反応混合物のクロマトグラムを示しており、 遊離抗体ピーク ( 1 ) 、 遊離 P M O ( 2 ) 、 D A R 1 ( 3 ) 、 D A R 2 ( 4 ) 、 D A R 3 ( 5 ) 、 D A R > 3 ( 6 ) を示している。 「 D A R 」 は薬物対抗体の比率を指す。 括弧中の数はクロマトグラム中のピークを指す。

20

## 【0353】

精製

## 【0354】

反応混合物は H I C 方法 1 を使用して、 A K T A E x p l o r e r F P L C で精製された。 1 ( D A R 1 ) と 2 ( D A R 2 ) の薬物対抗体の比率の抱合体を含む画分が組み合わされ、 2 よりも大きい D A R を有する抱合体とは別に、 5 0 k D a の M W C O を用いる A m i c o n U l t r a 1 5 遠心濾過機ユニットで濃縮された。 濃縮抱合体を、 分析のために A m i c o n U l t r a 1 5 遠心濾過機ユニットを使用して、 P B S ( pH 7 . 4 ) と緩衝液交換した。

30

## 【0355】

精製された抱合体の分析

## 【0356】

単離させた抱合体を、 立体排除クロマトグラフィー ( S E C ) および H I C で特徴づけた。 ポリマー量の凝集塊と未共役 P M O ( 図 5 A - 5 C ) が存在しないことを確認するために、 S E C 方法 1 を用いた。 図 5 A は、 S E C 方法 1 を使用して產生された抗 C D 7 1 m A b のクロマトグラムを示す。 図 5 B は、 S E C 方法 1 を使用して產生された抗 C D 7 1 m A b - P M O D A R 1 および 2 のクロマトグラムを示す。 図 5 C は、 S E C 方法

40

50

1を使用して產生された2以上の抗CD71 mAb-PMO DARのクロマトグラムを示す。「DAR」は薬物対抗体の比率を指す。

【0357】

抱合体の純度はHIC方法2を使用して分析的HPLCによって評価された(図6A-6C)。図6Aは、HIC方法2を使用して產生された抗CD71 mAbのクロマトグラムを示す。図6Bは、HIC方法2を使用して產生された抗CD71 mAb-PMO DAR 1および2抱合体のクロマトグラムを示す。図6Cは、HIC方法2を使用して產生された抗CD71 mAb-PMO DAR > 2抱合体のクロマトグラムを示す。各サンプルの260/280nm UV吸光度比率は、DARを確認するためにPMOと抗体の既知の比率の標準曲線と比較された。DAR 1と2のサンプルは~1.6の平均DARを有していたが、その一方で2を超えるサンプルのDARは~3.7の平均DARを有していた。「DAR」は薬物対抗体の比率を指す。

10

【0358】

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

【0359】

ペプシンによる抗体消化

【0360】

20 mMの緩衝酢酸溶液(pH 4.0)中の抗CD71抗体(5 mg/mL)は、37°Cで3時間、固定されたペプシンを用いてインキュベートされた。樹脂を取り除き、反応混合物は、30 kDaのMWCOのAmicon Ultra 15遠心濾過機ユニットを使用して、PBS(pH 7.4)で洗浄された。残余分を集めて、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)方法2を使用して精製し、Fab' 2フラグメントを単離した。

20

【0361】

抗CD71 (Fab) - PMO 抱合体

【0362】

ホウ酸塩緩衝液(pH 8.0)中のFab' 2フラグメント(15 mg/mL)は、水中に10当量のTCEPを加え、2時間37°Cでインキュベートすることにより還元された。SMCCは、1時間DMSO中の10当量のSMCC(10 mg/mL)を用いてDMSO中のPMO(50 mg/mL)をインキュベートすることにより、PMOの3'末端の一級アミンに加えた。非共役SMCCは、3 kDaのMWCOを有するAmicon Ultra-15遠心濾過機ユニットを使用して、限外濾過により除去された。PMO-SMCCを、緩衝酢酸溶液(pH 6.0)で3回洗浄してすぐに使用した。還元されたFab' 2フラグメント(Fab)を、10 kDaのMWCOのAmicon Ultra 15遠心濾過機ユニットを使用して、ホウ酸塩緩衝液(pH 8.0)へ緩衝液交換し、1.75当量のPMO-SMCCを加え、4°Cで夜通しインキュベートした。その後、反応混合物のpHを7.5まで減らし、6当量のN-エチルマレイミドを30分間室温で混合物に加えて、未反応のシステインをクエンチした。疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)方法3による反応混合物の分析は、未反応のFabとともに抗CD71 (Fab) - PMO 抱合体を示した(図14a)。図7Aは、HIC方法3を使用して抗CD71 Fab - PMOのFPLC精製のクロマトグラムを示す。

30

【0363】

精製

【0364】

反応混合物はHIC方法3を使用して、AKTA Explorer FPLCで精製された。1、2、および3のDARの抱合体を含む画分を組み合わせ、別々に濃縮した。濃縮抱合体を、分析の前に10 kDaのMWCOのAmicon Ultra 15遠心濾過機ユニットを使用して、PBS(pH 7.4)と緩衝液交換した。

40

【0365】

精製された抱合体の分析

50

## 【0366】

単離させた抱合体を SEC と HIC で特徴づけた。SEC 方法 1 は、ポリマー量凝集塊と未共役 PMO が存在しないことを確認するために使用された。図 7B - 図 7E を参照する。図 7B は、SEC 方法 1 を使用して產生された抗 CD71 Fab のクロマトグラムを示す。図 7C は、SEC 方法 1 を使用して產生された抗 CD71 Fab - PMO DAR1 抱合体のクロマトグラムを示す。図 7D は、SEC 方法 1 を使用して產生された抗 CD71 Fab - PMO DAR2 抱合体のクロマトグラムを示す。図 7E は、SEC 方法 1 を使用して產生された抗 CD71 Fab - PMO DAR3 抱合体のクロマトグラムを示す。抱合体の純度を、HIC 方法 4 を使用して分析的 HPLC によって評価した。図 7F - 図 7I を参照。図 7F は、HIC 方法 4 を使用して產生された抗 CD71 Fab のクロマトグラムを示す。図 7G は、HIC 方法 4 を使用して產生された抗 CD71 Fab - PMO DAR1 抱合体のクロマトグラムを示す。図 7H は、HIC 方法 4 を使用して產生された抗 CD71 Fab - PMO DAR2 抱合体のクロマトグラムを示す。図 7I は、HIC 方法 4 を使用して產生された抗 CD71 Fab - PMO DAR3 抱合体のクロマトグラムを示す。「DAR」は薬物対抗体の比率を指す。各サンプルの 260 / 280 nm UV 吸光度比率は、DAR を確認するために PMO と Fab の既知の比率の標準曲線と比較された。

10

## 【0367】

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

20

## 【0368】

抗 CD71 mAb - PS ASO

## 【0369】

ホウ酸塩緩衝液 (pH 8.0) 中の抗 CD71 (10 mg / mL) は、水中に 4 当量の TCEP を加え、4 時間 37 °C でインキュベートすることにより還元された。1 時間 DMSO 中に 10 当量の SMCC (10 mg / mL) を有する 250 mM の PB (pH 7.5) および DMSO の 1 : 1 混合物において PS ASO (50 mg / mL) をインキュベートすることにより、4 (N-マレイミドメチル) シクロヘキサンカルボン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (SMCC) を、PS - ASO の 5' 末端の一級アミンに添加した。非共役 SMCC は、3 kDa の MWCO を有する Amicon Ultra-1 5 遠心濾過機ユニットを使用して、限外濾過により除去された。PS ASO - SMCC を、緩衝酢酸溶液 (pH 6.0) で 3 回洗浄してすぐに使用した。還元された抗体を、1.7 当量の PS ASO - SMCC と混合し、4 °C で夜通しインキュベートした。その後、反応混合物の pH を 7.4 まで減らし、8 当量の N-エチルマレイミドを 30 分間室温で混合物に加えて、未反応のシステインをクエンチした。強力な陰イオン交換クロマトグラフィー (SAX) 方法 2 による反応混合物の分析は、未反応の抗体および ASO と共に抗体 - PS ASO 抱合体を示した (図 8A)。図 8A は、SAX 方法 2 で產生された抗 CD71 mAb - PS ASO 反応混合物のクロマトグラムを示しており、遊離抗体ピーク (1)、遊離 PS ASO (5)、DAR 1 (2)、DAR 2 (3)、DAR > 2 (4) を示している。「DAR」は薬物対抗体の比率を指す。括弧中の数はピークを指す。

30

## 【0370】

精製

## 【0371】

反応混合物は、SAX 方法 1 を使用して、AKTA Explorer FPLC で精製された。1、2、および 3 の薬物対抗体比率 (DAR) の抱合体を含む画分を組み合わせ、別々に濃縮し、分析の前に 50 kDa の MWCO の Amicon Ultra 15 遠心濾過機ユニットを使用して、PBS (pH 7.4) で緩衝液交換した。

40

## 【0372】

精製された抱合体の分析

## 【0373】

50

単離させた抱合体を、立体排除クロマトグラフィー(SEC)およびSAXで特徴づけた。サイズ排除クロマトグラフィー方法1は、ポリマー量凝集塊と未共役ASOが存在しないことを確認するために使用された。図8B-図8Eを参照する。図8Bは、SEC方法1を使用して產生された抗CD71 mAbのクロマトグラムを示す。図8Cは、SEC方法1を使用して產生された抗CD71 mAb-PS ASO DAR1抱合体のクロマトグラムを示す。図8Dは、SEC方法1を使用して產生された抗CD71 mAb-PS ASO DAR2抱合体のクロマトグラムを示す。図8Eは、SEC方法1を使用して產生された抗CD71 mAb-PS ASO DAR3抱合体のクロマトグラムを示す。抱合体の純度を、SAX方法2を使用して分析的HPLCによって評価した。図8F-図8Hを参照する。図8Fは、SAX方法2を使用して產生された抗CD71 mAb-PS ASO DAR1抱合体のクロマトグラムを示す。図8Gは、SAX方法2を使用して產生された抗CD71 mAb-PS ASO DAR2抱合体のクロマトグラムを示す。図8Hは、SAX方法2を使用して產生された抗CD71 mAb-PS ASO DAR3抱合体のクロマトグラムを示す。各サンプルの260/280nm UV吸光度比率は、薬物対抗体比率(DAR)を確認するためにASOと抗体の既知の比率の標準曲線と比較された。

#### 【0374】

実施例4：抗CD71 mAb-PMO抱合体のインビトロ活性

#### 【0375】

実施例3に記載されるように、抗CD71 mAb-PMO抱合体は作られ、特徴づけられた。抱合体は、実施例2に類似する方法を使用するネステッドPCRを利用して、分化したC2C12細胞においてインビトロのエクソンスキッピングを媒介する能力について評価された。簡潔に言えば、「ネイキッド」モルホリノASO(「PMO」)の効能は、関連するビヒクル対照を有する複数の濃度の抗CD71 mAb-PMO抱合体と比較された。対照はビヒクル(「Veh」)、50uMのスクランブル・モルホリノ(「Scr50」)を含んでおり、抗体(「Neg-Ab」)は含んでいなかった。使用されたPMOの濃度は、50uM、1uM、および0.02uMを含んでいた。使用された抗CD71 mAb-PMO DAR1および2の濃度は、200nM、20nM、および2nMを含んでいた。「DAR」は薬物対抗体の比率を指す。

#### 【0376】

cDNA合成の後で、2回のPCR增幅(一次PCRおよびネステッドPCR)がエクソンスキッピングを検知するために使用された。PCR反応は4%のTAEアガロースゲル中で分析された(図9)。

#### 【0377】

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

#### 【0378】

別の実験は抗CD71Fab-PMO抱合体と、および陰性対照として抗EGFR(「Z-PMO」)で標的化されたPMOを含んでいた(図10)。使用されたPMOの濃度は、10uMと2uMを含んでいた。使用された抗CD71 mAb-PMOの濃度は0.2uMと0.04uMを含んでいた。抗CD71 mAb-PMOは2のDARを有していた。Z-PMOは0.2uMの濃度で使用され、2のDARを有していた。抗CD71Fab-PMOの濃度は0.6uMと0.12uMを含んでいた。0.6uMおよび0.12uMの抗CD71 mAb-PMOのための1、2、および、3のDARが分析された。

#### 【0379】

図10を参照すると、トランスフェリン受容体、抗CD71 mAb-PMO、および抗CD71 Fab-PMO抱合体を利用する受容体を媒介とする取り込みは、C2C12細胞で、かつ、「ネイキッド」PMO対照よりも低い濃度で測定可能なエクソン23ス

10

20

30

40

50

キッピングをもたらした。抗 C D 7 1 抱合体からのスキッピングをもたらした試験された濃度で Z - P M O から測定可能なエクソン 2 3 スキッピングはなかった。

【 0 3 8 0 】

実施例 5 : 抗 - C D 7 1 - A S O m A b P S 抱合体のインビトロ活性

【 0 3 8 1 】

実施例 3 に記載されるように、抗 C D 7 1 m A b - P S A S O 抱合体は作られ特徴づけられた。抱合体は、実施例 2 に記載されるような類似する方法を使用するネステッド P C R を利用して、分化した C 2 C 1 2 細胞においてインビトロのエクソンスキッピングを媒介する能力について評価された。簡潔に言えば、「ネイキッド」ホスホロチオエート A S O ( P S A S O ) の効能は、関連するビヒクル対照を有する複数の濃度の抗 C D 7 1 m A b - P S A S O 抱合体と比較された。2 回の P C R 増幅 ( 一次 P C R とネステッド P C R ) は、エクソンスキッピングを検知するために c D N A 合成の後で実施された。 P C R 反応は 4 % の T A E アガロースゲル中で分析された ( 図 1 1 )。図 1 1 は、 P M O 、 A S O 、 D A R 1 の共役した抗 C D 7 1 m A b - A S O ( 「 A S C - D A R 1 」 ) 、 D A R 2 の共役した抗 C D 7 1 m A b - A S O ( 「 A S C - D A R 2 」 ) 、および、 D A R 3 の共役した抗 C D 7 1 m A b - A S O ( 「 A S C - D A R 3 」 ) のアガロースゲルを示す。「 P M O 」および「 A S O 」は ( 抗体に共役していない ) 遊離 P M O および A S O を指す。「 V e h 」はビヒクルのみを指す。試験された濃度は 0 . 2 、 1 、および 5 マイクロモル (  $\mu$  M ) を含んでいた。

10

【 0 3 8 2 】

図 1 1 を参照すると、抗 C D 7 1 m A b - P S A S O 抱合体は、分化した C 2 C 1 2 細胞で、および「ネイキッド」 P S A S O 対照よりも低い濃度で、測定可能なエクソン 2 3 スキッピングをもたらした。野生型の生成物は、予想されたサイズの 7 8 8 の塩基対と 5 7 5 の塩基対のスキッピングされた D M D 2 3 を有していた。

20

【 0 3 8 3 】

実施例 6 : 抗 C D 7 1 m A b - P M O 抱合体のインビボ活性

【 0 3 8 4 】

実施例 3 に記載されるように、抗 C D 7 1 m A b - P M O 抱合体は作られ、特徴づけられた。抱合体抗 C D 7 1 m A b - P M O D A R 1 、 2 抗 C D 7 1 と m A b - P M O D A R > 2 は、実施例 2 に記載されるような類似する方法を用いて、野生型の C D - 1 マウスにおいてインビボのエクソンスキッピングを媒介するその能力について評価された。「 D A R 」は薬物対抗体の比率を指す。

30

【 0 3 8 5 】

表 1 2 で提供されるような投与量で静脈内 ( i v ) 注射によって、 m A b 、ビヒクル対照、およびアンチセンス抱合体 ( A S C ) をマウスに投与した。「 D A R 」は薬物対抗体の比率を指す。「ネイキッド」 P M O は、表 1 2 に提供される投与量で腓腹筋へ筋肉内注射によって投与された。4 、 7 、あるいは 1 4 日後、心臓と腓腹筋の組織を採取して液体窒素で急速凍結した。 R N A を単離し、逆転写し、ネステッド P C R 反応を行った。 P C R 反応を 4 % の T A E アガロースゲル中で分析し、デンシトメトリーによって定量化した。

【 0 3 8 6 】

40

## 【表 12】

表 12. インビボ研究設計

グループ	試験物品	N	mAb 投与量 (mg/kg)	PMO 投与量 (mg/kg)	PMO:mAb 比率 (mol/mol)	収集時間 (h)
1	抗 CD71 mAb-PMO, DAR1,2	3	50	4.8	1.6	96
2	抗 CD71 mAb-PMO, DAR1,2	3	50	4.8	1.6	168
3	抗 CD71 mAb-PMO, DAR1,2	3	50	4.8	1.6	336
4	抗 CD71 mAb-PMO, DAR>2	3	50	10.5	3.7	96
5	抗 CD71 mAb-PMO, DAR>2	3	50	10.5	3.7	168
6	抗 CD71 mAb-PMO, DAR>2	3	50	10.5	3.7	336
7	抗 CD71 mAb	3	50			96
8	抗 CD71 mAb	3	50			168
9	抗 CD71 mAb	3	50			336
10	PMO	3	40 ug/inj.			96
11	PMO	3	40 ug/inj.			168
12	PMO	3	40 ug/inj.			336
13	ビヒクル	3				96
14	ビヒクル	3				168
15	ビヒクル	3				336

10

20

## 【0387】

図 12 A は、4、7、あるいは 14 日間、抗 CD71 mAb-PMO DAR 1、2、抗 CD71 mAb-PMO DAR > 2、抗 CD71 mAb、PMO、およびビヒクルビヒクルを投与されたマウスの腓腹筋サンプルのゲル電気泳動を示す。野生型の生成物は、予想されたサイズの 788 の塩基対と 575 の塩基対のスキッピングされた DMD 23 を有していた。抗 CD71 mAb-PMO DAR 1、2、および抗 CD71 mAb-PMO DAR > は、腓腹筋において、かつ、「ネイキッド」PMO 対照よりも低い濃度で、測定可能なエクソン 23 スキッピングをもたらした。ゲル（図 12 A）上のバンドの強度は、図 12 B で見られるようなデンシトメトリーによって定量化された。図 12 C は、Taqman qPCR を使用して、野生型のマウス腓腹筋におけるインビボのエクソンスキッピングの定量化を示す。

30

## 【0388】

図 13 A は、4、7、あるいは 14 日間、抗 CD71 mAb-PMO DAR 1、2、抗 CD71 mAb-PMO DAR > 2、抗 CD71 mAb、PMO、およびビヒクルビヒクルを投与されたマウスの心臓サンプルのゲル電気泳動を示す。野生型の生成物は、予想されたサイズの 788 の塩基対と 575 の塩基対のスキッピングされた DMD 23 を有していた。ゲル（図 13 A）上のバンドの強度は、図 13 B で見られるようなデンシトメトリーによって定量化された。腓腹筋サンプルを用いても同様の結果が得られた。抗 CD71 mAb-PMO DAR 1、2、および抗 CD71 mAb-PMO DAR > は、腓腹筋において、かつ、「ネイキッド」PMO 対照よりも低い濃度で、測定可能なエクソン 23 スキッピングをもたらした。

40

## 【0389】

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

## 【0390】

実施例 7. アンチセンスオリゴヌクレオチド配列および合成

## 【0391】

表 13 の配列は様々な遺伝子中の様々なエクソンを標的として作られた。

50

【0392】

【表13】

表13.配列

SEQ ID NO.	標的	PMO配列(5' to 3')
45	マウスジストロフィン中のエクソン23	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT
46	マウスマイオスタチン(MSTN)中のエクソン2	AGCCCATCTTCTCCTGGCCTGGGAAGG
47	マウスフェニルアラニンヒドロキシラーゼ(PAH)中のエクソン11	ATCCTCTTGGTAACCTCACCTCAC
48	KRAS-011(ヒトの癌)	TCGTCCACAAAATGATTCTGAATTA
49	スクランブル	CGGTGTGTATCATTCTAGTGT

10

【0393】

実施例8.複数の組織中のCD71-mAb-PMO抱合体のインビボ活性

【0394】

実施例3に記載されるように、CD71-mAb-PMO抱合体は作られ、特徴づけられた。抱合体(DAR3+)は、野生型CD-1マウスにおいてインビボのエクソンスキッピングを媒介するその能力について評価された。実験の完全な詳細については実施例2を参照すること。簡潔に言えば、マウスに、静脈内(i.v.)注射によってビヒクル対照を指示された投与量で指示されたASC投与した。図7Aを参照すること。7、14、あるいは28日後、横隔膜、心臓、および肺腹筋の組織を採取して液体窒素で急速凍結した。RNAを単離し、逆転写し、適切なプライマー/プローブセットを使用して、実施例2に記載されるように、リアルタイムqPCRおよびネステッドPCR反応を行った。PCR反応は、1%のTAEアガロースゲル中で分析された。

