

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-535432
(P2024-535432A)

(43)公表日 令和6年9月30日(2024.9.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		4 C 0 8 4
A 6 1 K	31/7125(2006.01)	A 6 1 K	31/7125		4 C 0 8 6
A 6 1 K	31/7115(2006.01)	A 6 1 K	31/7115		
A 6 1 K	31/7112(2006.01)	A 6 1 K	31/7112		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全97頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-519062(P2024-519062)	(71)出願人	516365921	ザ フローリー インスティテュート オブ ニューロサイエンス アンド メンタル ヘルス オーストラリア国, 3 0 5 2, ビクトリ ア, パークビル, ロイヤル パレード 3 0	
(86)(22)出願日	令和4年9月27日(2022.9.27)				
(85)翻訳文提出日	令和6年5月24日(2024.5.24)				
(86)国際出願番号	PCT/AU2022/051153				
(87)国際公開番号	WO2023/044545				
(87)国際公開日	令和5年3月30日(2023.3.30)				
(31)優先権主張番号	63/248,803	(74)代理人	100099759	弁理士 青木 篤	
(32)優先日	令和3年9月27日(2021.9.27)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100123582		
(31)優先権主張番号	63/333,840	(74)代理人	100117019	弁理士 三橋 真二	
(32)優先日	令和4年4月22日(2022.4.22)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100141977		
				弁理士 渡辺 陽一	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100138210		
	最終頁に続く				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P C D H 1 9 関連障害の治療のための組成物及び方法

(57)【要約】

本明細書では、プロトカドヘリン19（P C D H 1 9）遺伝子の標的領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが提供される。アンチセンスオリゴヌクレオチド又はそれを含む組成物は、P C D H 1 9 関連障害を治療し、その症状を軽減し、又は予防するために、てんかん、統合失調症、又は自閉症などのP C D H 1 9 関連障害を有する対象に投与され得る。したがって、P C D H 1 9 関連障害を治療するための有用な、組成物及び方法も本明細書において提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

長さが 10～80ヌクレオシドである一本鎖オリゴヌクレオチドであって、ヒト PCDH19 遺伝子、そのプレ mRNA 転写産物、及び／又はその mRNA 転写産物の標的領域の等しい長さの部分に対して少なくとも 80%の相補性を有する 10個の連続核酸塩基の一部を含む核酸塩基配列を有する、一本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

前記標的領域が、配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列又はそれに対して少なくとも 80%若しくは約 80%の配列同一性を有するその変異体内にある、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

前記 mRNA 転写産物又はプレ mRNA 転写産物が、少なくとも 1つの PCDH19 変異を含む、請求項 1 又は 2 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

前記少なくとも 1つの PCDH19 変異が、N340S、E307K、V441E、Q85X、N557K、D594H、S671X、L677fsx717、I119fsX122、及び P364fsX375 をコードする変異から選択されるか、又は表 1 から選択される変異である、請求項 3 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

前記オリゴヌクレオチドが、野生型 mRNA 転写産物又はプレ mRNA 転写産物よりも、前記少なくとも 1つの PCDH19 変異を含む前記 mRNA 転写産物又はプレ mRNA 転写産物に選択的にハイブリダイズする、請求項 3 又は 4 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

前記オリゴヌクレオチドが、12～40個の核酸塩基、16～30個の核酸塩基、又は 18～22個の核酸塩基からなる、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

前記オリゴヌクレオチドが、

(a) 連結されたデオキシリボヌクレオシドを含むギャップセグメントと、

(b) 連結されたヌクレオシドを含む 5' ウィングセグメントと、

(c) 連結されたヌクレオシドを含む 3' ウィングセグメントと、を含み、

前記ギャップセグメントが、前記 5' ウィングセグメントと前記 3' ウィングセグメントとの間に位置付けられた前記ヒト PCDH19 遺伝子の前記プレ mRNA 転写産物又は前記 mRNA 転写産物の前記標的領域の等しい長さの部分に対して少なくとも 80%の相補性を有する少なくとも 10個の連続核酸塩基の領域を含み、前記 5' ウィングセグメント及び前記 3' ウィングセグメントの各々が、少なくとも 2つの連結されたヌクレオシドを含み、各ウィングセグメントの少なくとも 1つのヌクレオシドが、代替ヌクレオシドを含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

少なくとも 1つの代替ヌクレオシド間連結、少なくとも 1つの代替核酸塩基及び／又は少なくとも 1つの代替糖部分を含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

前記少なくとも 1つの代替ヌクレオシド間連結が、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結、2'-アルコキシヌクレオシド間連結、又はアルキルホスフェートヌクレオシド間連結から選択される、請求項 8 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 10】

前記代替核酸塩基が、5'-メチルシトシン、プソイドウリジン、又は 5'-メトキシウリジンである、請求項 8 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 11】

前記代替糖部分が、2'-OMe修飾糖部分又は二環式糖部分である、請求項8に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項12】

前記オリゴヌクレオチドが、一価又は分岐二価又は三価リンカーを介して前記オリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端にコンジュゲートされたリガンドを更に含む、請求項1～11のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項13】