20

【0395】

野生型マウス中のエクソン23スキッピングを媒介するCD71-mAb-PMO抱合体の能力を評価するためのインビボの試験デザインが表14で示されている。

30

【0396】

【表14】

表14.インビボ研究設計

グループ	試験物品	N	mAb-PMO mAb投与量 (mg/kg)	PMO投与量 (mg/kg)	PMO:mAb 比率 (mol/mol)	収集時間 (週)
1	ビヒクル	3				1
2	ビヒクル	3				4
3	CD71-scr, DAR3+	3	50	10	3.0	2
4	CD71-DMD PMO, DAR3+	3	50	10	3.0	1
5	CD71-DMD PMO, DAR3+	3	50	10	3.0	2
6	CD71-DMD PMO, DAR3+	3	50	10	3.0	4

40

【0397】

50

図15A、図15C、および図15Eを参照すると、インビボのエクソンスキッピングは、Taqman qPCRを使用して、腓腹筋（図15A）、横隔膜（図15C）、および心臓筋（図15E）において野生型マウスで測定された。図15B、図15D、および図15Fを参照すると、CD71 mAb-PMO抱合体は、ネステッドPCRを使用して、腓腹筋（図15B）、横隔膜（図15D）、および心臓筋（図15F）中で測定可能なエクソン23スキッピングをもたらした。野生型の生成物は、788 bpの予想されるサイズを有しており、スキッピングされたDMD 23は、575 bpのサイズを有していた。ゲル上のバンドの強度はデンシティメトリーによって定量化され、データは野生型のジストロフィンと比較して、スキッピングされた生成物の%として提示される。

【0398】

10

実施例9. マウスMSTNに対するCD71 mAb-PMO抱合体のインビボ活性

【0399】

実施例3に記載されるように、マウスミオスタチン（5' AGCCCCATCTTCTCC TGGTCCTGGGAAAGG）（SEQ ID NO: 46）のエクソン2を標的とするCD71 mAb-PMO抱合体が作られ、特徴づけられた。抱合体（DAR1/2およびDAR3+）は、実施例2に記載されるような類似の方法を使用して、野生型CD-1マウスにおけるインビボのエクソンスキッピングを媒介するその能力について評価された。簡潔に言えば、マウスに、静脈内（i.v.）注射によって、mAb、ビヒクル対照、および、指示されたASCを、表15で見られるような指示された投与量で投与した。

【0400】

20

【表15】

表15. インビボ研究設計

グループ	試験物品	N	mAb-PMO mAb投与量 (mg/kg)	PMO投 与量 (mg/kg)	PMO:mAb 比率 (mol/mol)	収集 時間 (週)
1	CD71 mAb-PMO, DAR1/2	3	50	5	1.5	1
2	CD71 mAb-PMO, DAR1/2	3	50	5	1.5	2
3	CD71 mAb-PMO, DAR1/2	3	50	5	1.5	4
4	CD71 mAb-PMO, DAR3+	3	50	10	3.0	1
5	CD71 mAb-PMO, DAR3+	3	50	10	3.0	2
6	CD71 mAb-PMO, DAR3+	3	50	10	3.0	4
7	CD71-scr, DAR1/2	3	50	5	1.5	2
8	CD71-scr, DAR3+	3	50	10	3.0	2
9	ビヒクル	3				1
10	ビヒクル	3				2
11	ビヒクル	3				4

【0401】

30

7、14、あるいは28日後、横隔膜、心臓、および腓腹筋の組織を採取して液体窒素で急速凍結した。RNAを単離して逆転写した。PCR反応は、フォワードプライマー（mMSTN-F1: 5' CCTGGAAACAGCTCCTAACATC）（SEQ ID NO: 50）およびリバースプライマー（mMSTN-R1: 5' CAGTCAGCCCCAAAGTCTCTC）（SEQ ID NO: 51）を用いて行われた（ホットスタート：2分間95°C、45秒間95°Cでの変性、30秒間56°Cでプライマーのアニ

40

50

リング、35サイクルで40秒間72°Cでのプライマー伸長)。PCR反応は、図16 A-16Cで見られるような1%のTAEアガロースゲル中で分析された。CD71 mAb-PMO抱合体は、マウス横隔膜(図16A)、心臓(図16B)、および腓腹筋(図16C)筋組織中で測定可能なエクソン2スキッピングをもたらした。野生型の生成物は、622 bpの予想されるサイズ、および、248 bpのスキッピングされたMSTN 2を有していた。

#### 【0402】

実施例10. PAH遺伝子に対するASGPR mAb-PMO抱合体のインビトロ活性  
【0403】

実施例3に記載されるように、マウスPAHのエクソン11を標的とするASGPR mAb-PMO (5' ATCCCTCTTTGGTAAACCTCACCTCAC) (SEQ ID NO: 47) 抱合体が作られ特徴づけられた。抱合体は、PCR (フォワードプライマー5' - C T A G T G C C C T T G T T T C A G A - 3' (SEQ ID NO: 52) およびリバースプライマー5' - A G G A T C T A C C A C T G A T G G G T - 3' (SEQ ID NO: 53) )を使用する初代マウス肝細胞においてインビトロのマウスPAH遺伝子中のエクソン11スキッピングを媒介とするその能力について、評価された。簡潔に言えば、ASGPR mAb-PAH PMO抱合体の効能は、関連するビヒクル対照を有する、複数の濃度のASGPR mAb-スクランブルPMOと比較された。RNA iMAXも陽性対照として抱合体をトランスフェクトするために使用された。PCR反応は、図17で見られるような1%のTAEアガロースゲル中で分析された。図17のゲルから見られるように、ASGPR mAb-PMO抱合体は、RNA iMAXトランスフェクト対照に匹敵する測定可能な exon 11スキッピングをもたらした。野生型の生成物は、703 bpの予想されるサイズ、および、569 bpのスキッピングされたPAH 11を有していた。

#### 【0404】

実施例11. ASGPR mAb-PM抱合体のインビボ活性

#### 【0405】

実施例3に記載されるように、マウスPAHのエクソン11を標的とするASGPR mAb-PMO (5' ATCCCTCTTTGGTAAACCTCACCTCAC) (SEQ ID NO: 47) 抱合体が作られ特徴づけられた。抱合体 (DAR 1/2 およびDAR 3+) は、実施例2に記載されるような方法を用いて、野生型CD-1マウスにおけるインビボのエクソンスキッピングを媒介するその能力について評価された。簡潔に言えば、マウスに、静脈内 (i.v.) 注射によって、mAb、ビヒクル対照、および、指示されたASCを、表16で見られるような指示された投与量で投与した。

#### 【0406】

## 【表 16】

表 16. インビオ研究設計

グループ	試験物品	N	mAb-ASO mAb 投与 量 (mg/kg)	PMO 投 与量 (mg/kg)	PMO:mAb 比率 (mol/mol)	収集 時間 (週)
1	ASGPR mAb-PMO, DAR1/2	3	50	5	1.5	1
2	ASGPR mAb-PMO, DAR1/2	3	50	5	1.5	2
3	ASGPR mAb-PMO, DAR1/2	3	50	5	1.5	4
4	ASGPR mAb-PMO, DAR3+	2	50	10	3.0	1
5	ASGPR mAb-PMO, DAR3+	2	50	10	3.0	2
6	ASGPR mAb-PMO, DAR3+	2	50	10	3.0	4
7	ASGPR-Scr, DAR1/2	3	50		1.5	2
8	ASGPR-Scr, DAR3+	3	50		3.0	2
9	ビヒクル	3				1
10	ビヒクル	3				2
11	ビヒクル	3				4

## 【0407】

R N A を、採取した肝臓組織から単離し、逆転写した。フォワードプライマー 5' - C T A G T G C C C T T G T T T C A G A - 3' (SEQ ID NO: 52) およびリバースプライマー 5' - A G G A T C T A C C A C T G A T G G G T - 3' (SEQ ID NO: 53) を使用する P C R 反応は、図 18 で見られるような 1 % の T A E アガロースゲル中で分析された。図 18 のゲルで見られるように、A S G P R m A b - P M O 抱合体は、最大で 2 週間、マウス肝臓中の測定可能なエクソン 11 スキッピングをもたらした。野生型の生成物は、7 0 3 b p の予想されるサイズ、および、5 6 9 b p のスキッピングされた P A H 1 1 を有していた。

## 【0408】

実施例 12. 配列

## 【0409】

表 17 は、本明細書に記載されるような組成物および方法を使用して、D M D 遺伝子の挿入、欠失、重複、あるいは改質を誘発するための例示的な標的配列を説明する。表 18 は、本明細書に記載されるような組成物および方法を使用して、D M D 遺伝子の挿入、欠失、重複、あるいは改質を誘発するための例示的なヌクレオチド配列を説明する。表 19 および表 20 は、遺伝子の挿入、欠失、重複、あるいは改質の誘発のためのいくつかの遺伝子中の例示的な標的配列を説明する。表 21 は、本明細書に記載されるような組成物および方法を使用して、遺伝子の挿入、欠失、重複、あるいは改質を誘発するために D M D 遺伝子中の配列を含む例示的な配列を説明する。

## 【0410】

10

20

30

40

50

## 【表 17】

表 17.

標的 エクソン	アンチセンス 配列	SEQ ID NO.
19	5' GCCUGAGCUGAUCUGCUGGCAUCUUGCAGUU 3'	54
19 又は 20	5' GCAGAAUUCGAUCCACCAGGCGUGUCAAGCCUG AGCUGAUCUGCUCGCAUCUUGCAGU3'	55
20	5' CAGCAGUAGUUGUCAUCUGCUC 3'	56
21	5' CACAAAGUCUGCAUCCAGGAACAUGGGUC 3'	57
22	5' CUGCAAUUCCCGAGUCUCUGC 3'	58
51	5' CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC 3'	59
52	5' UCCAACUGGGGACGCCUCUGUUCAAAUC 3'	60

## 【0411】

10

20

30

40

50

## 【表 18 - 1】

表 18.

遺伝子	標的 位置	ヌクレオチド 配列 (5'-3')	SEQ ID NO.
DMD	H8A(-06+18)	GAUAGGUGGUUAUCAACAUCAUCUGUAA	61
DMD	H8A(-03+18)	GAUAGGUGGUUAUCAACAUCAUCUG	62
DMD	H8A(-07+18)	GAUAGGUGGUUAUCAACAUCAUCUGUAG	63
DMD	H8A(-06+14)	GGUGGUUAUCAACAUCAUCUGUAA	64
DMD	H8A(-10+10)	GUAUCAACAUCAUCUGUAGCAC	65
DMD	H7A(+45+67)	UGCAUGUUCCAGUCGUUGUGUGG	66
DMD	H7A(+02+26)	CACUAUUCCAGUCAAAUAGGUCUGG	67
DMD	H7D(+15-10)	AUUUACCAACCUUCAGGAUCGAGUA	68
DMD	H7A(-18+03)	GGCCUAAAACACAUACACAU	69
DMD	C6A(-10+10)	CAUUUUGACCUACAUCAUGUGG	70
DMD	C6A(-14+06)	UUUGACCUACAUUGUGGAAAG	71
DMD	C6A(-14+12)	UACAUUUUUGACCUACAUUGUGGAAAG	72
DMD	C6A(-13+09)	AUUUUUGACCUACAUUGGGAAAG	73
DMD	CH6A(+69+91)	UACGAGUUGAUUGUCGGACCCAG	74
DMD	C6D(+12-13)	GUGGUCUCCUACCUAUCAUGACUGUGG	75
DMD	C6D(+06-11)	GGUCUCCUACCUAUCAUGA	76
DMD	H6D(+04-21)	UGUCUCAGUAACUUCUACCUAU	77
DMD	H6D(+18-04)	UCUUACCUAUGACUAUGGAUGAGA	78
DMD	H4A(+13+32)	GCAUGAACUCUUGUGGAUCC	79
DMD	H4D(+04-16)	CCAGGGUACUACUUACAUUA	80
DMD	H4D(-24-44)	AUCGUGUGUCACAGCAUCCAG	81
DMD	H4A(+11+40)	UGUUCAGGGCAUGAACUCUUGUGGAUCCU	82
DMD	H3A(+30+60)	UAGGAGGCGCCUCCCAUCCUGUAGGUCACUG	83
DMD	H3A(+35+65)	AGGUCUAGGAGGCGCCUCCCAUCCUGUAGGU	84
DMD	H3A(+30+54)	GCGCCUCCCAUCCUGUAGGUCACUG	85
DMD	H3D(+46-21)	CUUCGAGGAGGUCUAGGAGGCGCCUC	86
DMD	H3A(+30+50)	CUCCCAUCCUGUAGGUCACUG	87
DMD	H3D(+19-03)	UACCAAGUUUUGCCCUGUCAGG	88
DMD	H3A(-06+20)	UCAAUAUGCUGCUUCCCAAACUGAAA	89
DMD	H3A(+37+61)	CUAGGAGGCGCCUCCCAUCCUGUAG	90
DMD	H5A(+20+50)	UUAUGAUUUCCAUCUACGAUGUCAGUACUUC	91
DMD	H5D(+25-05)	CUUACCUGCCAGUGGAGGAUUAUUCAAA	92
DMD	H5D(+10-15)	CAUCAGGAUUCUACCUGCCAGUGG	93
DMD	H5A(+10+34)	CGAUGUCAGUACUCCAAUUAUCAC	94
DMD	H5D(-04-21)	ACCAUCAUCAGGAUUC	95
DMD	H5D(+16-02)	ACCUGCCAGUGGAGGAU	96
DMD	H5A(-07+20)	CCAAUAUUCACUAAAUCACCUUAA	97
DMD	H5D(+18-12)	CAGGAUUGUUACCUGCCAGUGGAGGAUUAU	98
DMD	H5A(+05+35)	ACGAUGUCAGUACUCCAAUUAUCACUAAA	99
DMD	H5A(+15+45)	AUUUCCAUCAUCGAUGUCAGUACUCCAAUA	100
DMD	H10A(-05+16)	CAGGAGCUUCCAAAUGCUGCA	101

10

20

30

40

## 【0 4 1 2】

【表 18 - 2】

DMD	H10A(-05+24)	CUUGUCUUCAGGAGCUCCAAAUGCUGCA	102
DMD	H10A(+98+119)	UCCUCAGCAGAAAGAAGGCCACG	103
DMD	H10A(+130+149)	UUAGAAAUCUCUCCUUGUGC	104
DMD	H10A(-33-14)	UAAAUUGGGUGUUACACAAU	105
DMD	H11D(+26+49)	CCCUGAGGCAUUCCCAUCUUGAAU	106
DMD	H11D(+11-09)	AGGACUUACUUGCUUUGUU	107
DMD	H11A(+118+140)	CUUGAAUUUAGGAGAUCAUCUG	108
DMD	H11A(+75+97)	CAUCUUCUGAUAAAUUUCCUGUU	109
DMD	H12A(+52+75)	UCUUCUGUUUUUGUUAGGCCAGUCA	110
DMD	H12A(-10+10)	UCUAUGUAAAUCUGAAAAUUU	111
DMD	H12A(+11+30)	UUCUGGAGAUCCAUUAAAAC	112
DMD	H13A(+77+100)	CAGCAGUUGCGUGAUCUCCACUAG	113
DMD	H13A(+55+75)	UUCAUCAACUACCACCACAU	114
DMD	H13D(+06-19)	CUAAGCAAAUAAUCUGACCACUAAG	115
DMD	H14A(+37+64)	CUUGUAAAAGAACCCAGCGGUCUUCUGU	116
DMD	H14A(+14+35)	CAUCUACAGAUGUUUGCCCAUC	117
DMD	H14A(+51+73)	GAAGGAUGUCUUGUAAAAGAAC	118
DMD	H14D(-02+18)	ACCUGUUCUUCAGUAAGACG	119
DMD	H14D(+14-10)	CAUGACACACCUGUUCUUCAGUAA	120
DMD	H14A(+61+80)	CAUUUGAGAAGGAUGUCUUG	121
DMD	H14A(-12+12)	AUCUCCCAAUACCUGGAGAAGAGA	122
DMD	H15A(-12+19)	GCCAUGCACUAAAAGGCACUGCAAGACAUU	123
DMD	H15A(+48+71)	UCUUAAAAGCCAGUUGUGUGAAUC	124
DMD	H15A(+08+28)	UUUCUGAAAGCCAUGCACUAA	125
DMD	H15D(+17-08)	GUACAUACGGCCAGUUUUUGAAGAC	126
DMD	H16A(-12+19)	CUAGAUCCGCUUUUAAAACCUGUUAAAACAA	127
DMD	H16A(-06+25)	UCUUUUUCUAGAUCCGCUUUUAAAACCUGUUA	128
DMD	H16A(-06+19)	CUAGAUCCGCUUUUAAAACCUGUUA	129
DMD	H16A(+87+109)	CCGUCUUCUGGGUCACUGACUUA	130
DMD	H16A(-07+19)	CUAGAUCCGCUUUUAAAACCUGUUA	131
DMD	H16A(-07+13)	CCGCUUUUAAAACCUGUUA	132
DMD	H16A(+12+37)	UGGAUUGCUUUUCUUUCUAGAUCC	133
DMD	H16A(+92+116)	CAUGCUUCCGUCUUCUGGGUCACUG	134
DMD	H16A(+45+67)	GAUCUUGUUUGAGUGAAUACAGU	135
DMD	H16A(+105+126)	GUUAUCCAGCCAUGCUCCGUC	136
DMD	H16D(+05-20)	UGAUAAUUGGUAUCACUAACCUUGUG	137
DMD	H16D(+12-11)	GUAUCACUAACCUGUGCUGUAC	138
DMD	H19A(+35+53)	CUGCUGGCAUCUUGCAGUU	139
DMD	H19A(+35+65)	GCCUGAGCUGAUCUGCUGGCAUCUUGCAGUU	140
DMD	H20A(+44+71)	CUGGCAGAAUUCGAUCCACCGGCUGUUC	141
DMD	H20A(+147+168)	CAGCAGUAGUUGUCAUCUGCUC	142
DMD	H20A(+185+203)	UGAUGGGGUGGGUGGGUUG	143
DMD	H20A(-08+17)	AUCUGCAUUAACACCCUCUAGAAAG	144
DMD	H20A(+30+53)	CCGGCUGUUCAGUUGUUCUGAGGC	145
DMD	H20A(-11+17)	AUCUGCAUUAACACCCUCUAGAAAGAAA	146

10

20

30

40

【0 4 1 3】

【表 18 - 3】

<i>DMD</i>	H20D(+08-20)	GAAGGGAGAAGAGAUUCUUACCUUACAAA	147
<i>DMD</i>	H20A(+44+63)	AUUCGAUCCACCGGCUGUUC	148
<i>DMD</i>	H20A(+149+168)	CAGCAGUAGUUGUCAUCUGC	149
<i>DMD</i>	H21A(-06+16)	GCCGGUUGACUUCAUCCUGUGC	150
<i>DMD</i>	H21A(+85+106)	CUGCAUCCAGGAACAAUGGGUCC	151
<i>DMD</i>	H21A(+85+108)	GUCUGCAUCCAGGAACAAUGGGUCC	152
<i>DMD</i>	H21A(+08+31)	GUUGAAGAACUGAUAGCCGGUUGA	153
<i>DMD</i>	H21D(+18-07)	UACUACUGUCUGUAGCUCUUUCU	154
<i>DMD</i>	H22A(+22+45)	CACUCAUGGUCUCCUGAUAGCGCA	155
<i>DMD</i>	H22A(+125+106)	CUGCAAUCCCCGAGUCUCUGC	156
<i>DMD</i>	H22A(+47+69)	ACUGCUGGACCAUGUCCUGAUG	157
<i>DMD</i>	H22A(+80+101)	CUAAGUUGAGGUAAUGGAGAGU	158
<i>DMD</i>	H22D(+13-11)	UAUUCACAGACCUGCAAUCCCC	159
<i>DMD</i>	H23A(+34+59)	ACAGUGGUGCUGAGAUAGUAUAGGCC	160
<i>DMD</i>	H23A(+18+39)	UAGGCCACUUUGUUGCUCUUGC	161
<i>DMD</i>	H23A(+72+90)	UUCAGAGGGCGCUUUCUUC	162
<i>DMD</i>	H24A(+48+70)	GGGCAGGCCAUUCCUCCUUCAGA	163
<i>DMD</i>	H24A(-02+22)	UCUUCAGGGUUUGUAUGUGAUUCU	164
<i>DMD</i>	H25A(+9+36)	CUGGGCUGAAUUGUCUGAAUACACUG	165
<i>DMD</i>	H25A(+131+156)	CUGUUGGCACAUGUGAUCCCACUGAG	166
<i>DMD</i>	H25D(+16-08)	GUCUAUACCUGUUGGCACAUGUGA	167
<i>DMD</i>	H26A(+132+156)	UGCUUUCUGUAUUCAUCUGGAGUU	168
<i>DMD</i>	H26A(-07+19)	CCUCCUUUCUGGCAUAGACCUUCCAC	169
<i>DMD</i>	H26A(+68+92)	UGUGUCAUCCAUUCGUGCAUCUCUG	170
<i>DMD</i>	H27A(+82+106)	UUAAGGCCUCUUGUGCUACAGGUGG	171
<i>DMD</i>	H27A(-4+19)	GGGGCUCUUCUUUAGCUCUCUGA	172
<i>DMD</i>	H27D(+19-03)	GACUCCAAAGUCUUGCAUUUC	173
<i>DMD</i>	H28A(-05+19)	GCCAACAUGCCCAAACUUCCUAAG	174
<i>DMD</i>	H28A(+99+124)	CAGAGAUUUCCUCAGCUCCGCCAGGA	175
<i>DMD</i>	H28D(+16-05)	CUUACAUCUAGCACCUCAGAG	176
<i>DMD</i>	H29A(+57+81)	UCCGCCAUCUGUUAGGGUCUGUGCC	177
<i>DMD</i>	H29A(+18+42)	AUUUGGGUUAUCCUCUGAAUGUGCGC	178
<i>DMD</i>	H29D(+17-05)	CAUACCUCUCAUGUAGUACCCC	179
<i>DMD</i>	H30A(+122+147)	CAUUUGAGCUGCGUCCACCUUGUCUG	180
<i>DMD</i>	H30A(+25+50)	UCCUGGGCAGACUGGAUGCUCUGUUC	181
<i>DMD</i>	H30D(+19-04)	UUGCCUGGGCUUCCUGAGGCAUU	182
<i>DMD</i>	H31D(+06-18)	UUCUGAAAACAUUAUACUGUGC	183
<i>DMD</i>	H31D(+03-22)	UAGUUUCUGAAAACAUUAUACCUUG	184
<i>DMD</i>	H31A(+05+25)	GACUUGUAAAUCAGAUUGGA	185
<i>DMD</i>	H31D(+04-20)	GUUUCUGAAAACAUUAUACCUUG	186
<i>DMD</i>	H32D(+04-16)	CACCAGAAAACAUACCACA	187
<i>DMD</i>	H32A(+151+170)	CAAUGAUUUAGCUGUGACUG	188
<i>DMD</i>	H32A(+10+32)	CGAAACUUCAUUGGAGACAUUUG	189
<i>DMD</i>	H32A(+49+73)	CUUGUAGACGCUGCUAAAAUUGGC	190
<i>DMD</i>	H33D(+09-11)	CAUGCACACACCUUUGCUCC	191

10

20

30

40

【0414】

【表 18 - 4】

DMD	H33A(+53+76)	UCUGUACAAUCUGACGUCCAGUCU	192
DMD	H33A(+30+56)	GUCUUUAUCACCAUUUCCACUUCAGAC	193
DMD	H33A(+64+88)	CCGUCUGCUUUUCUGUACAAUCUG	194
DMD	H34A(+83+104)	UCCAUAAUCUGUAGCUGCCAGCC	195
DMD	H34A(+143+165)	CCAGGCAACUUUCAGAAUCCAAAU	196
DMD	H34A(-20+10)	UUUCUGUUACCUGAAAAGAAUUAUAAUGAA	197
DMD	H34A(+46+70)	CAUUCAUUUCUUCUGCAUCUACG	198
DMD	H34A(+95+120)	UGAUCUCUUUGUCAAUUCCAUACUG	199
DMD	H34D(+10-20)	UUCAGUGAUAUAGGUUUUACCUUCCCCAG	200
DMD	H34A(+72+96)	CUG UAG CUG CCA GCC AUU CUG UCA AG	201
DMD	H35A(+141+161)	UCU UCU GCU CGG GAG GUG ACA	202
DMD	H35A(+116+135)	CCA GUU ACU AUU CAG AAG AC	203
DMD	H35A(+24+43)	UCU UCA GGU GCA CCU UCU GU	204
DMD	H36A(+26+50)	UGUGAUGUGGUCCACAUUCUGGUCA	205
DMD	H36A(-02+18)	CCAUGUGUUUCUGGUAUUCC	206
DMD	H37A(+26+50)	CGUGUAGAGGUCCACCUUUGGGCGUA	207
DMD	H37A(+82+105)	UACUAAUUUCUGCAGUGGUCCACC	208
DMD	H37A(+134+157)	UUCUGUGUGAAAUGGCUGCAAAUC	209
DMD	H38A(-01+19)	CCUUCAAAGGAAUUGGAGGCC	210
DMD	H38A(+59+83)	UGCUGAAUUUCAGCCUCCAGUGGUU	211
DMD	H38A(+88+112)	UGAAGUCUUCCUCUUUCAGAUUCAC	212
DMD	H39A(+62+85)	CUGGCUUUCUCUCAUCUGUGAUUC	213
DMD	H39A(+39+58)	GUUGUAAGUUGUCUCCUCUU	214
DMD	H39A(+102+121)	UUGUCUGUAACAGCUGCUGU	215
DMD	H39D(+10-10)	GCUCUAAUACCUUUGAGAGCA	216
DMD	H40A(-05+17)	CUUUGAGACCUCAAUCCUGUU	217
DMD	H40A(+129+153)	CUUUUUUUCCUUUCAUCUCUGGGC	218
DMD	H42A(-04+23)	AUCGUUUCUACGGACAGUGUGCUGG	219
DMD	H42A(+86+109)	GGGCUUGUGAGACAUGAGUGAUU	220
DMD	H42D(+19-02)	ACCUUCAGAGGACUCCUCUUGC	221
DMD	H43D(+10-15)	UAUGUGUUACCUACCUUUGUCGGUC	222
DMD	H43A(+101+120)	GGAGAGAGCUUCCUGUAGCU	223
DMD	H43A(+78+100)	UCACCCUUUCCACAGGCGUUGCA	224
DMD	H44A(+85+104)	UUUGUGUCUUUCUGAGAAC	225
DMD	H44D(+10-10)	AAAGACUUACCUUAAGAUAC	226
DMD	H44A(-06+14)	AUCUGUAAAUCGCCUGCAG	227
DMD	H46D(+16-04)	UUACCUUGACUUGCUCUAGC	228
DMD	H46A(+90+109)	UCCAGGUUCAAGUGGGAUAC	229
DMD	H47A(+76+100)	GCUCUUCUGGGCUUAUGGGAGCACU	230
DMD	H47D(+25-02)	ACCUUUAUCCACUGGAGAUUUGUCUGC	231
DMD	H47A(-9+12)	UUCCACCAAGUAACUGAAACAG	232
DMD	H50A(+02+30)	CCACUCAGAGCUCAGAUCUUCUAACUCC	233
DMD	H50A(+07+33)	CUUCCACUCAGAGCUCAGAUCUUCUA	234
DMD	H50D(+07-18)	GGGAUCCAGUAUACUUACAGGCUCC	235
DMD	H51A(-01+25)	ACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGAGC	236

10

20

30

40

【0415】

【表 18 - 5】

DMD	H51D(+16-07)	CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC	237
DMD	H51A(+111+134)	UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAUC	238
DMD	H51A(+61+90)	ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUGG	239
DMD	H51A(+66+90)	ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	240
DMD	H51A(+66+95)	CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	241
DMD	H51D(+08-17)	AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCU	242
DMD	H51A/D(+08-17) &(-15+)	AUCAUUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAG GAGCUAAAA	243
DMD	H51A(+175+195)	CACCCACCAUCACCCUCUGUG	245
DMD	H51A(+199+220)	AUCAUCUCGUUGAUUAUCCUCAA	246
DMD	H52A(-07+14)	UCCUGCAUUGUUGCCUGUAAG	247
DMD	H52A(+12+41)	UCCAACUGGGGACGCCUCUGUUCCAAAUCC	248
DMD	H52A(+17+37)	ACUGGGGACGCCUCUGUUCCA	249
DMD	H52A(+93+112)	CCGUAAUGAUUGUUCUAGCC	250
DMD	H52D(+05-15)	UGUUAAAAAAACUUACUUCGA	251
DMD	H53A(+45+69)	CAUCAACUGUUGCCUCCGGUUCUG	252
DMD	H53A(+39+62)	CUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG	253
DMD	H53A(+39+69)	CAUCAACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG	254
DMD	H53D(+14-07)	UACUAACCUUGGUUUCUGUGA	255
DMD	H53A(+23+47)	CUGAAGGUGUUCUUGUACUUCAUCC	256
DMD	H53A(+150+176)	UGUAUAGGGACCCUCCUCCAUGACUC	257
DMD	H53D(+20-05)	CUAACCUUGGUUUCUGUGAUUUUCU	258
DMD	H53D(+09-18)	GGUAUCUUUGAUACUAACCUUGGUUUC	259
DMD	H53A(-12+10)	AUUCUUCAACUAGAAUAAAAG	260
DMD	H53A(-07+18)	GAUUCUGAAUUCUUCAACUAGAAU	261
DMD	H53A(+07+26)	AUCCCACUGAUUCUGAAUUC	262
DMD	H53A(+124+145)	UUGGCUCUGGCCUGGUCCUAAGA	263
DMD	H46A(+86+115)	CUCUUUCCAGGUUCAAGUGGGAUACUAGC	264
DMD	H46A(+107+137)	CAAGCUUUUCUUUUAGUUGCUGCUCUUUCC	265
DMD	H46A(-10+20)	UAUUCUUUUGUUCUUCUAGGCCUGGAGAAAG	266
DMD	H46A(+50+77)	CUGCUUCCUCCAACCAUAACAAUUC	267
DMD	H45A(-06+20)	CCAAUGCCAUCUCCUGGAGUUCGUUA	268
DMD	H45A(+91+110)	UCCUGUAGAAUACUGGCAUC	269
DMD	H45A(+125+151)	UGCAGACCUCCUGGCCACCGCAGAUUCA	270
DMD	H45D(+16-04)	CUACCUCUUUUUCUGUCUG	271
DMD	H45A(+71+90)	UGUUUUUGAGGAUUGCUGAA	272

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

10

20

30

40

【0416】

50

## 【表19】

表19.

遺伝子	ヌクレオチド配列(5' - 3')	SEQ ID NO.
Bcl-x	TGGTTCTTACCCAGCCGCCG	273
β-globin 623	GTTATTCTTCTAGAATGGTGC	274
β-globin 654	TGCTATTACCTTAACCCAGA	275
c-myc	CTGTGCTTACCGGGTTTCCACCTCCC	276
c-myc	ATCGTCGTGACTGTCTGTTGGAGGG	277
c-myc	GCTCACGTTGAGGGGCATCGCG	278
c-myc	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	279
c-myc	GGGGCAUCGUUGACUGU/CUGUUGGAGGG	280
c-myc	CGUCGUGACUGUCUGUUGGAGG	281
c-myc	CGTCGTGACTGTCTGTTGGAGG	282
c-myc	GGCAUCGUUCGGGAGGCUGCUGGAGCG	283
c-myc	CCGCGACAUAGGACGGAGAGCAGAGCCC	284
c-myc	ACTGTGAGGGCGATCGCTGC	285
c-myc	ACGATGAGTGGCATAGTCGC	286
c-myc	GGCATCGTCGCGGGAGGCTG	287
c-myc	GGGCATCGTCGCGGGAGGCT	288
c-myc	GGGGCATCGTCGCGGGAGGC	289
c-myc	AGGGGCATCGTCGCGGGAGG	290
c-myc	GAGGGGCATCGTCGCGGGAG	291
c-myc	TGAGGGGCATCGTCGCGGGGA	292
c-myc	TTGAGGGGCATCGTCGCGGG	293
c-myc	GTTGAGGGGCATCGTCGCGG	294
c-myc	CGTTGAGGGGCATCGTCGCG	295
c-myc	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	296
c-myc	AACGTTGAGGGGCATCGTCG	297
c-myc	TAACGTTGAGGGGCATCGTC	298
c-myc	CTAACGTTGAGGGGCATCGT	299
c-myc	GCTAACGTTGAGGGGCATCG	300
c-myc	AGCTAACGTTGAGGGGCATC	301
c-myc	AAGCTAACGTTGAGGGGCAT	302
c-myc	GAAGCTAACGTTGAGGGGCA	303
BCL-2(ラット)	CTCCGCAATGCTGAAAGGTG	304
PCNA-1(ラット)	GGCGUGCCUAAACAUGGUGGCAG	305

10

20

30

## 【0417】

40

50

## 【表 20 - 1】

表 20.

遺伝子	標的位 置	ヌクレオチド配列 (5'-3')	SEQ ID NO.
ラット c-myc	2553-79	CTGTGCTTACCGGGTTTCCACCTCCC	306
ラット c-myc	4140-64	ATCGTCGTGACTGTCTGTTGGAGGG	307
ラット c-myc	4161-80	GCTCACGTTGAGGGGCATCG	308
ラット CYP3A2	1155-74	GGTCACTCACCGTAGAGAA	309
ラット CYP3A2	1526-45	GGGTTCCAAGTCTATAAAGG	310
ヒトアンドロ ゲン受容体 エクソン 2	31-44	TGTGTCTTCCAG	311
ヒトアンドロ ゲン受容体 エクソン 2	45-67	TTTGGAGACTGCCAGGGACCATG	312
ヒトアンドロ ゲン受容体 エクソン 2	48-67	CATGGTCCCTGGCAGTCTCC	313
ヒトアンドロ ゲン受容体 エクソン 2	45-80	TCAATGGGCAAAACATGGCCCTGGCAGTCTCCAAA	314
ヒトアンドロ ゲン受容体 エクソン 3	28-43	TTTGTGTTCTCCCAG	315
ヒトアンドロ ゲン受容体 エクソン 3	44-66	GGAAACAGAAGTACCTGTGCGCC	316
ヒトアンドロ ゲン受容体 エクソン 3	49-66	GGCGCACAGGTACTTCTG	317
ヒトアンドロ ゲン受容体 エクソン 3	44-79	AATCATTCTGCTGGCGCACAGGTACTTCTGTTCC	318
ヒト HCG- $\beta$ サ ブユニット	1321-38	CCCTGCAGCACGCCGGT	319
ヒト HCG- $\beta$ サ ブユニット	1321-57	GAGGCAGGGCCGGCAGGACCCCTGCAGCACGCCGGT	320
ヒト c-myc	4506-25	GGCATCGTCGCGGGAGGCTG	321
ヒト c-myc	4507-26	GGGCATCGTCGCGGGAGGCT	322
ヒト c-myc	4508-27	GGGGCATCGTCGCGGGAGGC	323
ヒト c-myc	4509-28	AGGGGCATCGTCGCGGGAGG	324
ヒト c-myc	4510-29	GAGGGGCATCGTCGCGGGAG	325
ヒト c-myc	4511-30	TGAGGGGCATCGTCGCGGGAGA	326

10

20

30

40

## 【0418】

【表 20 - 2】

ヒト c-myc	4512-31	TTGAGGGGCATCGTCGCGGG	327
ヒト c-myc	4513-32	GTTGAGGGGCATCGTCGCG	328
ヒト c-myc	4514-33	CGTTGAGGGGCATCGTCGCG	329
ヒト c-myc	4515-34	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	330
ヒト c-myc	4516-35	AACGTTGAGGGGCATCGTCG	331
ヒト c-myc	4517-36	TAACGTTGAGGGGCATCGTC	332
ヒト c-myc	4518-37	CTAACGTTGAGGGGCATCGT	333
ヒト c-myc	4519-38	GCTAACGTTGAGGGGCATCG	334
ヒト c-myc	4520-39	AGCTAACGTTGAGGGGCATC	335
ヒト c-myc	4521-40	AAGCTAACGTTGAGGGGCAT	336
ヒト c-myc	4522-41	GAAGCTAACGTTGAGGGGCA	337
ヒト c-myc	6656-75	TCCTCATCTTCTTGTTCCTC	338
ヒト c-myc	6656-91	AACAAACATCGATTCTCCTCATCTTGTTCCTC	339
ヒト p53	11691-708	CCCGGAAGGCAGTCTGGC	340
ヒト p53	11689-724	TCCTCCATGGCAGTGACCCGGAAGGCAGTCTGGCTG	341
ヒト abl (bcr-abl 融合点の ds )	376-94	CTACTGGCCGCTGAAGGGC	342
ヒト abl (bcr-abl 融合点の ds )	374-409	GCTCAAAGTCAGATGCTACTGGCCGCTGAAGGGCTT	343
HW-1 rev	5517-43	TCGTCGGTCTCTCGCTTCTTCTTGCC	344
HW-1 rev	7885-7904	CTCTGGTGGTGGTAAGGGT	345
HW-1 rev	7885-7921	CGGGTCTGTCGGGTTCCCTCTGGTGGTGGTAAGGGT	346
ラット c-myc	4140-69	GGGGCAUCGUCGUGACUGUCUGUUGGAGGG	347
ラット c-myc	4141-62	CGUCGUGACUGUCUGUUGGAGG	348
ラット c-myc	4141-62	CGTCGTGACTGTCTGTTGGAGG	349
ヒト c-myc	4498-4505	GGCAUCGUCGCGGGAGGCUG/CUGGAGCG	350
ラット c-myc	4364-91	CCGCGACAUAGGACGGAGAGCAGAGCCC	351

10

20

30

【0419】

40

50

## 【表 21 - 1】

表 21.

標的	ヌクレオチド配列(5' - 3')	SEQ ID NO.
Hu.DMD.エクソン 44.25.001	CTGCAGGTAAAAGCATATGGATCAA	352
Hu.DMD.エクソン 44.25.002	ATCGCCTGCAGGTAAAAGCATATGG	353
Hu.DMD.エクソン 44.25.003	GTCAAATGCCCTGCAGGTAAAAGCA	354
Hu.DMD.エクソン 44.25.004	GATCTGTCAAATGCCCTGCAGGTAA	355
Hu.DMD.エクソン 44.25.005	CAACAGATCTGTCAAATGCCCTGCA	356
Hu.DMD.エクソン 44.25.006	TTTCTCAACAGATCTGTCAAATCGC	357
Hu.DMD.エクソン 44.25.007	CCATTCTCAACAGATCTGTCAAAT	358
Hu.DMD.エクソン 44.25.008	ATAATGAAAACGCCGCCATTCTCA	359
Hu.DMD.エクソン 44.25.009	AAATATCTTATATCATAATGAAAA	360
Hu.DMD.エクソン 44.25.010	TGTTAGCCACTGATTAAATATCTT	361
Hu.DMD.エクソン 44.25.011	AAACTGTTCAGCTCTGTTAGCCAC	362
Hu.DMD.エクソン 44.25.012	TTGTGTCTTCTGAGAAACTGTTCA	363
Hu.DMD.エクソン 44.25.013	CCAATTCTCAGGAATTGTGTCTT	364
Hu.DMD.エクソン 44.25.014	GTATTTAGCATGTTCCAATTCTCA	365
Hu.DMD.エクソン 44.25.015	CTTAAGATACCATTGTATTAGCA	366
Hu.DMD.エクソン 44.25.016	CTTACCTTAAGATAACCATTGTATT	367
Hu.DMD.エクソン 44.25.017	AAAGACTTACCTTAAGATAACCATT	368
Hu.DMD.エクソン 44.25.018	AAATCAAAGACTTACCTTAAGATAC	369
Hu.DMD.エクソン 44.25.019	AAAACAAATCAAAGACTTACCTTAA	370
Hu.DMD.エクソン 44.25.020	TCGAAAAAACAAATCAAAGACTTAC	371
Hu.DMD.エクソン 45.25.001	CTGTAAGATACCAAAAAGGCAAAAC	372
Hu.DMD.エクソン 45.25.002	CCTGTAAGATACCAAAAAGGCAAAA	373