前記オリゴヌクレオチドが、PCDH19遺伝子の少なくとも17個又は少なくとも19個の連続するヌクレオチドに相補的な領域を含む、請求項1～12のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項14】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号2～385のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項15】

請求項1～14のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドと、薬学的に許容される担体と、を含む、医薬組成物。

【請求項16】

脂質ナノ粒子、ポリプレックスナノ粒子、リポプレックスナノ粒子、又はリポソームを含む、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】

必要とする対象におけるPCDH19関連障害を治療する、予防する、若しくはその進行を遅延させる方法、又はPCDH19関連障害を有する対象の細胞におけるPCDH19の転写を阻害する、若しくはPCDH19のレベル及び／若しくは活性を低下させる方法であって、請求項1～14のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド又は請求項15若しくは16に記載の医薬組成物を、前記PCDH19関連障害を治療する、予防する、若しくはその進行を遅延させるのに、前記PCDH19遺伝子のmRNA転写産物の分解を得るのに、又は前記細胞におけるPCDH19のレベル及び／若しくは活性を低下させるのに十分な量及び期間で、前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項18】

前記細胞が、中枢神経系の細胞である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記PCDH19関連障害が、てんかん、統合失調症、及び自閉症からなる群から選択される、請求項17又は18に記載の方法。

【請求項20】

前記対象が、前記PCDH19遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子に変異を有する、請求項17～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記オリゴヌクレオチドが、前記変異を含む前記対立遺伝子の発現を、前記変異を含まない対立遺伝子と比較して選択的に減少させるか、又は前記オリゴヌクレオチドが、前記変異を含む前記対立遺伝子及び野生型配列を含む対立遺伝子の発現を減少させる、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

変異がミスセンス変異、ナンセンス変異、又はフレームシフト変異である、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

前記PCDH19関連障害の1つ以上の症状を軽減する、請求項17～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

前記PCDH19関連障害の前記1つ以上の症状が、長期発作、頻回発作、行動及び発達遅延、運動及び平衡問題、整形外科的状態、言語及び発話の遅延問題、成長及び栄養問

10

20

30

40

50

題、睡眠困難、慢性感染症、感覚統合障害、自律神経系の乱れ、並びに発汗からなる群から選択される、請求項 23 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2021年9月27日に提出された「Compositions and methods for the treatment of PCDH19 related disorders」と題する米国仮出願第63/248803号、2022年4月22日に提出された「Compositions and methods for the treatment of PCDH19 related disorder」と題する米国仮出願第63/333840号に対する優先権を主張するものであり、これらの全内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

本発明は、ヒトPCDH19遺伝子、そのプレmRNA転写産物、及び／又はそのmRNA転写産物の標的領域に相補的な、アンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。本発明の実施形態はまた、てんかん、統合失調症、又は自閉症などのPCDH19関連障害を治療する、その少なくとも1つの症状を軽減する、又は予防するための、組成物及び方法に関する。

【背景技術】

20

【0003】

プロトカドヘリン19 (PCDH19) は、細胞間接着において役割を果たし得る、ニューロンにおいて発現される細胞表面タンパク質である。PCDH19遺伝子の変異は、てんかん、自閉症、及び統合失調症などの神経障害に関連している。興味深いことに、PCDH19に関連する早期乳児てんかん性脳症9 (EIEE9) は、ヘテロ接合性の女性が罹患するが、ヘミ接合性の男性は罹患しない、X連鎖障害である。PCDH19における変異は、稀ではあるが、モザイク男性保因者にも影響を及ぼす可能性がある。PCDH19変異を有する人々は遺伝子スクリーニングによって診断することができるが、てんかんなどのPCDH19関連障害を治療するための既知の治療法は現在存在しない。したがって、これらの疾患を治療するための、新しい組成物及び方法が必要とされている。

30

【発明の概要】

【0004】

一態様では、本発明は、長さが10～80ヌクレオシドである一本鎖オリゴヌクレオチドを含む化合物であって、一本鎖オリゴヌクレオチドが、ヒトPCDH19遺伝子、そのプレmRNA転写産物、及び／又はそのmRNA転写産物の標的領域の等しい長さの部分に対して少なくとも80% (例えば、85%、90%、95%、97%、99%、又は100%) の相補性を有する10個の連続する核酸塩基の一部を含む核酸塩基配列を有する、化合物を提供する。

【0005】

特定の実施形態では、標的領域は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列又はそれに対して少なくとも若しくは約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の配列同一性を有するその変異体内にある。特定の実施形態では、一本鎖オリゴヌクレオチドは、PCDH19プレmRNA転写産物又はmRNA転写産物にハイブリダイズする。

40

【0006】

いくつかの実施形態では、mRNA転写産物又はmRNA前駆体転写産物は、少なくとも1つのPCDH19変異を含み得る。変異は、例えば、N340S、E307K、V441E、Q85X、N557K、D594H、S671X、L677fsx717、I119fsX122、及びP364fsX375をコードする変異であり得る。変異は、表