10

20

30

40

## 【0420】

【表 21-2】

Hu.DMD.エクソン 45.25.002.2	AGTCCTGTAAGATACCAAAAGGC	374
Hu.DMD.エクソン 45.25.003	GAGTCCTGTAAGATACCAAAAGG	375
Hu.DMD.エクソン 45.25.003.2	CCTGGAGTCCTGTAAGATACCAA	376
Hu.DMD.エクソン 45.25.004	TCCTGGAGTCCTGTAAGATACCAA	377
Hu.DMD.エクソン 45.25.004.2	GCCATCCTGGAGTCCTGTAAGATA	378
Hu.DMD.エクソン 45.25.005	TGCCATCCTGGAGTCCTGTAAGAT	379
Hu.DMD.エクソン 45.25.005.2	CCAATGCCATCCTGGAGTCCTGTA	380
Hu.DMD.エクソン 45.25.006	CCCAATGCCATCCTGGAGTCCTGT	381
Hu.DMD.エクソン 45.25.006.2	GCTGCCAATGCCATCCTGGAGTTC	382
Hu.DMD.エクソン 45.25.007	CGCTGCCAATGCCATCCTGGAGTT	383
Hu.DMD.エクソン 45.25.008	AACAGTTGCCGCTGCCAATGCCA	384
Hu.DMD.エクソン 45.25.008.2	CTGACAACAGTTGCCGCTGCCAA	385
Hu.DMD.エクソン 45.25.009	GTTGCATTCAATGTTCTGACAAACAG	386
Hu.DMD.エクソン 45.25.010	GCTGAATTATTCTTCCCCAGTTGC	387
Hu.DMD.エクソン 45.25.010.2	ATTATTCTTCCCCAGTTGCATTCA	388
Hu.DMD.エクソン 45.25.011	GGCATCTTTTGAGGATTGCTGA	389
Hu.DMD.エクソン 45.25.011.2	TTTGAGGATTGCTGAATTATTCTT	390
Hu.DMD.エクソン 45.25.012	AATTTTCTGTAGAATACTGGCAT	391
Hu.DMD.エクソン 45.25.012.2	ATACTGGCATCTGTTTGAGGATT	392
Hu.DMD.エクソン 45.25.013	ACCGCAGATTCAAGCTTCCAATT	393
Hu.DMD.エクソン 45.25.013.2	AATTTTCTGTAGAATACTGGCAT	394
Hu.DMD.エクソン 45.25.014	CTGTTGCAGACCTCCTGCCACCGC	395
Hu.DMD.エクソン 45.25.014.2	AGATTCAAGCTTCCAATTTCCT	396
Hu.DMD.エクソン	CTCTTTCTGTCTGACAGCTGTT	397

【0421】

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 3】

45.25.015		
Hu.DMD.エクソン	ACCTCCTGCCACCGCAGATTAGGC	398
45.25.015.2		
Hu.DMD.エクソン	CCTACCTTTTTCTGTCTGACAG	399
45.25.016		
Hu.DMD.エクソン	GACAGCTTTGCAGACCTCCTGCC	400
45.25.016.2		
Hu.DMD.エクソン	GTCGCCCTACCTTTTCTGTCT	401
45.25.017		
Hu.DMD.エクソン	GATCTGTCGCCCTACCTTTTTC	402
45.25.018		
Hu.DMD.エクソン	TATTAGATCTGTCGCCCTACCTCTT	403
45.25.019		
Hu.DMD.エクソン	ATTCCTATTAGATCTGTCGCCCTAC	404
45.25.020		
Hu.DMD.エクソン	AGATACCAAAAGGCAAAAC	405
45.20.001		
Hu.DMD.エクソン	AAGATACCAAAAGGCAAAA	406
45.20.002		
Hu.DMD.エクソン	CCTGTAAGATAACCAAAAGG	407
45.20.003		
Hu.DMD.エクソン	GAGTCCTGTAAGATAACCA	408
45.20.004		
Hu.DMD.エクソン	TCCTGGAGTTCCCTGTAAGAT	409
45.20.005		
Hu.DMD.エクソン	TGCCATCCTGGAGTTCCCTGT	410
45.20.006		
Hu.DMD.エクソン	CCCAATGCCATCCTGGAGTT	411
45.20.007		
Hu.DMD.エクソン	CGCTGCCCAATGCCATCCTG	412
45.20.008		
Hu.DMD.エクソン	CTGACAAACAGTTGCCGCTG	413
45.20.009		
Hu.DMD.エクソン	GTTGCATTCAATGTTCTGAC	414
45.20.010		
Hu.DMD.エクソン	ATTATTCTCCCCAGTTGC	415
45.20.011		
Hu.DMD.エクソン	TTTGAGGATTGCTGAATTAT	416
45.20.012		
Hu.DMD.エクソン	ATACTGGCATCTGTTTGA	417
45.20.013		
Hu.DMD.エクソン	AATTTTCCTGTAGAATACT	418
45.20.014		
Hu.DMD.エクソン	AGATTCAAGGCTTCCCAATT	419
45.20.015		
Hu.DMD.エクソン	ACCTCCTGCCACCGCAGATT	420
45.20.016		

10

20

30

40

【 0 4 2 2 】

【表 2 1 - 4】

Hu.DMD.エクソン 45.20.017	GACAGCTGTTGCAGACCTC	421
Hu.DMD.エクソン 45.20.018	CTCTTTTCTGTCTGACAG	422
Hu.DMD.エクソン 45.20.019	CCTACCTCTTTCTGTCT	423
Hu.DMD.エクソン 45.20.020	GTCGCCCTACCTCTTTTC	424
Hu.DMD.エクソン 45.20.021	GATCTGTCGCCCTACCTCTT	425
Hu.DMD.エクソン 45.20.022	TATTAGATCTGTCGCCCTAC	426
Hu.DMD.エクソン 45.20.023	ATTCCTATTAGATCTGTCGC	427
Hu.DMD.エクソン 46.25.001	GGGGGATTGAGAAAATAAAATTAC	428
Hu.DMD.エクソン 46.25.002	ATTTGAGAAAATAAAATTACCTTGA	429
Hu.DMD.エクソン 46.25.002.2	CTAGCCTGGAGAAAGAAGAATAAA	430
Hu.DMD.エクソン 46.25.003	AGAAAATAAAATTACCTTGACTTGC	431
Hu.DMD.エクソン 46.25.003.2	TTCTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAA	432
Hu.DMD.エクソン 46.25.004	ATAAAATTACCTTGACTTGCTCAAG	433
Hu.DMD.エクソン 46.25.004.2	TTTGTTCTCTAGCCTGGAGAAAG	434
Hu.DMD.エクソン 46.25.005	ATTACCTTGACTTGCTCAAGCTTT	435
Hu.DMD.エクソン 46.25.005.2	TATTCTTTGTTCTTAGCCTGGA	436
Hu.DMD.エクソン 46.25.006	CTTGACTTGCTCAAGCTTTCTTT	437
Hu.DMD.エクソン 46.25.006.2	CAAGATATTCTTTGTTCTTAGC	438
Hu.DMD.エクソン 46.25.007	CTTTTAGTTGCTGCTCTTCCAGG	439
Hu.DMD.エクソン 46.25.008	CCAGGTTCAAGTGGGATACTAGCAA	440
Hu.DMD.エクソン 46.25.008.2	ATCTCTTGAAATTCTGACAAGATA	441
Hu.DMD.エクソン 46.25.009	AGCAATGTTATCTGCTCCTCCAAC	442
Hu.DMD.エクソン 46.25.009.2	AACAAATTCAATTAAATCTCTTTGA	443
Hu.DMD.エクソン	CCAACCATAAAACAAATTCAATTAA	444

10

20

30

40

【 0 4 2 3 】

【表 2 1 - 5】

46.25.010		
Hu.DMD.エクソン 46.25.010.2	TTCCTCCAACCATAAAACAAATTCA	445
Hu.DMD.エクソン 46.25.011	TTTAAATCTCTTGAAATTCTGACA	446
Hu.DMD.エクソン 46.25.012	TGACAAGATATTCTTTGTTCTTCT	447
Hu.DMD.エクソン 46.25.012.2	TTCAAGTGGGATACTAGCAATGTTA	448
Hu.DMD.エクソン 46.25.013	AGATATTCTTTGTTCTTAGCCT	449
Hu.DMD.エクソン 46.25.013.2	CTGCTCTTCCAGGTTCAAGTGGG	450
Hu.DMD.エクソン 46.25.014	TTCTTTGTTCTTAGCCTGGAGA	451
Hu.DMD.エクソン 46.25.014.2	CTTTCTTTAGTTGCTGCTCTT	452
Hu.DMD.エクソン 46.25.015	TTGTTCTCTAGCCTGGAGAAAGAA	453
Hu.DMD.エクソン 46.25.016	CTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAATA	454
Hu.DMD.エクソン 46.25.017	AGCCTGGAGAAAGAAGAATAAAATT	455
Hu.DMD.エクソン 46.25.018	CTGGAGAAAGAAGAATAAAATTGTT	456
Hu.DMD.エクソン 46.20.001	GAAAGAAGAATAAAATTGTT	457
Hu.DMD.エクソン 46.20.002	GGAGAAAGAAGAATAAAATT	458
Hu.DMD.エクソン 46.20.003	AGCCTGGAGAAAGAAGAATA	459
Hu.DMD.エクソン 46.20.004	CTTCTAGCCTGGAGAAAGAA	460
Hu.DMD.エクソン 46.20.005	TTGTTCTCTAGCCTGGAGA	461
Hu.DMD.エクソン 46.20.006	TTCTTTGTTCTTAGCCT	462
Hu.DMD.エクソン 46.20.007	TGACAAGATATTCTTTGTT	463
Hu.DMD.エクソン 46.20.008	ATCTCTTGAAATTCTGACA	464
Hu.DMD.エクソン 46.20.009	AACAAATTCAATTAAATCTC	465
Hu.DMD.エクソン 46.20.010	TTCCTCCAACCATAAAACAA	466
Hu.DMD.エクソン 46.20.011	AGCAATGTTATCTGCTTCCT	467

10

20

30

40

【0 4 2 4】

【表 2 1 - 6】

Hu.DMD.エクソン 46.20.012	TTCAAGTGGGATACTAGCAA	468
Hu.DMD.エクソン 46.20.013	CTGCTCTTCCAGGTTCAA	469
Hu.DMD.エクソン 46.20.014	CTTTCTTTAGTTGCTGCT	470
Hu.DMD.エクソン 46.20.015	CTTGACTTGCTCAAGCTTT	471
Hu.DMD.エクソン 46.20.016	ATTACCTTGACTTGCTCAAG	472
Hu.DMD.エクソン 46.20.017	ATAAAATTACCTTGACTTGC	473
Hu.DMD.エクソン 46.20.018	AGAAAATAAAATTACCTTGA	474
Hu.DMD.エクソン 46.20.019	ATTTGAGAAAATAAAATTAC	475
Hu.DMD.エクソン 46.20.020	GGGGGATTTGAGAAAATAAA	476
Hu.DMD.エクソン 47.25.001	CTGAAACAGACAAATGCAACACGT	477
Hu.DMD.エクソン 47.25.002	AGTAAC TGAAACAGACAAATGCAAC	478
Hu.DMD.エクソン 47.25.003	CCACCAGTAAC TGAAACAGACAAAT	479
Hu.DMD.エクソン 47.25.004	CTCTTCCACCAGTAAC TGAAACAGA	480
Hu.DMD.エクソン 47.25.005	GGCAACTCTTCCACCAGTAAC TGAA	481
Hu.DMD.エクソン 47.25.006	GCAGGGGCAACTCTTCCACCAGTAA	482
Hu.DMD.エクソン 47.25.007	CTGGCGCAGGGGCAACTCTTCCACC	483
Hu.DMD.エクソン 47.25.008	TTAATTGTTGAGAATTCCCTGGC	484
Hu.DMD.エクソン 47.25.008.2	TTGTTGAGAATTCCCTGGCCAGG	485
Hu.DMD.エクソン 47.25.009	GCACGGGTCCCTCCAGTTCAATTAA	486
Hu.DMD.エクソン 47.25.009.2	TCCAGTTTCATTAATTGTTGAGA	487
Hu.DMD.エクソン 47.25.010	GCTTATGGGAGCACTTACAAGCACG	488
Hu.DMD.エクソン 47.25.010.2	TACAAGCACGGGTCCCTCCAGTTCA	489
Hu.DMD.エクソン 47.25.011	AGTTTATCTTGCTCTCTGGGCTTA	490
Hu.DMD.エクソン	TCTGCTTGAGCTTATTCAAGTTT	491

【 0 4 2 5 】

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 7】

47.25.012		
Hu.DMD.エクソン	ATCTTGCTCTTCTGGGCTTATGGGA	492
47.25.012.2		
Hu.DMD.エクソン	CTTTATCCACTGGAGATTTGTCTGC	493
47.25.013		
Hu.DMD.エクソン	CTTATTTCAAGTTATCTTGCTCT	494
47.25.013.2		
Hu.DMD.エクソン	CTAACCTTATCCACTGGAGATTG	495
47.25.014		
Hu.DMD.エクソン	ATTGTCTGCTTGAGCTTATTTCA	496
47.25.014.2		
Hu.DMD.エクソン	AATGTCTAACCTTATCCACTGGAG	497
47.25.015		
Hu.DMD.エクソン	TGGTTAACGTCTAACCTTATCCAC	498
47.25.016		
Hu.DMD.エクソン	AGAGATGGTTAACGTCTAACCTTA	499
47.25.017		
Hu.DMD.エクソン	ACGGAAGAGATGGTTAACGTCTAAC	500
47.25.018		
Hu.DMD.エクソン	ACAGACAAATGCAACAAACGT	501
47.20.001		
Hu.DMD.エクソン	CTGAAACAGACAAATGCAAC	502
47.20.002		
Hu.DMD.エクソン	AGTAACGTAAACAGACAAAT	503
47.20.003		
Hu.DMD.エクソン	CCACCAGTAACGTAAACAGA	504
47.20.004		
Hu.DMD.エクソン	CTCTTCCACCAGTAACGTAA	505
47.20.005		
Hu.DMD.エクソン	GGCAACTCTTCCACCAGTAA	506
47.20.006		
Hu.DMD.エクソン	CTGGCGCAGGGGCAACTCTT	507
47.20.007		
Hu.DMD.エクソン	TTGTTGAGAATTCCCTGGC	508
47.20.008		
Hu.DMD.エクソン	TCCAGTTCATTTAATTGTT	509
47.20.009		
Hu.DMD.エクソン	TACAAGCACGGGTCTCCAG	510
47.20.010		
Hu.DMD.エクソン	GCTTATGGGAGCACTTACAA	511
47.20.011		
Hu.DMD.エクソン	ATCTTGCTCTTCTGGGCTTA	512
47.20.012		
Hu.DMD.エクソン	CTTATTTCAAGTTATCTT	513
47.20.013		
Hu.DMD.エクソン	ATTGTCTGCTTGAGCTTAT	514
47.20.014		

10

20

30

40

【 0 4 2 6 】

【表 2 1 - 8】

Hu.DMD.エクソン 47.20.015	CTTTATCCACTGGAGATTTG	515
Hu.DMD.エクソン 47.20.016	CTAACCTTATCCACTGGAG	516
Hu.DMD.エクソン 47.20.017	AATGTCTAACCTTATCCAC	517
Hu.DMD.エクソン 47.20.018	TGGTTAATGTCTAACCTTA	518
Hu.DMD.エクソン 47.20.019	AGAGATGGTTAATGTCTAAC	519
Hu.DMD.エクソン 47.20.020	ACGGAAGAGATGGTTAATGT	520
Hu.DMD.エクソン 48.25.001	CTGAAAGGAAAATACATTTAAAAA	521
Hu.DMD.エクソン 48.25.002	CCTGAAAGGAAAATACATTTAAAAA	522
Hu.DMD.エクソン 48.25.002.2	GAAACCTGAAAGGAAAATACATTT	523
Hu.DMD.エクソン 48.25.003	GGAAACCTGAAAGGAAAATACATTT	524
Hu.DMD.エクソン 48.25.003.2	CTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATAC	525
Hu.DMD.エクソン 48.25.004	GCTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATA	526
Hu.DMD.エクソン 48.25.004.2	TAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGAA	527
Hu.DMD.エクソン 48.25.005	GTAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGAA	528
Hu.DMD.エクソン 48.25.005.2	TCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGAA	529
Hu.DMD.エクソン 48.25.006	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGA	530
Hu.DMD.エクソン 48.25.006.2	GTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAAC	531
Hu.DMD.エクソン 48.25.007	TGTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	532
Hu.DMD.エクソン 48.25.007.2	AATTTCCTTGTTCAGGTAAA	533
Hu.DMD.エクソン 48.25.008	TTTGAGCTTCAATTCTCCTTGT	534
Hu.DMD.エクソン 48.25.008	TTTTATTTGAGCTTCAATTCTCCT	535
Hu.DMD.エクソン 48.25.009	AAGCTGCCAAGGTCTTTATTG	536
Hu.DMD.エクソン 48.25.010	AGGTCTTCAAGCTTTCAAGCT	537
Hu.DMD.エクソン	TTCAAGCTTTCAAGCTGCCA	538

10

20

30

40

【 0 4 2 7 】

【表 2 1 - 9】

48.25.010.2		
Hu.DMD.エクソン 48.25.011	GATGATTAACTGCTCTCAAGGTC	539
Hu.DMD.エクソン 48.25.011.2	CTGCTCTCAAGGTCTCAAGCTT	540
Hu.DMD.エクソン 48.25.012	AGGAGATAACCACAGCAGCAGATGA	541
Hu.DMD.エクソン 48.25.012.2	CAGCAGATGATTAACTGCTCTCA	542
Hu.DMD.エクソン 48.25.013	ATTTCCAAGTGATTCTAATAGGAG	543
Hu.DMD.エクソン 48.25.014	CTTGGTTGGTTGGTTATAAATTTC	544
Hu.DMD.エクソン 48.25.014.2	CAACTGATTCTAATAGGAGATAAC	545
Hu.DMD.エクソン 48.25.015	CTTAACGTCAAATGGCCTTCTTGG	546
Hu.DMD.エクソン 48.25.015.2	TTGGTTATAAATTCCAAGTGATT	547
Hu.DMD.エクソン 48.25.016	CCTACCTTAACGTCAAATGGCCTT	548
Hu.DMD.エクソン 48.25.016.2	TCCTTCTTGGTTGGTTGGTTATAA	549
Hu.DMD.エクソン 48.25.017	AGTTCCCTACCTTAACGTCAAATGG	550
Hu.DMD.エクソン 48.25.018	CAAAAAGTCCCTACCTTAACGTCA	551
Hu.DMD.エクソン 48.25.019	TAAAGCAAAAGTCCCTACCTTAA	552
Hu.DMD.エクソン 48.25.020	ATATTAAAGCAAAAGTCCCTAC	553
Hu.DMD.エクソン 48.20.001	AGGAAAATACATTTAAAAAA	554
Hu.DMD.エクソン 48.20.002	AAGGAAAATACATTTAAAAAA	555
Hu.DMD.エクソン 48.20.003	CCTGAAAGGAAAATACATTT	556
Hu.DMD.エクソン 48.20.004	GGAAACCTGAAAGGAAAATA	557
Hu.DMD.エクソン 48.20.005	GCTCTGGAAACCTGAAAGGA	558
Hu.DMD.エクソン 48.20.006	GTAAAGCTCTGGAAACCTGA	559
Hu.DMD.エクソン 48.20.007	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	560
Hu.DMD.エクソン 48.20.008	AATTCTCCTTGTTCAG	561

【 0 4 2 8 】

10

20

30

40

50

【表 21-10】

Hu.DMD.エクソン 48.20.009	TTTTATTTGAGCTTCATTT	562
Hu.DMD.エクソン 48.20.010	AAGCTGCCAAGGTCTTTA	563
Hu.DMD.エクソン 48.20.011	TTCAAGCTTTTTCAAGCT	564
Hu.DMD.エクソン 48.20.012	CTGCTCTTCAAGGTCTCAA	565
Hu.DMD.エクソン 48.20.013	CAGCAGATGATTTAACTGCT	566
Hu.DMD.エクソン 48.20.014	AGGAGATAACCACAGCAGCA	567
Hu.DMD.エクソン 48.20.015	CAACTGATTCTTAATAGGAG	568
Hu.DMD.エクソン 48.20.016	TTGGTTATAAATTCCAAC	569
Hu.DMD.エクソン 48.20.017	TCCTCTTGGTTGGTTGGT	570
Hu.DMD.エクソン 48.20.018	CTTAACGTCAAATGGCCTT	571
Hu.DMD.エクソン 48.20.019	CCTACCTAACGTCAAATGG	572
Hu.DMD.エクソン 48.20.020	AGTTCCCTACCTAACGTCA	573
Hu.DMD.エクソン 48.20.021	CAAAAAGTCCCTACCTTAA	574
Hu.DMD.エクソン 48.20.022	TAAAGCAAAAGTTCCCTAC	575
Hu.DMD.エクソン 48.20.023	ATATTAAAGCAAAAGTTC	576
Hu.DMD.エクソン 49.25.001	CTGGGGAAAAGAACCCATATAGTGC	577
Hu.DMD.エクソン 49.25.002	TCCTGGGGAAAAGAACCCATATAGT	578
Hu.DMD.エクソン 49.25.002.2	GTTTCCTGGGGAAAAGAACCCATAT	579
Hu.DMD.エクソン 49.25.003	CAGTTCCTGGGGAAAAGAACCCAT	580
Hu.DMD.エクソン 49.25.003.2	TTTCAGTTCCTGGGGAAAAGAACCC	581
Hu.DMD.エクソン 49.25.004	TATTCAGTTCCTGGGGAAAAGAA	582
Hu.DMD.エクソン 49.25.004.2	TGCTATTCAGTTCCTGGGGAAAA	583
Hu.DMD.エクソン 49.25.005	ACTGCTATTCAGTTCCTGGGGAA	584
Hu.DMD.エクソン	TGAAGTCTATTCAGTTCCTGGG	585

10

20

30

40

【0429】

【表 21-11】

49.25.005.2		
Hu.DMD.エクソン 49.25.006	CTTGAAC TGCTATTCAGTTCCCTG	586
Hu.DMD.エクソン 49.25.006.2	TAGCTTGAAC TGCTATTCAGTTTC	587
Hu.DMD.エクソン 49.25.007	TTTAGCTTGAAC TGCTATTCAGTT	588
Hu.DMD.エクソン 49.25.008	TTCCACATCCGGTTGTTAGCTTGA	589
Hu.DMD.エクソン 49.25.009	TGCCCTTAGACAAAATCTCTCCA	590
Hu.DMD.エクソン 49.25.009.2	TTTAGACAAAATCTCTCCACATCC	591
Hu.DMD.エクソン 49.25.010	GTTTTCCTTGTACAAATGCTGCC	592
Hu.DMD.エクソン 49.25.010.2	GTACAAATGCTGCCCTTAGACAAA	593
Hu.DMD.エクソン 49.25.011	CTTCACTGGCTGAGTGGCTGGTTT	594
Hu.DMD.エクソン 49.25.011.2	GGCTGGTTTCCTTGTACAAATGC	595
Hu.DMD.エクソン 49.25.012	ATTACCTTCACTGGCTGAGTGGCTG	596
Hu.DMD.エクソン 49.25.013	GCTTCATTACCTTCACTGGCTGAGT	597
Hu.DMD.エクソン 49.25.014	AGGTTGCTTCATTACCTTCACTGGC	598
Hu.DMD.エクソン 49.25.015	GCTAGAGGTTGCTTCATTACCTCA	599
Hu.DMD.エクソン 49.25.016	ATATTGCTAGAGGTTGCTTCATTAC	600
Hu.DMD.エクソン 49.20.001	GAAAAGAACCCATATAGTGC	601
Hu.DMD.エクソン 49.20.002	GGGAAAAGAACCCATATAGT	602
Hu.DMD.エクソン 49.20.003	TCCTGGGGAAAAGAACCCAT	603
Hu.DMD.エクソン 49.20.004	CAGTTTCCTGGGGAAAAGAA	604
Hu.DMD.エクソン 49.20.005	TATTCAGTTCTGGGGAA	605
Hu.DMD.エクソン 49.20.006	ACTGCTATTCAGTTCCCTG	606
Hu.DMD.エクソン 49.20.007	CTTGAAC TGCTATTCAGTT	607
Hu.DMD.エクソン 49.20.008	TTTAGCTTGAAC TGCTATTT	608

10

20

30

40

【0430】

【表 21-12】

Hu.DMD.エクソン 49.20.009	TTCCACATCCGGTTGTTAG	609
Hu.DMD.エクソン 49.20.010	TTTAGACAAAATCTCTCCA	610
Hu.DMD.エクソン 49.20.011	GTACAAATGCTGCCCTTAG	611
Hu.DMD.エクソン 49.20.012	GGCTGGTTTTCCCTGTACA	612
Hu.DMD.エクソン 49.20.013	CTTCACTGGCTGAGTGGCTG	613
Hu.DMD.エクソン 49.20.014	ATTACCTTCACTGGCTGAGT	614
Hu.DMD.エクソン 49.20.015	GCTTCATTACCTTCACTGGC	615
Hu.DMD.エクソン 49.20.016	AGGTTGCTTCATTACCTTCA	616
Hu.DMD.エクソン 49.20.017	GCTAGAGGTTGCTTCATTAC	617
Hu.DMD.エクソン 49.20.018	ATATTGCTAGAGGTTGCTTC	618
Hu.DMD.エクソン 50.25.001	CTTTAACAGAAAAGCATAACATTA	619
Hu.DMD.エクソン 50.25.002	TCCTCTTAAACAGAAAAGCATAACAC	620
Hu.DMD.エクソン 50.25.002.2	TTCCTCTTAAACAGAAAAGCATAACA	621
Hu.DMD.エクソン 50.25.003	TAACTTCCCTTTAACAGAAAAGCA	622
Hu.DMD.エクソン 50.25.003.2	CTAACTTCCCTTTAACAGAAAAGC	623
Hu.DMD.エクソン 50.25.004	TCTTCTAACTTCCTCTAACAGAA	624
Hu.DMD.エクソン 50.25.004.2	ATCTTCTAACTTCCTCTAACAGA	625
Hu.DMD.エクソン 50.25.005	TCAGATCTTCTAACTTCCTCTTAA	626
Hu.DMD.エクソン 50.25.005.2	CTCAGATCTTCTAACTTCCTCTTAA	627
Hu.DMD.エクソン 50.25.006	AGAGCTCAGATCTTCTAACTTCCTC	628
Hu.DMD.エクソン 50.25.006.2 NG-08-0731	CAGAGCTCAGATCTTCTAACTTCCT	629
Hu.DMD.エクソン 50.25.007	CACTCAGAGCTCAGATCTTCTACT	630
Hu.DMD.エクソン 50.25.007.2	CCTTCCACTCAGAGCTCAGATCTTC	631

10

20

30

40

【0431】

【表 21-13】

Hu.DMD.エクソン 50.25.008	GTAAACGGTTACCGCCTCCACTC	632
Hu.DMD.エクソン 50.25.009	CTTGCCTCAGCTCTGAAGTAAA	633
Hu.DMD.エクソン 50.25.009.2	CCCTCAGCTCTGAAGTAAACGGTT	634
Hu.DMD.エクソン 50.25.010	CCAGGAGCTAGGTAGGCTGCTTG	635
Hu.DMD.エクソン 50.25.010.2	GGTCAGGCTGCTTGCCCTCAGCTC	636
Hu.DMD.エクソン 50.25.011	AGGCTCCAATAGTGGTCAGTCAGG	637
Hu.DMD.エクソン 50.25.011.2	TCAGTCCAGGAGCTAGGTAGGCTG	638
Hu.DMD.エクソン 50.25.012 AVI-5038	CTTACAGGCTCCAATAGTGGTCAGT	639
Hu.DMD.エクソン 50.25.013	GTATACTTACAGGCTCCAATAGTGG	640
Hu.DMD.エクソン 50.25.014	ATCCAGTATACTTACAGGCTCCAAT	641
Hu.DMD.エクソン 50.25.015 NG-08-0741	ATGGGATCCAGTATACTTACAGGCT	642
Hu.DMD.エクソン 50.25.016 NG-08-0742	AGAGAATGGGATCCAGTATACTTAC	643
Hu.DMD.エクソン 50.20.001	ACAGAAAAGCATACACATTA	644
Hu.DMD.エクソン 50.20.002	TTAACAGAAAAGCATACAC	645
Hu.DMD.エクソン 50.20.003	TCCTCTTAAACAGAAAAGCA	646
Hu.DMD.エクソン 50.20.004	TAACTTCCCTTTAACAGAA	647
Hu.DMD.エクソン 50.20.005	TCTTCTAACCTCCTCTTAA	648
Hu.DMD.エクソン 50.20.006	TCAGATCTCTAACCTCCTC	649
Hu.DMD.エクソン 50.20.007	CCTTCCACTCAGAGCTCAGA	650
Hu.DMD.エクソン 50.20.008	GTAAACGGTTACCGCCTTC	651
Hu.DMD.エクソン 50.20.009	CCCTCAGCTCTGAAGTAAA	652
Hu.DMD.エクソン 50.20.010	GGTCAGGCTGCTTGCCCTC	653

10

20

30

40

【0432】

【表 21-14】

Hu.DMD.エクソン 50.20.011	TCAGTCCAGGAGCTAGGTCA	654
Hu.DMD.エクソン 50.20.012	AGGCTCCAATAGTGGTCAGT	655
Hu.DMD.エクソン 50.20.013	CTTACAGGCTCCAATAGTGG	656
Hu.DMD.エクソン 50.20.014	GTATACTTACAGGCTCCAAT	657
Hu.DMD.エクソン 50.20.015	ATCCAGTATACTTACAGGCT	658
Hu.DMD.エクソン 50.20.016	ATGGGATCCAGTATACTTAC	659
Hu.DMD.エクソン 50.20.017	AGAGAATGGGATCCAGTATA	660
Hu.DMD.エクソン 51.25.001-44	CTAAAATATTTGGGTTTTGCAAAA	661
Hu.DMD.エクソン 51.25.002-45	GCTAAAATATTTGGGTTTTGCAAA	662
Hu.DMD.エクソン 51.25.002.2-46	TAGGAGCTAAAATATTTGGGTTTT	663
Hu.DMD.エクソン 51.25.003	AGTAGGAGCTAAAATATTTGGGTT	664
Hu.DMD.エクソン 51.25.003.2	TGAGTAGGAGCTAAAATATTTGGG	665
Hu.DMD.エクソン 51.25.004	CTGAGTAGGAGCTAAAATATTTGGG	666
Hu.DMD.エクソン 51.25.004.2	CAGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATT	667
Hu.DMD.エクソン 51.25.005	ACAGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATT	668
Hu.DMD.エクソン 51.25.005.2	GAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCTAA	669
Hu.DMD.エクソン 51.25.006	CAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCT	670
Hu.DMD.エクソン 51.25.006.2	CACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG	671
Hu.DMD.エクソン 51.25.007	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAG	672
Hu.DMD.エクソン 51.25.007.2	AACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTAA	673
Hu.DMD.エクソン 51.25.008	GTTGTGTCACCAGAGTAACAGTCTG	674
Hu.DMD.エクソン 51.25.009	TGGCAGTTCCCTAGTAACCACAGGT	675
Hu.DMD.エクソン 51.25.010	ATTCTAGTTGGAGATGGCAGTTTC	676
Hu.DMD.エクソン	GGAAGATGGCATTCTAGTTGGAG	677

10

20

30

40

【0433】

【表 21-15】

51.25.010.2		
Hu.DMD.エクソン 51.25.011	CATCAAGGAAGATGGCATTCTAGTT	678
Hu.DMD.エクソン 51.25.011.2	GAGCAGGTACCTCCAACATCAAGGAA	679
Hu.DMD.エクソン 51.25.012	ATCTGCCAGAGCAGGTACCTCCAAC	680
Hu.DMD.エクソン 51.25.013	AAGTTCTGTCCAAGCCCGTTGAAAT	681
Hu.DMD.エクソン 51.25.013.2	CGGTTGAAATCTGCCAGAGCAGGTAC	682
Hu.DMD.エクソン 51.25.014	GAGAAAGCCAGTCGGTAAGTTCTGTC	683
Hu.DMD.エクソン 51.25.014.2	GTCGGTAAGTTCTGTCCAAGCCCGG	684
Hu.DMD.エクソン 51.25.015	ATAACTTGATCAAGCAGAGAAAGCCA	685
Hu.DMD.エクソン 51.25.015.2	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGGTAAGT	686
Hu.DMD.エクソン 51.25.016	CACCCCTCTGTGATTTATAACTTGAT	687
Hu.DMD.エクソン 51.25.017	CAAGGTACCCACCATCACCCCTCTGT	688
Hu.DMD.エクソン 51.25.017.2	CATCACCCCTCTGTGATTTATAACT	689
Hu.DMD.エクソン 51.25.018	CTTCTGCTTGATGATCATCTCGTTGA	690
Hu.DMD.エクソン 51.25.019	CCTTCTGCTTGATGATCATCTCGTG	691
Hu.DMD.エクソン 51.25.019.2	ATCTCGTTGATATCCTCAAGGTCAACC	692
Hu.DMD.エクソン 51.25.020	TCATACCTCTGCTTGATGATCATCT	693
Hu.DMD.エクソン 51.25.020.2	TCATTTTTCTCATACCTCTGCTTG	694
Hu.DMD.エクソン 51.25.021	TTTCTCATACCTCTGCTTGATGAT	695
Hu.DMD.エクソン 51.25.022	TTTATCATTTCTCATACCTCT	696
Hu.DMD.エクソン 51.25.023	CCAACCTTATCATTCTCATAC	697
Hu.DMD.エクソン 51.20.001	ATATTTGGGTTTTGCAAA	698
Hu.DMD.エクソン 51.20.002	AAAATATTTGGGTTTTGC	699
Hu.DMD.エクソン 51.20.003	GAGCTAAAATATTTGGGTT	700

10

20

30

40

【0434】

【表 21-16】

Hu.DMD.エクソン 51.20.004	AGTAGGAGCTAAAATATT	701
Hu.DMD.エクソン 51.20.005	GTCTGAGTAGGAGCTAAA	702
Hu.DMD.エクソン 51.20.006	TAACAGTCTGAGTAGGAGC	703
Hu.DMD.エクソン 51.20.007	CAGAGTAACAGTCTGAGTA	704
Hu.DMD.エクソン 51.20.008	CACAGGTTGTGTCACCAGA	705
Hu.DMD.エクソン 51.20.009	AGTTTCCTTAGTAACCACAG	706
Hu.DMD.エクソン 51.20.010	TAGTTGGAGATGGCAGTT	707
Hu.DMD.エクソン 51.20.011	GGAAGATGGCATTCTAGTT	708
Hu.DMD.エクソン 51.20.012	TACCTCCAACATCAAGGAAG	709
Hu.DMD.エクソン 51.20.013	ATCTGCCAGAGCAGGTACCT	710
Hu.DMD.エクソン 51.20.014	CCAAGCCCGGTTGAAATCTG	711
Hu.DMD.エクソン 51.20.015	GTCGGTAAGTTCTGTCCAAG	712
Hu.DMD.エクソン 51.20.016	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGG	713
Hu.DMD.エクソン 51.20.017	TTTTATAACTTGATCAAGCA	714
Hu.DMD.エクソン 51.20.018	CATCACCCCTGTGATTTTA	715
Hu.DMD.エクソン 51.20.019	CTCAAGGTACCCACCATCA	716
Hu.DMD.エクソン 51.20.020	CATCTCGTTGATATCCTCAA	717
Hu.DMD.エクソン 51.20.021	CTTCTGCTTGATGATCATCT	718
Hu.DMD.エクソン 51.20.022	CATACCTCTGCTTGATGAT	719
Hu.DMD.エクソン 51.20.023	TTTCTCATACCTCTGCTTG	720
Hu.DMD.エクソン 51.20.024	CATTTTTCTCATACCTTCT	721
Hu.DMD.エクソン 51.20.025	TTTATCATTTTCTCATAC	722
Hu.DMD.エクソン 51.20.026	CAACTTTATCATTCTTCT	723
Hu.DMD.エクソン	CTGTAAGAACAAATATCCCTAGTA	724

10

20

30

40

【0435】

【表 21-17】

52.25.001		
Hu.DMD.エクソン	TGCCTGTAAGAACAAATATCCCTTA	725
52.25.002		
Hu.DMD.エクソン	GTTGCCTGTAAGAACAAATATCCCT	726
52.25.002.2		
Hu.DMD.エクソン	ATTGTTGCCTGTAAGAACAAATATC	727
52.25.003		
Hu.DMD.エクソン	GCATTGTTGCCTGTAAGAACAAATA	728
52.25.003.2		
Hu.DMD.エクソン	CCTGCATTGTTGCCTGTAAGAACAA	729
52.25.004		
Hu.DMD.エクソン	ATCCTGCATTGTTGCCTGTAAGAAC	730
52.25.004.2		
Hu.DMD.エクソン	CAAATCCTGCATTGTTGCCTGTAAG	731
52.25.005		
Hu.DMD.エクソン	TCCAAATCCTGCATTGTTGCCTGTA	732
52.25.005.2		
Hu.DMD.エクソン	TGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCCT	733
52.25.006		
Hu.DMD.エクソン	TCTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGC	734
52.25.006.2		
Hu.DMD.エクソン	AACTGGGGACGCCTCTGTTCAAAT	735
52.25.007		
Hu.DMD.エクソン	GCCTCTGTTCCAAATCCTGCATTGT	736
52.25.007.2		
Hu.DMD.エクソン	CAGCGGTAATGAGTTCTTCAAATG	737
52.25.008		
Hu.DMD.エクソン	CTTCCAACGGGGACGCCTCTGTC	738
52.25.008.2		
Hu.DMD.エクソン	CTTGTGTTCAAATTGGGCAGCG	739
52.25.009		
Hu.DMD.エクソン	CTAGCCTCTGATTGCTGGTCTTGT	740
52.25.010		
Hu.DMD.エクソン	TTTCAAATTGGGCAGCGTAAT	741
52.25.010.2		
Hu.DMD.エクソン	TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGC	742
52.25.011		
Hu.DMD.エクソン	GATTGCTGGCTTGTTCAAATT	743
52.25.011.2		
Hu.DMD.エクソン	CTTACTTCGATCCGTAATGATTGTT	744
52.25.012		
Hu.DMD.エクソン	TTGTTCTAGCCTCTGATTGCTGGT	745
52.25.012.2		
Hu.DMD.エクソン	AAAAACTTACTTCGATCCGTAATGA	746
52.25.013		
Hu.DMD.エクソン	TGTTAAAAAAACTTACTTCGATCCGT	747
52.25.014		

10

20

30

40

【0436】

【表 21-18】

Hu.DMD.エクソン 52.25.015	ATGCTTGTAAAAACTTACTTCGA	748
Hu.DMD.エクソン 52.25.016	GTCCCAGCTTGTAAAAACTTAC	749
Hu.DMD.エクソン 52.20.001	AGAACAAATATCCCTAGTA	750
Hu.DMD.エクソン 52.20.002	GTAAGAACAAATATCCCTTA	751
Hu.DMD.エクソン 52.20.003	TGCCTGTAAGAACAAATATC	752
Hu.DMD.エクソン 52.20.004	ATTGTTGCCTGTAAGAACAA	753
Hu.DMD.エクソン 52.20.005	CCTGCATTGTTGCCTGTAAG	754
Hu.DMD.エクソン 52.20.006	CAAATCCTGCATTGTTGCCT	755
Hu.DMD.エクソン 52.20.007	GCCTCTGTTCAAATCCTGC	756
Hu.DMD.エクソン 52.20.008	CTTCCAAGTGGGACGCCCTC	757
Hu.DMD.エクソン 52.20.009	CAGCGGTAATGAGTTCTTCC	758
Hu.DMD.エクソン 52.20.010	TTTCAAATTTGGCAGCG	759
Hu.DMD.エクソン 52.20.011	GATTGCTGGTCTTGTTC	760
Hu.DMD.エクソン 52.20.012	TTGTTCTAGCCTTTGATTG	761
Hu.DMD.エクソン 52.20.013	TTCGATCCGTAATGATTGTT	762
Hu.DMD.エクソン 52.20.014	CTTACTTCGATCCGTAATGA	763
Hu.DMD.エクソン 52.20.015	AAAAACTTACTTCGATCCGT	764
Hu.DMD.エクソン 52.20.016	TGTTAAAAACTTACTTCGA	765
Hu.DMD.エクソン 52.20.017	ATGCTTGTAAAAACTTAC	766
Hu.DMD.エクソン 52.20.018	GTCCCAGCTTGTAAAAAA	767
Hu.DMD.エクソン 53.25.001	CTAGAATAAAAGGAAAAATAAAT	768
Hu.DMD.エクソン 53.25.002	AACTAGAATAAAAGGAAAAATAAAT	769
Hu.DMD.エクソン 53.25.002.2	TTCAACTAGAATAAAAGGAAAAATA	770
Hu.DMD.エクソン	CTTTCAACTAGAATAAAAGGAAAAAA	771

10

20

30

40

【0437】

【表 21-19】

53.25.003		
Hu.DMD.エクソン 53.25.003.2	ATTCTTCAACTAGAATAAAAGGAA	772
Hu.DMD.エクソン 53.25.004	GAATTCTTCAACTAGAATAAAAGG	773
Hu.DMD.エクソン 53.25.004.2	TCTGAATTCTTCAACTAGAATAAA	774
Hu.DMD.エクソン 53.25.005	ATTCTGAATTCTTCAACTAGAATA	775
Hu.DMD.エクソン 53.25.005.2	CTGATTCTGAATTCTTCAACTAGA	776
Hu.DMD.エクソン 53.25.006	CACTGATTCTGAATTCTTCAACTA	777
Hu.DMD.エクソン 53.25.006.2	TCCCAC TGATTCTGAATTCTTCAA	778
Hu.DMD.エクソン 53.25.007	CATCCCAC TGATTCTGAATTCTTC	779
Hu.DMD.エクソン 53.25.008	TACTCATCCACTGATTCTGAATT	780
Hu.DMD.エクソン 53.25.008.2	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	781
Hu.DMD.エクソン 53.25.009	CGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACT	782
Hu.DMD.エクソン 53.25.009.2	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGT	783
Hu.DMD.エクソン 53.25.010	TTTCATTCAACTGTTGCCTCCGGTT	784
Hu.DMD.エクソン 53.25.010.2	TAACATTCATTCAACTGTTGCCTC	785
Hu.DMD.エクソン 53.25.011	TTGTGTTGAATCCTTAACATTCA	786
Hu.DMD.エクソン 53.25.012	TCTTCCTTAGCTCCAGCCATTGTG	787
Hu.DMD.エクソン 53.25.012.2	CTTAGCTCCAGCCATTGTGTTGAA	788
Hu.DMD.エクソン 53.25.013	GTCCTAAGACCTGCTCAGCTTCTC	789
Hu.DMD.エクソン 53.25.013.2	CTGCTCAGCTTCTCCTTAGCTTC	790
Hu.DMD.エクソン 53.25.014	CTCAAGCTTGGCTCTGGCCTGTCCT	791
Hu.DMD.エクソン 53.25.014.2	GGCCTGTCCTAAGACCTGCTCAGCT	792
Hu.DMD.エクソン 53.25.015	TAGGGACCCCTCCTCCATGACTCAA	793
Hu.DMD.エクソン 53.25.016	TTTGGATTGCATCTACTGTATAAGGG	794

10

20

30

40

【0438】

【表 21 - 20】

Hu.DMD.エクソン 53.25.016.2	ACCCCTCCTCCATGACTCAAGCTTG	795
Hu.DMD.エクソン 53.25.017	CTTGGTTCTGTGATTTCTTTGG	796
Hu.DMD.エクソン 53.25.017.2	ATCTACTGTATAGGGACCCTCCTC	797
Hu.DMD.エクソン 53.25.018	CTAACCTGGTTCTGTGATTTCT	798
Hu.DMD.エクソン 53.25.018.2	TTTCTTTGGATTGCATCTACTGTA	799
Hu.DMD.エクソン 53.25.019	TGATACTAACCTGGTTCTGTGAT	800
Hu.DMD.エクソン 53.25.020	ATCTTGATACTAACCTGGTTCT	801
Hu.DMD.エクソン 53.25.021	AAGGTATCTTGATACTAACCTGG	802
Hu.DMD.エクソン 53.25.022	TTAAAAAGGTATCTTGATACTAAC	803
Hu.DMD.エクソン 53.20.001	ATAAAAGGAAAAATAAATAT	804
Hu.DMD.エクソン 53.20.002	GAATAAAAGGAAAAATAAAT	805
Hu.DMD.エクソン 53.20.003	AACTAGAATAAAAGGAAAAAA	806
Hu.DMD.エクソン 53.20.004	CTTTCAACTAGAATAAAAGG	807
Hu.DMD.エクソン 53.20.005	GAATTCTTCAACTAGAATA	808
Hu.DMD.エクソン 53.20.006	ATTCTGAATTCTTCAACTA	809
Hu.DMD.エクソン 53.20.007	TACTTCATCCCACTGATTCT	810
Hu.DMD.エクソン 53.20.008	CTGAAGGTGTTCTGTACT	811
Hu.DMD.エクソン 53.20.009	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAA	812
Hu.DMD.エクソン 53.20.010	TAACATTTCATTCAACTGTT	813
Hu.DMD.エクソン 53.20.011	TTGTGTTGAATCCTTAACA	814
Hu.DMD.エクソン 53.20.012	CTTAGCTTCCAGCCATTGTG	815
Hu.DMD.エクソン 53.20.013	CTGCTCAGCTTCTCCTTAG	816
Hu.DMD.エクソン 53.20.014	GGCCTGTCCTAAGACCTGCT	817
Hu.DMD.エクソン	CTCAAGCTTGGCTCTGGCCT	818

10

20

30

40

【0439】

【表 21 - 21】

53.20.015		
Hu.DMD.エクソン	ACCCCTCCTCCATGACTCAA	819
53.20.016		
Hu.DMD.エクソン	ATCTACTGTATAGGGACCC	820
53.20.017		
Hu.DMD.エクソン	TTTCTTTGGATTGCATCTA	821
53.20.018		
Hu.DMD.エクソン	CTTGGTTCTGTGATTTCT	822
53.20.019		
Hu.DMD.エクソン	CTAACCTGGTTCTGTGAT	823
53.20.020		
Hu.DMD.エクソン	TGATACTAACCTGGTTCT	824
53.20.021		
Hu.DMD.エクソン	ATCTTGATACTAACCTGG	825
53.20.022		
Hu.DMD.エクソン	AAGGTATCTTGATACTAAC	826
53.20.023		
Hu.DMD.エクソン	TTAAAAAGGTATCTTGATA	827
53.20.024		
Hu.DMD.エクソン	CTATAGATTTTATGAGAAAGAGA	828
54.25.001		
Hu.DMD.エクソン	AACTGCTATAGATTTTATGAGAAA	829
54.25.002		
Hu.DMD.エクソン	TGGCCAAGTGTATAGATTTTATG	830
54.25.003		
Hu.DMD.エクソン	GTCTTGCCAACTGCTATAGATT	831
54.25.004		
Hu.DMD.エクソン	CGGAGGTCTTGGCCAACTGCTATA	832
54.25.005		
Hu.DMD.エクソン	ACTGGCGGAGGTCTTGGCCAACTG	833
54.25.006		
Hu.DMD.エクソン	TTTGTCTGCCACTGGCGGAGGTCTT	834
54.25.007		
Hu.DMD.エクソン	AGTCATTTGCCACATCTACATTGT	835
54.25.008		
Hu.DMD.エクソン	TTTGCCACATCTACATTGTCTGCC	836
54.25.008.2		
Hu.DMD.エクソン	CCGGAGAAGTTCAGGGCCAAGTCA	837
54.25.009		
Hu.DMD.エクソン	GTATCATCTGCAGAATAATCCCGGA	838
54.25.010		
Hu.DMD.エクソン	TAATCCCGGAGAAGTTCAGGGCCA	839
54.25.010.2		
Hu.DMD.エクソン	TTATCATGTGGACTTTCTGGTATC	840
54.25.011		
Hu.DMD.エクソン	AGAGGCATTGATATTCTCTGTTATC	841
54.25.012		

10

20

30

40

【0440】

【表 21 - 22】

Hu.DMD.エクソン 54.25.012.2	ATGTGGACTTTCTGGTATCATCTG	842
Hu.DMD.エクソン 54.25.013	CTTTTATGAATGCTTCTCCAAGAGG	843
Hu.DMD.エクソン 54.25.013.2	ATATTCTCTGTTATCATGTGGACTT	844
Hu.DMD.エクソン 54.25.014	CATACCTTTATGAATGCTTCTCCA	845
Hu.DMD.エクソン 54.25.014.2	CTCCAAGAGGCATTGATATTCTCTG	846
Hu.DMD.エクソン 54.25.015	TAATTCAACCTTTATGAATGCTT	847
Hu.DMD.エクソン 54.25.015.2	CTTTTATGAATGCTTCTCCAAGAGG	848
Hu.DMD.エクソン 54.25.016	TAATGTAATTCAACCTTTATGAA	849
Hu.DMD.エクソン 54.25.017	AGAAATAATGTAATTCAACCTTT	850
Hu.DMD.エクソン 54.25.018	GTTTAGAAATAATGTAATTCAAC	851
Hu.DMD.エクソン 54.20.001	GATTTTATGAGAAAGAGA	852
Hu.DMD.エクソン 54.20.002	CTATAGATTTTATGAGAAA	853
Hu.DMD.エクソン 54.20.003	AACTGCTATAGATTTTATG	854
Hu.DMD.エクソン 54.20.004	TGGCCAAGTGTATAGATT	855
Hu.DMD.エクソン 54.20.005	GTCTTGGCCAAGTGTATA	856
Hu.DMD.エクソン 54.20.006	CGGAGGTCTTGGCCAAGT	857
Hu.DMD.エクソン 54.20.007	TTTGTCTGCCACTGGCGGAG	858
Hu.DMD.エクソン 54.20.008	TTTGCCACATCTACATTGT	859
Hu.DMD.エクソン 54.20.009	TTCAGGGCCAAGTCATTGC	860
Hu.DMD.エクソン 54.20.010	TAATCCGGAGAAGTTTCAG	861
Hu.DMD.エクソン 54.20.011	GTATCATCTGCAGAATAATC	862
Hu.DMD.エクソン 54.20.012	ATGTGGACTTTCTGGTATC	863
Hu.DMD.エクソン 54.20.013	ATATTCTCTGTTATCATGTG	864
Hu.DMD.エクソン	CTCCAAGAGGCATTGATATT	865

10

20

30

40

【0441】

【表 21 - 23】

54.20.014		
Hu.DMD.エクソン	CTTTTATGAATGCTTCTCCA	866
54.20.015		
Hu.DMD.エクソン	CATACCTTTATGAATGCTT	867
54.20.016		
Hu.DMD.エクソン	TAATTACATACCTTTATGAA	868
54.20.017		
Hu.DMD.エクソン	TAATGTAATTACATACCTTT	869
54.20.018		
Hu.DMD.エクソン	AGAAATAATGTAATTACATAC	870
54.20.019		
Hu.DMD.エクソン	GTTTTAGAAATAATGTAATT	871
54.20.020		
Hu.DMD.エクソン	CTGCAAAGGACCAAATGTTCAGATG	872
55.25.001		
Hu.DMD.エクソン	TCACCCCTGCAAAGGACCAAATGTTC	873
55.25.002		
Hu.DMD.エクソン	CTCACTCACCTGCAAAGGACCAA	874
55.25.003		
Hu.DMD.エクソン	TCTCGCTCACTCACCTGCAAAGGA	875
55.25.004		
Hu.DMD.エクソン	CAGCCTCTCGCTCACTCACCTGCA	876
55.25.005		
Hu.DMD.エクソン	CAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC	877
55.25.006		
Hu.DMD.エクソン	TCTTCAAAGCAGCCTCTCGCTCAC	878
55.25.007		
Hu.DMD.エクソン	TCTATGAGTTCTTCAAAGCAGCC	879
55.25.007.2		
Hu.DMD.エクソン	GTTCAGTAATCTATGAGTTCTTC	880
55.25.008		
Hu.DMD.エクソン	GAACGTTCAGTAATCTATGAGTT	881
55.25.008.2		
Hu.DMD.エクソン	TTCCAGGTCCAGGGGGAACTGTTGC	882
55.25.009		
Hu.DMD.エクソン	GTAAGCCAGGCAAGAACTTTCCA	883
55.25.010		
Hu.DMD.エクソン	CCAGGCAAGAAACTTTCCAGGTCC	884
55.25.010.2		
Hu.DMD.エクソン	TGGCAGTTGTTCAGCTCTGTAAG	885
55.25.011		
Hu.DMD.エクソン	TTCAGCTCTGTAAGCCAGGCAAGA	886
55.25.011.2		
Hu.DMD.エクソン	GGTAGCATCCTGTAGGACATTGGCA	887
55.25.012		
Hu.DMD.エクソン	GACATTGGCAGTTGTTCAGCTTCT	888
55.25.012.2		

10

20

30

40

【0442】

【表 21 - 24】

Hu.DMD.エクソン 55.25.013	TCTAGGAGCCTTCCTTACGGGTAG	889
Hu.DMD.エクソン 55.25.014	CTTTTACTCCCTGGAGTCTTCTAG	890
Hu.DMD.エクソン 55.25.014.2	GAGCCTTCCTTACGGGTAGCATCC	891
Hu.DMD.エクソン 55.25.015	TTGCCATTGTTCATCAGCTTTT	892
Hu.DMD.エクソン 55.25.015.2	CTTGGAGTCTCTAGGAGCCTTCC	893
Hu.DMD.エクソン 55.25.016	CTTACTTGCCATTGTTCATCAGCT	894
Hu.DMD.エクソン 55.25.016.2	CAGCTCTTACTCCCTGGAGTCT	895
Hu.DMD.エクソン 55.25.017	CCTGACTTACTGCCATTGTTCAT	896
Hu.DMD.エクソン 55.25.018	AAATGCCTGACTTACTGCCATTGT	897
Hu.DMD.エクソン 55.25.019	AGCGGAAATGCCTGACTTACTGCC	898
Hu.DMD.エクソン 55.25.020	GCTAAAGCGGAAATGCCTGACTTAC	899
Hu.DMD.エクソン 55.20.001	AAGGACCAAATGTTAGATG	900
Hu.DMD.エクソン 55.20.002	CTGCAAAGGACCAAATGTTC	901
Hu.DMD.エクソン 55.20.003	TCACCCTGCAAAGGACCAA	902
Hu.DMD.エクソン 55.20.004	CTCACTCACCCGTCAAAGGA	903
Hu.DMD.エクソン 55.20.005	TCTCGCTCACTCACCCGTCA	904
Hu.DMD.エクソン 55.20.006	CAGCCTCTCGCTCACTCACC	905
Hu.DMD.エクソン 55.20.007	CAAAGCAGCCTCTCGCTCAC	906
Hu.DMD.エクソン 55.20.008	TCTATGAGTTCTTCAAAG	907
Hu.DMD.エクソン 55.20.009	GAACCTGTTGCAGTAATCTAT	908
Hu.DMD.エクソン 55.20.010	TTCCAGGTCCAGGGGGAACT	909
Hu.DMD.エクソン 55.20.011	CCAGGCAAGAAACTTTCCA	910
Hu.DMD.エクソン 55.20.012	TTCAGCTTCTGTAAGCCAGG	911
Hu.DMD.エクソン	GACATTGGCAGTTGTTCAAG	912

10

20

30

40

【0443】

【表 21 - 25】

55.20.013		
Hu.DMD.エクソン 55.20.014	GGTAGCATCCTGTAGGACAT	913
Hu.DMD.エクソン 55.20.015	GAGCCTTCCTTACGGGTAG	914
Hu.DMD.エクソン 55.20.016	CTTGGAGTCTCTAGGAGCC	915
Hu.DMD.エクソン 55.20.017	CAGCTTTTACTCCCTTGG	916
Hu.DMD.エクソン 55.20.018	TTGCCATTGTTCATCAGCT	917
Hu.DMD.エクソン 55.20.019	CTTACTTGCCATTGTTCAT	918
Hu.DMD.エクソン 55.20.020	CCTGACTTACTGCCATTGT	919
Hu.DMD.エクソン 55.20.021	AAATGCCTGACTTACTTGCC	920
Hu.DMD.エクソン 55.20.022	AGCGGAAATGCCTGACTTAC	921
Hu.DMD.エクソン 55.20.023	GCTAAAGCGGAAATGCCTGA	922
H50A(+02+30)-AVI-5656	CCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAACCTCC	923
H50D(+07-18)-AVI-5915	GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	924
H50A(+07+33)	CTTCCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAA	925
H51A(+61+90)-AVI-4657	ACATCAAGGAAGATGGCATTCTAGTTGG	926
H51A(+66+95)-AVI-4658	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	927
H51A(+111+134)	TTCTGTCCAAGGCCGGTTGAAATC	928
H51A(+175+195)	CACCCACCATCACCCCTCYGTG	929
H51A(+199+220)	ATCATCTCGTTGATATCCTCAA	930
H51A(+66+90)	ACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	931
H51A(-01+25)	ACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGC	932
h51AON1	TCAAGGAAGATGGCATTCT	933
h51AON2	CCTCTGTGATTTATAACTTGAT	934
H51D(+08-17)	ATCATTCTCTCATACCTCTGCT	935
H51D(+16-07)	CTCATACCTCTGCTTGATGATC	936
hAON#23	TGGCATTCTAGTTGG	937
hAON#24	CCAGAGCAGGTACCTCAAACATC	938
H44A(+61+84)	TGTTCAGCTCTGTTAGCCACTGA	939
H44A(+85+104)	TTTGTGTCTTCTGAGAAC	940
h44AON1	CGCCGCCATTCTAACAG	941
H44A(-06+14)	ATCTGTCAAATCGCCTGCAG	942
H45A(+71+90)	TGTTTTGAGGATTGCTGAA	943
h45AON1	GCTGAATTATTCTCCCC	944
h45AON5	GCCCAATGCCATCCTGG	945
H45A(-06+20)	CCAATGCCATCCTGGAGTTCTGTAA	946
H53A(+39+69)	CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTG	947

10

20

30

40

【0444】

【表 21 - 26】

H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	948
h53AON1	CTGTTGCCTCCGGTCTG	949
H53A(-12+10)	ATTCTTCAACTAGAATAAAAG	950
huEx45.30.66	GCCATCCTGGAGTCCTGTAAGATACCAAA	951
huEx45.30.71	CCAATGCCATCCTGGAGTTCTGTAAGATA	952
huEx45.30.79	GCCGCTGCCAATGCCATCCTGGAGTCCT	953
huEx45.30.83	GTTCGCCGCTGCCAATGCCATCCTGGAGT	954
huEx45.30.88	CAACAGTTGCCGCTGCCAATGCCATCCT	955
huEx45.30.92	CTGACAAACAGTTGCCGCTGCCAATGCCA	956
huEx45.30.96	TGTTCTGACAACAGTTGCCGCTGCCAAT	957
huEx45.30.99	CAATGTTCTGACAACAGTTGCCGCTGCC	958
huEx45.30.103	CATTCAATGTTCTGACAACAGTTGCCGCT	959
huEx45.30.120	TATTTCTTCCCCAGTTGCATTCAATGTTCT	960
huEx45.30.127	GCTGAATTATTCTTCCCCAGTTGCATTCA	961
huEx45.30.132	GGATTGCTGAATTATTCTTCCCCAGTTGC	962
huEx45.30.137	TTTGAGGATTGCTGAATTATTCTTCCCCA	963
huEx53.30.84	GTACTTCATCCCACTGATTCTGAATTCTT	964
huEx53.30.88	TCTTGACTTCATCCCACTGATTCTGAATT	965
huEx53.30.91	TGTTCTGTACTTCATCCCACTGATTCTGA	966
huEx53.30.103	CGGTTCTGAAGGTGTTCTGTACTTCATCC	967
huEx53.30.106	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTGTACTTC	968
huEx53.30.109	TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTGTACT	969
huEx53.30.112	TGTTGCCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTGT	970
huEx53.30.115	AACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCT	971
huEx53.30.118	TTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGT	972

10

20

30

## 【0445】

工程1：マレイミド - PEG - NHSによる、その後、siRNA - DMD抱合体による抗体共役

## 【0446】

抗ジストロフィン抗体は1Xリン酸緩衝液(pH7.4)と交換され、最大で5mg/mlの濃度にされた。この溶液に、2当量のSMCCリンカーあるいはマレイミド - PEG x kDa - NHS(x=1、5、10、20)を加え、室温で4時間回転させる。未反応のマレイミド - PEGを、50kDa MWCO Amiconスピンドルターより PBS pH7.4を使用する回転濾過によって除去した。抗体 - PEGマ1抱合体を集めて、反応容器に移した。様々なsiRNA抱合体が表13-17に列挙された配列を使用して合成される。siRNA - DMD抱合体(2当量)をPBS中の抗体 - PEGマレイミドへ室温で加え、夜通し回転させた。反応混合物を分析的SAXカラムクロマトグラフィーによって分析して、未反応の抗体およびsiRNAと共に抱合体が見える。

40

## 【0447】

工程2：精製

## 【0448】

粗製反応混合物を、陰イオン交換クロマトグラフィーを使用するAKTA express rer FPLCによって精製した。抗体 - PEG - DMD抱合体を含む画分をプールし、濃縮し、PBS(pH7.4)と緩衝液交換した。SMCCリンカー、PEG1kDa

50

、PEG5kDa、およびPEG10kDaを含む抗体siRNA抱合体を、siRNA負荷に基づいて分離される。

【0449】

工程3：精製された抱合体の分析

【0450】

単離させた抱合体を、質量スペクトルまたはSDS-PAGEのいずれかによって特徴付けた。抱合体の純度を、陰イオン交換クロマトグラフィ-を使用して分析的HPLCによって評価した。

【0451】

本明細書に記載される実施例と実施形態は説明の目的のものに過ぎず、当業者に示唆される様々な修飾や変化は、本明細書の精神と範囲、および添付の請求項の範囲内に含まれるものとする。

10

20

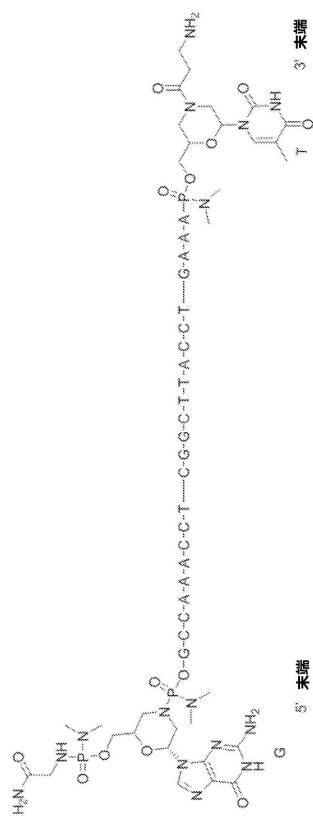
30

40

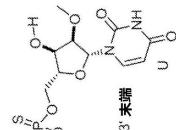
50

## 【図面】

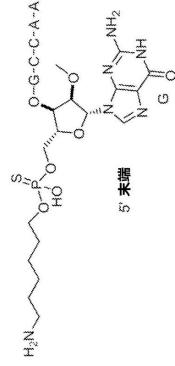
## 【図 1】



【 図 2 A 】

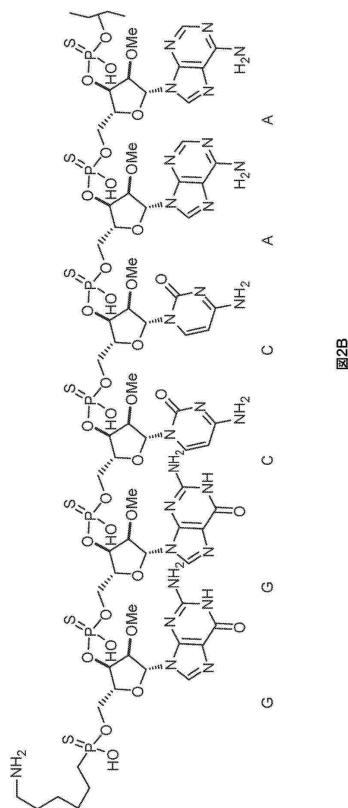


2A



10

【図2B-1】



### 【図2B-2】

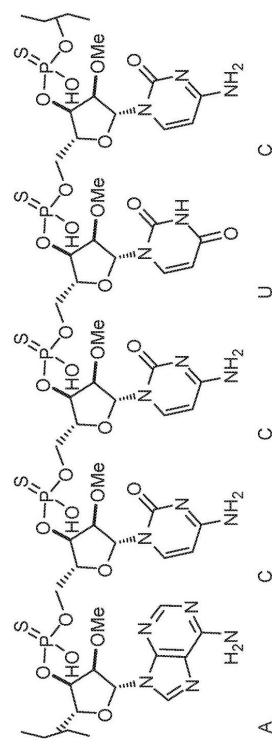


図2B(続き1)

30

40

50

【図 2 B - 3】

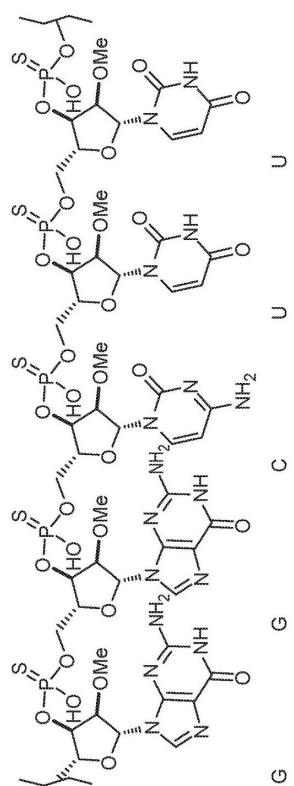


図2B(続き2)

【図 2 B - 4】

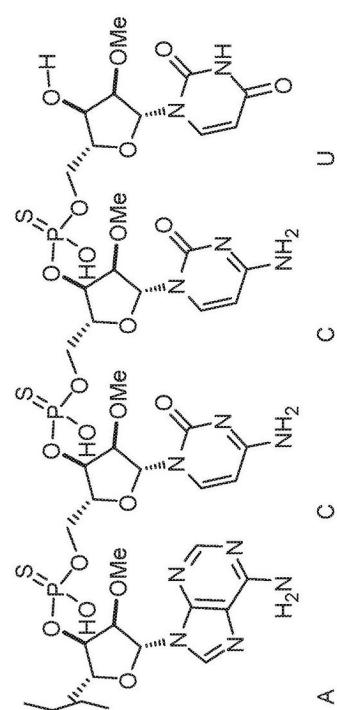
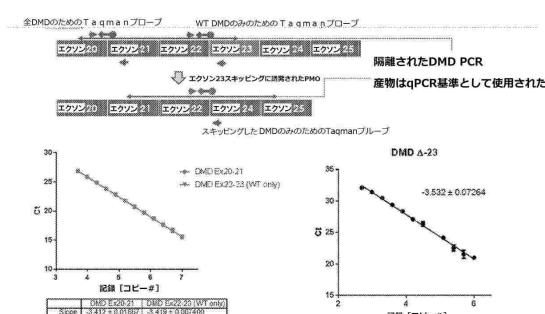


図2B(続き3)

【図 3】



【図 4】

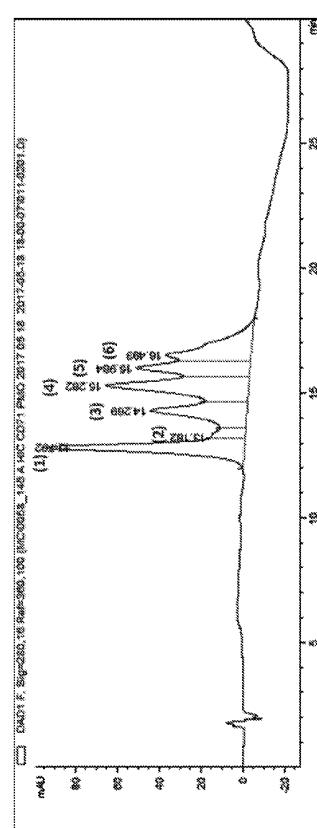


Fig. 4

10

20

30

40

50

【図 5 A】

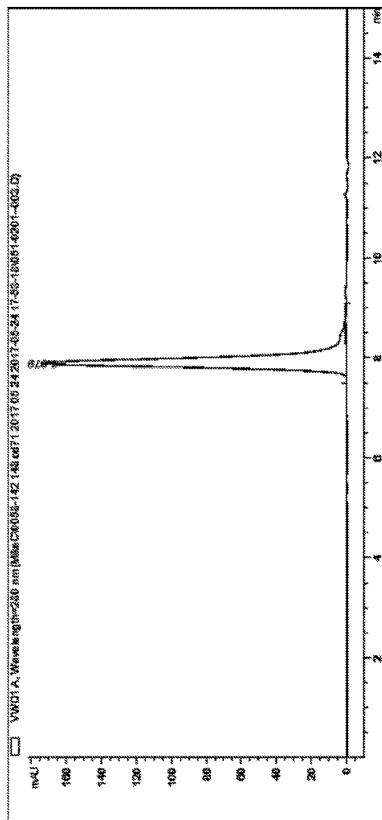


Fig. 5A

【図5B】

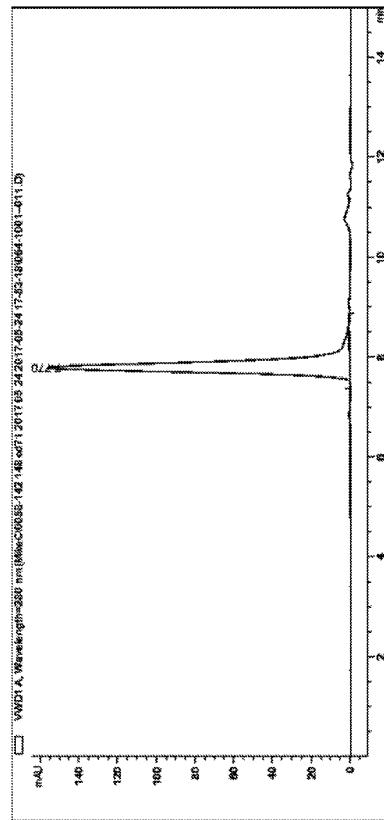


Fig. 5B

【図 5 C】

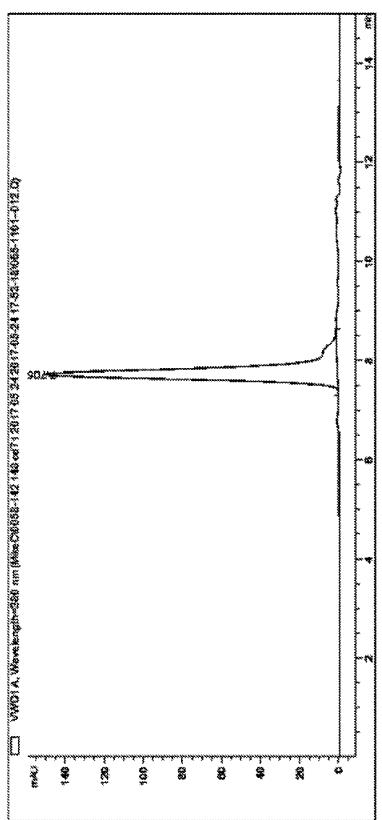


Fig. 5C

### 【図 6 A】

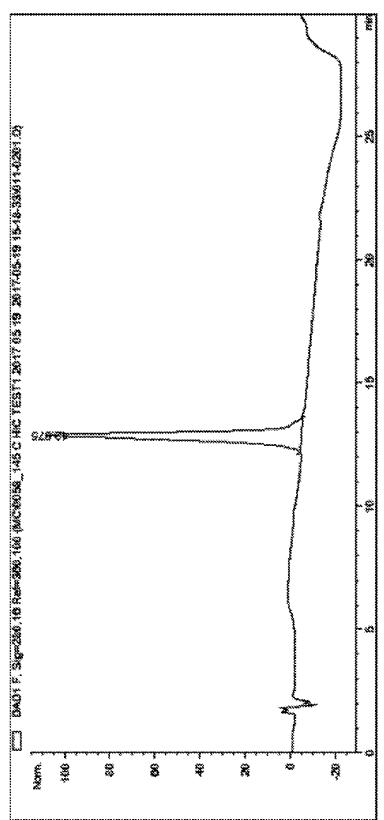


Fig. 6A

10

20

30

40

50

【図 6 B】

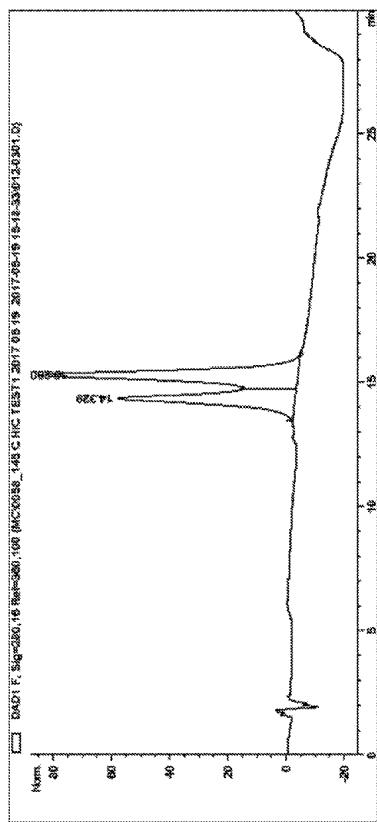


Fig. 6B

【図 6 C】

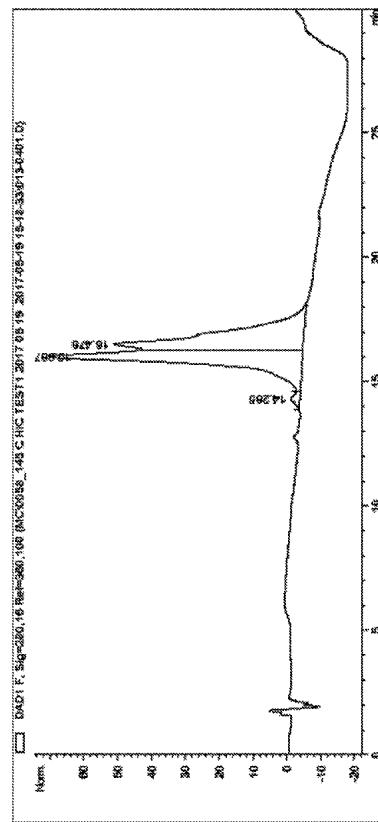


Fig. 6C

10

20

30

40

【図 7 A】

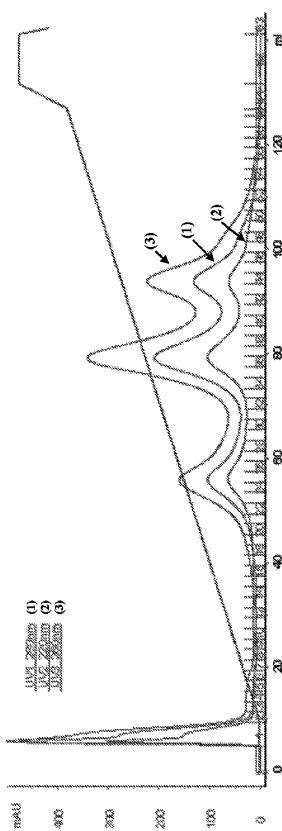


Fig. 7A

【図 7 B】

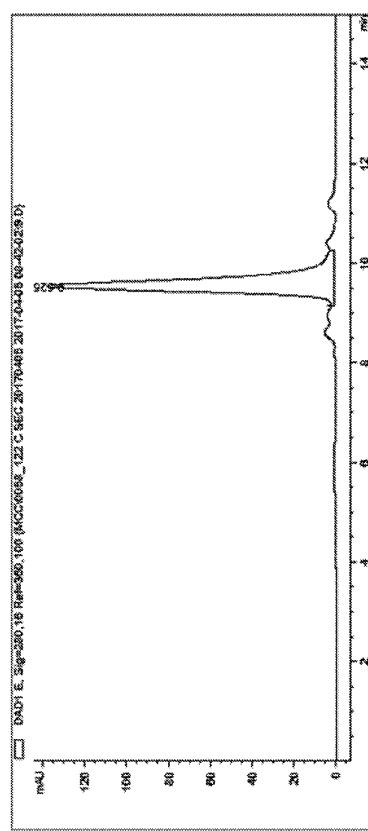


Fig. 7B

50

【図 7 C】

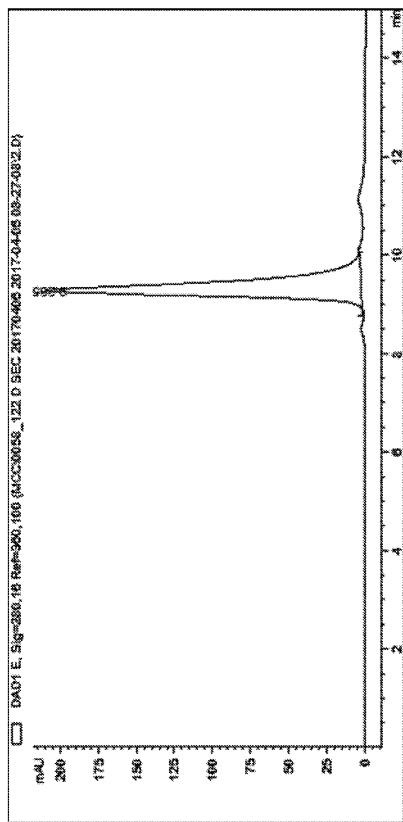


Fig. 7C

10

【図 7 D】

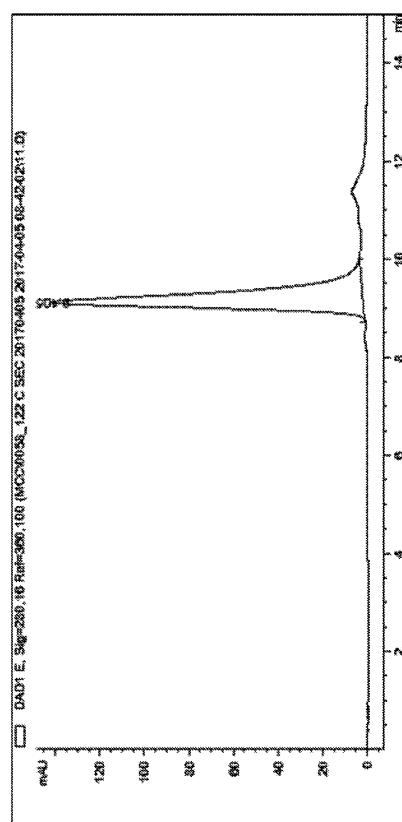


Fig. 7D

20

【図 7 E】

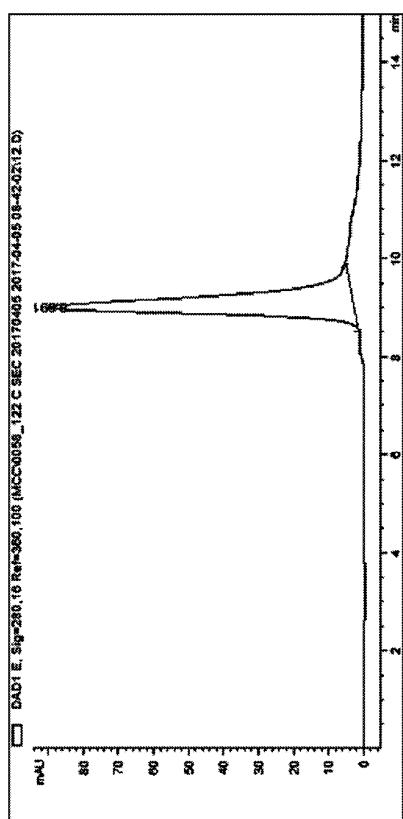


Fig. 7E

30

【図 7 F】

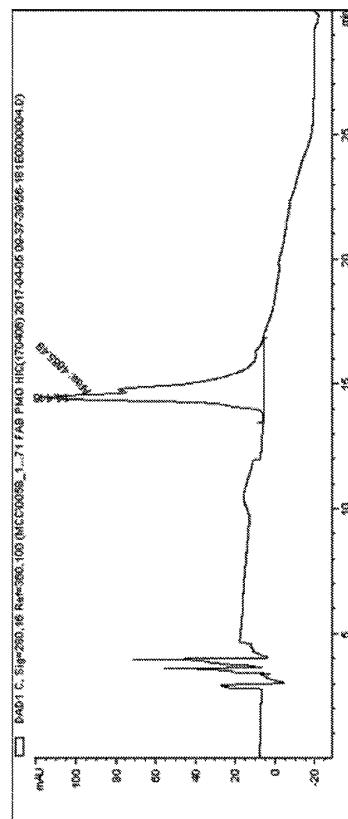


Fig. 7F

40

50

【図 7 G】

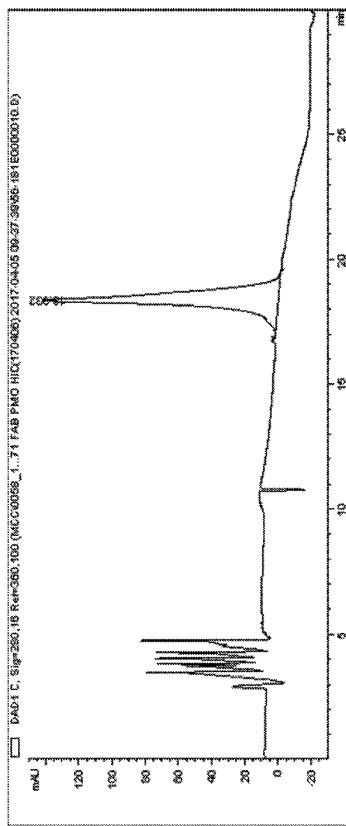


Fig. 7G

【図 7 H】

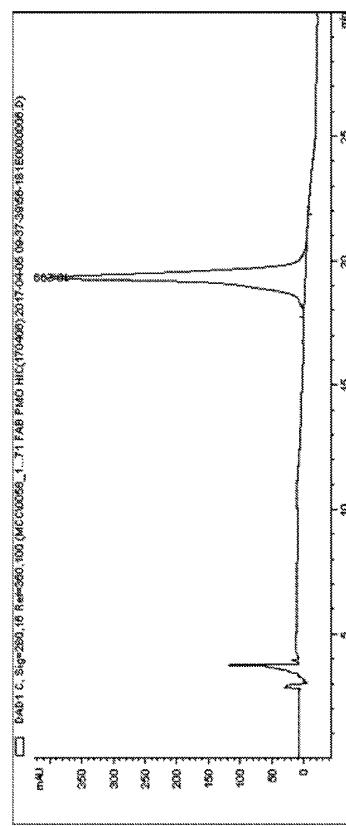


Fig. 7H

10

20

30

40

【図 7 I】

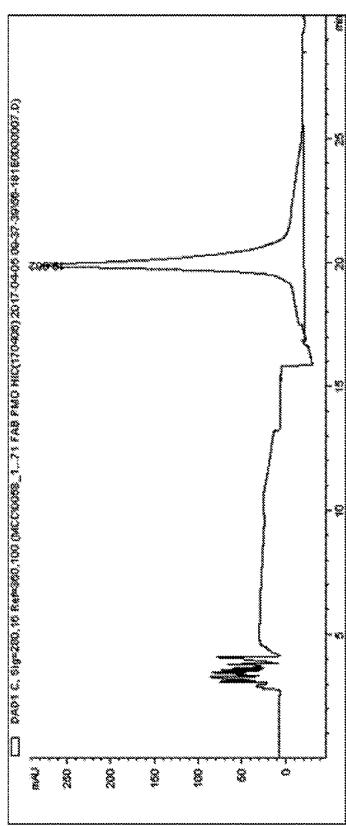


Fig. 7I

【図 8 A】

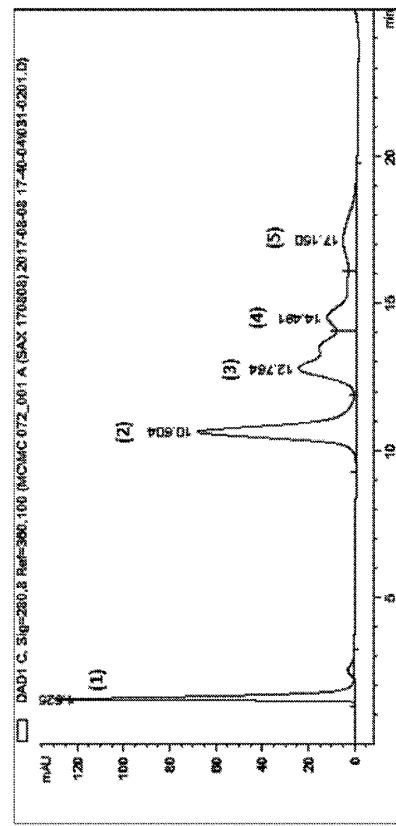


Fig. 8A

50

【図 8 B】

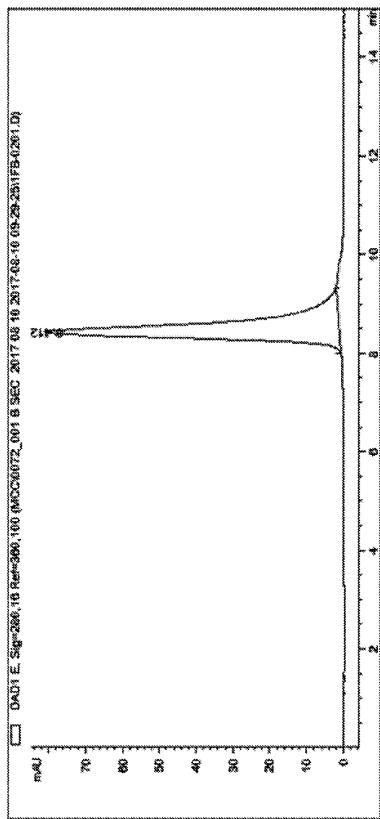


Fig. 8B

【図 8 C】

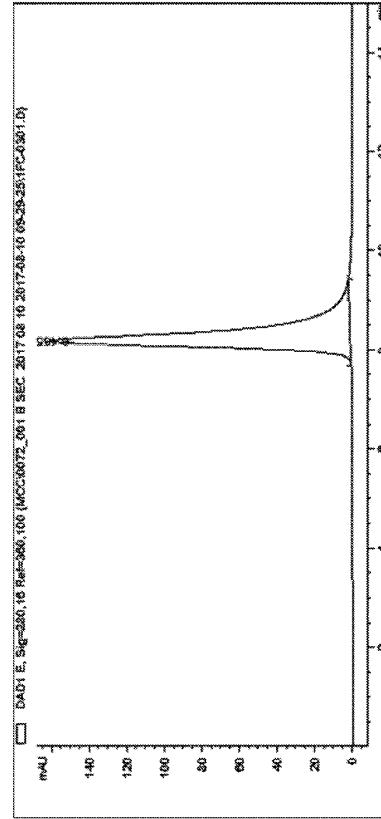


Fig. 8C

10

20

30

40

【図 8 D】

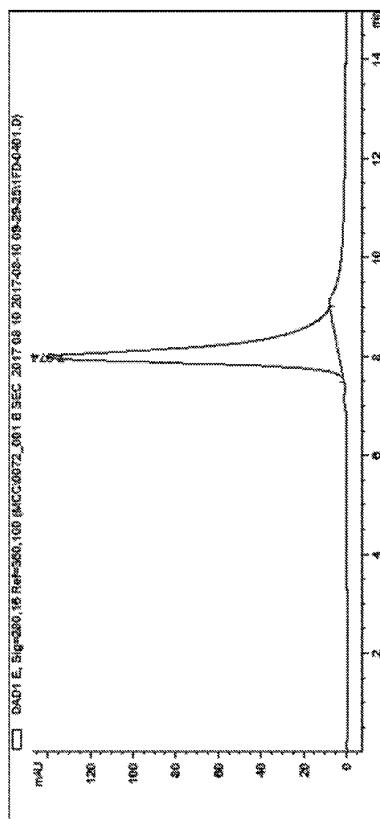


Fig. 8D

【図 8 E】

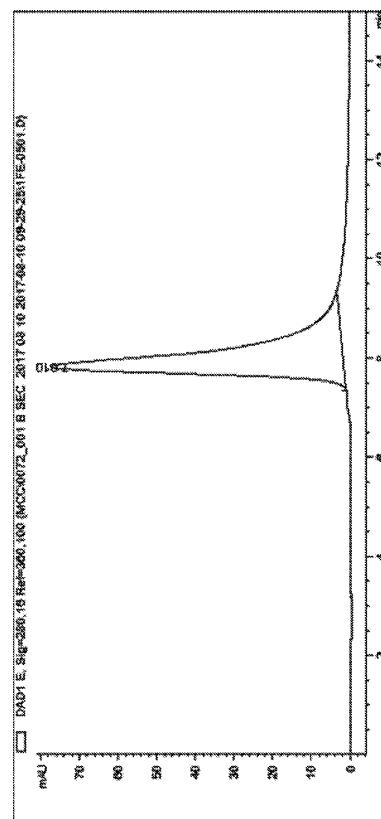


Fig. 8E

50

【図 8 F】

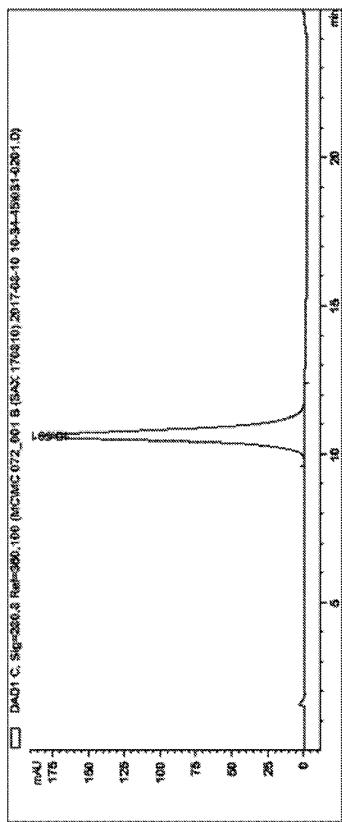


Fig. 8F

【図 8 G】

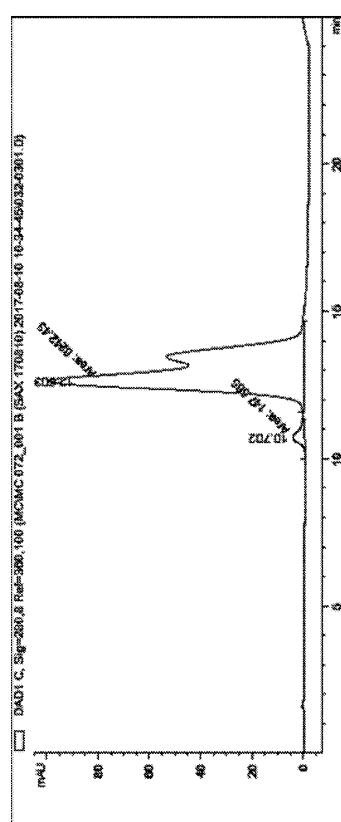


Fig. 8G

10

20

30

【図 8 H】

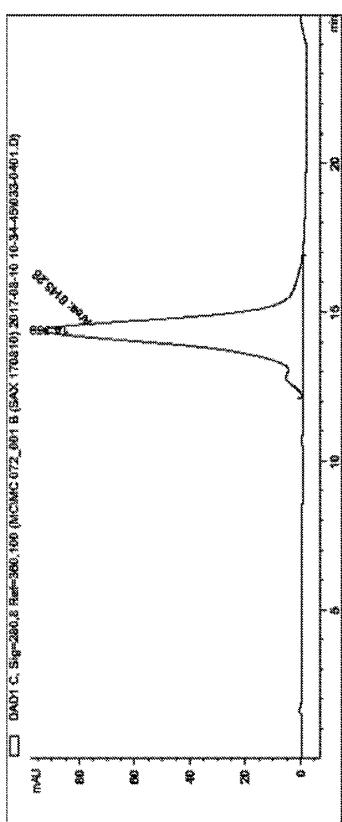


Fig. 8H

【図 9】

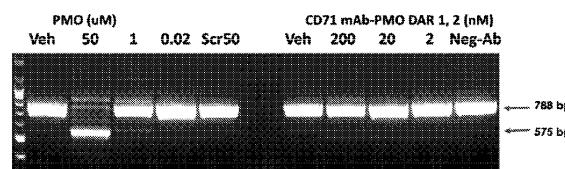


Fig. 9

40

50

【図 10】

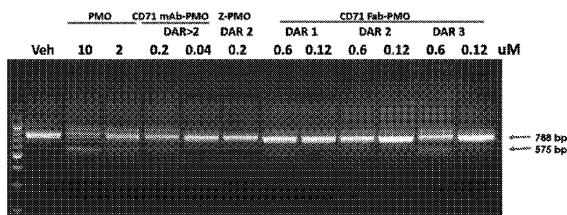


Fig. 10

【図 11】

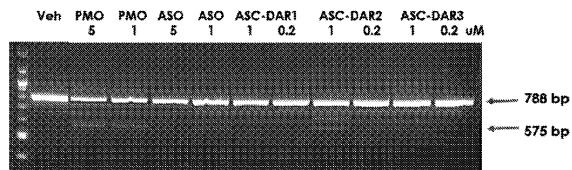
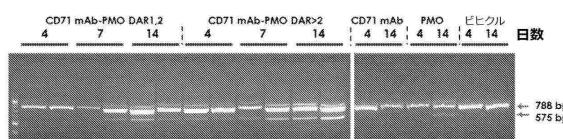


Fig. 11

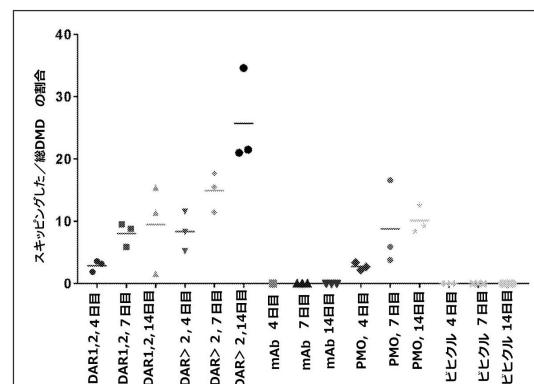
10

【図 12 A】



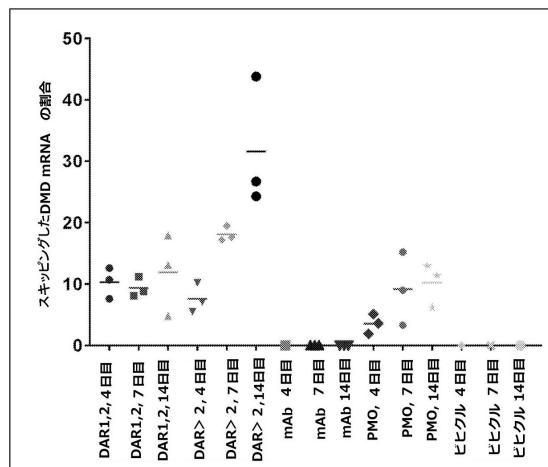
20

【図 12 B】



30

【図 12 C】



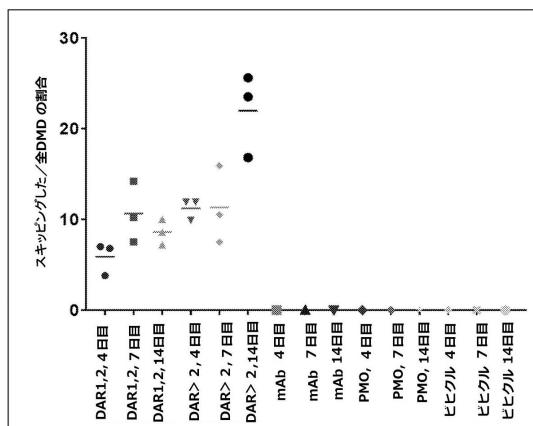
40

【図 13 A】

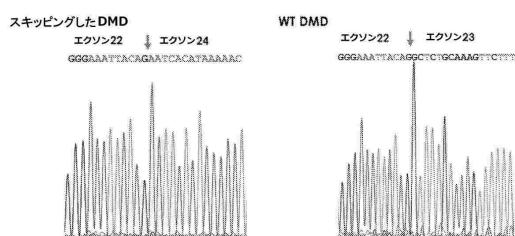


50

【図 1 3 B】

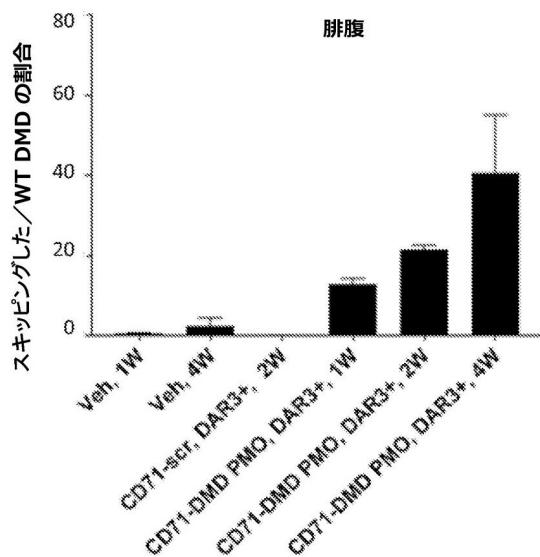


【図 1 4】



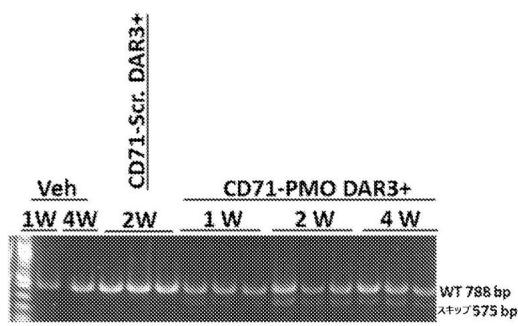
10

【図 1 5 A】



20

【図 1 5 B】

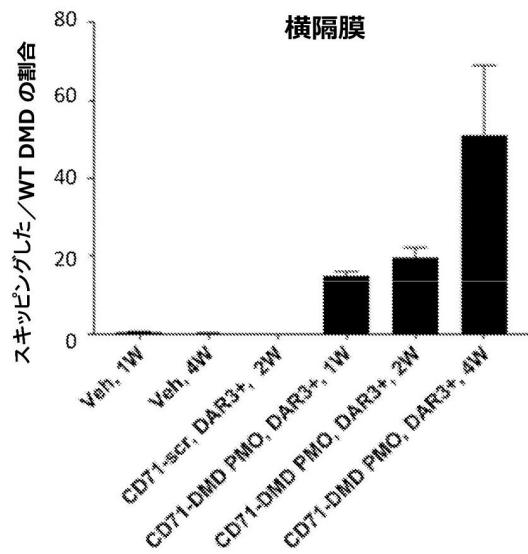


30

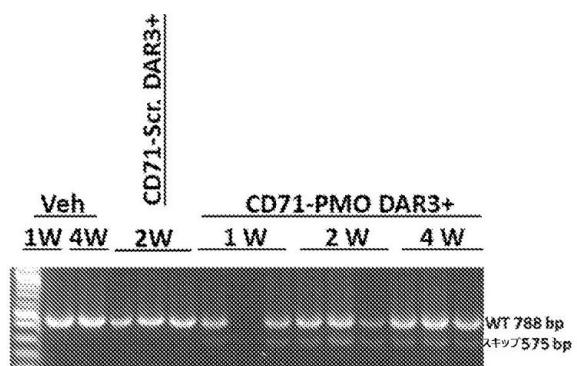
40

50

【図 15 C】

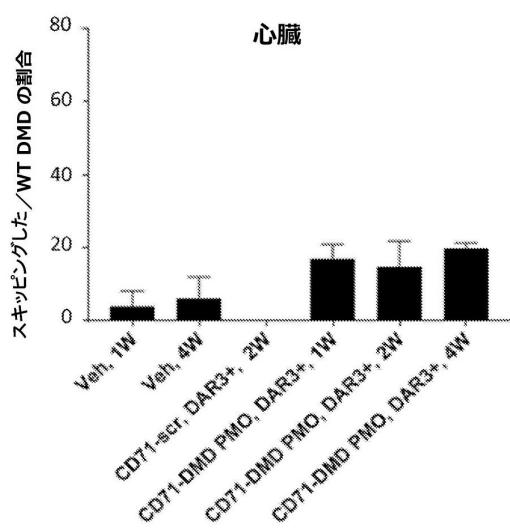


【図 15 D】

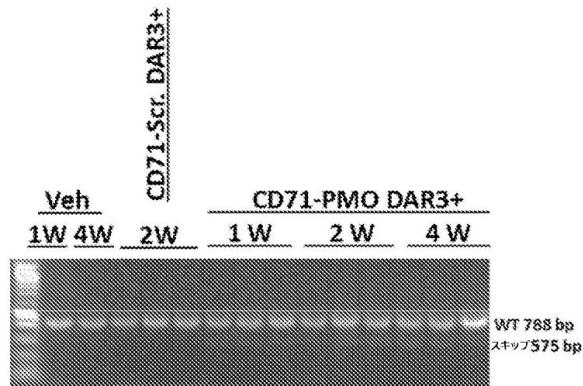


10

【図 15 E】



【図 15 F】



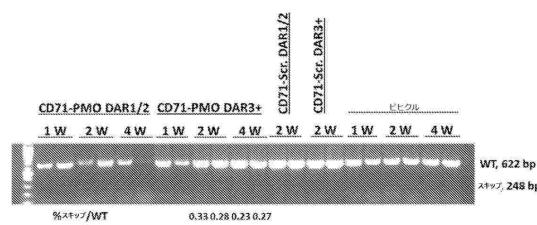
20

30

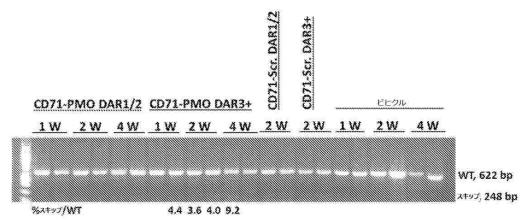
40

50

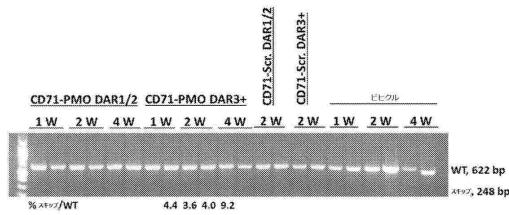
【図 16 A】



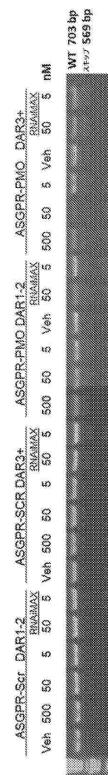
【図 16 B】



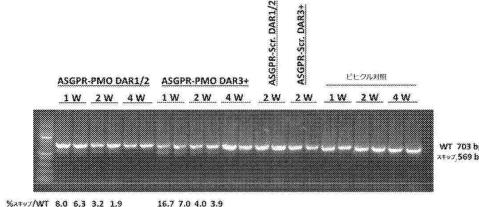
【図 16 C】



【図 17】



【図 18】



【配列表】

<0007573966000001.app>

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I		
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395		L
A 61 K 47/68 (2017.01)	A 61 K 47/68		
A 61 P 21/04 (2006.01)	A 61 P 21/04		

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/561,939

(32)優先日 平成29年9月22日(2017.9.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 レビン, アーサー エー.

アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード  
10975 スイート 150

(72)発明者 ゲール, アンドリュー ジョン

アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード  
10975 スイート 150

(72)発明者 ドッパラパディ, ベンカタ ラマナ

アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード  
10975 スイート 150

(72)発明者 コクラン,マイケル カラミアン

アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード  
10975 スイート 150

(72)発明者 ホワン, ハンフー

アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード  
10975 スイート 150

(72)発明者 バーク, ロブ

アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード  
10975 スイート 150

## 合議体

審判長 松波 由美子

審判官 山村 祥子

審判官 吉田 佳代子

(56)参考文献 特表2011-502118 (JP, A)

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, (2016)、107、321-340  
 Molecular Therapy, (2014)、22、1333-1341  
 Journal of Controlled Release, (2016)、237、1-13

臨床神経、(2011)、51、914-916

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K

Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)