50

1 から選択される変異であり得る。オリゴヌクレオチドは、野生型 mRNA 転写産物又はプレ mRNA 転写産物よりも、少なくとも 1 つの PCDH19 変異を含む mRNA 転写産物又はプレ mRNA 転写産物に選択的にハイブリダイズし得る。したがって、オリゴヌクレオチドは、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドであり得る。

【0007】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12～40 個（例えば、15～30、例えば、16～22、例えば、15、16、17、18、19、20、21、又は 22 個）の核酸塩基からなる。

【0008】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、連結デオキシリボヌクレオシドを含むギャップセグメントと、連結ヌクレオシドを含む 5' ウィングセグメントと、連結ヌクレオシドを含む 3' ウィングセグメントと、を含む。ギャップセグメントは、5' ウィングセグメントと 3' ウィングセグメントとの間に位置付けられたヒト PCDH19 遺伝子の mRNA 前駆体転写産物又は mRNA 転写産物の標的領域の等しい長さの部分に対して少なくとも 80%（例えば、85%、90%、95%、97%、99%、又は 100%）の相補性を有する少なくとも 10 個の連続核酸塩基の領域を含み得る。5' ウィングセグメント及び 3' ウィングセグメントの各々は、少なくとも 2 つの連結ヌクレオシドを含み、各ウィングセグメントの少なくとも 1 つのヌクレオシドは、代替ヌクレオシドを含む。

【0009】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの代替ヌクレオシド間連結を含む。少なくとも 1 つの代替ヌクレオシド間連結は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結であり得る。少なくとも 1 つの代替ヌクレオシド間連結は、2'-アルコキシヌクレオシド間連結であり得る。少なくとも 1 つの代替ヌクレオシド間連結は、アルキルホスフェートヌクレオシド間連結であり得る。

【0010】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの代替核酸塩基を含む。代替核酸塩基は、5'-メチルシトシン、プソイドウリジン、又は 5'-メトキシウリジンであり得る。

【0011】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの代替糖部分を含む。代替糖部分は、2'-OMe 修飾糖部分又は二環式糖部分であり得る。

【0012】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、一価又は分岐二価又は三価リンカーを介してオリゴヌクレオチドの 5' 末端又は 3' 末端にコンジュゲートされたリガンドを含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、PCDH19 遺伝子の少なくとも 15 個（例えば、15、16、17、18、19、20、又は 21 個）の連続するヌクレオチドに相補的な領域を含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、配列番号 2～385 のいずれか 1 つに示される配列を含む。

【0015】

別の態様では、本発明は、上記の実施形態のいずれかのオリゴヌクレオチドと、薬学的に許容される担体又は賦形剤と、を含む、医薬組成物を提供する。

【0016】

別の態様では、本発明は、上記実施形態のいずれかのオリゴヌクレオチドと、脂質ナノ粒子、ポリプレックスナノ粒子、リボプレックスナノ粒子、又はリポソームと、を含む、組成物を提供する。

【0017】

10

20

30

40

50

別の態様では、本発明は、必要とする対象におけるPCDH19関連障害を治療する、予防する、又はその進行を遅延させる方法であって、上記実施形態のいずれかのオリゴヌクレオチド、医薬組成物、又は組成物を、PCDH19関連障害を治療する、予防する、又はその進行を遅延させるのに十分な量及び期間で対象に投与することによる、方法を提供する。

【0018】

PCDH19関連障害の治療、予防、又はその進行の遅延のための医薬の製造における、本発明のオリゴヌクレオチドの使用も本明細書において提供される。

【0019】

別の態様では、本発明は、PCDH19関連障害を有する対象の細胞におけるPCDH19の転写を阻害する方法であって、オリゴヌクレオチドが細胞におけるPCDH19遺伝子の発現を阻害するように、細胞を、上記実施形態のいずれかのオリゴヌクレオチド、医薬組成物、又は組成物と、PCDH19遺伝子のmRNA転写産物の分解を得るのに十分な量及び期間で接触させることによる、方法を提供する。

【0020】

細胞は、インビボで又はエクスピボで接触され得る。

【0021】

別の態様では、本発明は、PCDH19関連障害を有する対象の細胞におけるPCDH19のレベル及び／又は活性を低下させる方法であって、細胞を、上記実施形態のいずれかのオリゴヌクレオチド、医薬組成物、又は組成物と、細胞におけるPCDH19のレベル及び／又は活性を低下させるのに十分な量及び期間で接触させることによる、方法を提供する。

【0022】

細胞は、インビボで又はエクスピボで接触され得る。

【0023】

上記態様のいくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。対象は、男性であり得る。対象は、女性であり得る。

【0024】

上記態様のいくつかの実施形態では、細胞は、中枢神経系の細胞である。

【0025】

上記態様のいくつかの実施形態では、PCDH19関連障害は、てんかん、統合失調症、及び自閉症からなる群から選択される。

【0026】

上記態様のいくつかの実施形態では、PCDH19関連障害は、てんかんである。てんかんは、てんかん性早期乳児脳症であり得る。

【0027】

上記態様のいくつかの実施形態では、対象は、PCDH19遺伝子の少なくとも1つの対立遺伝子に変異を有する。変異は、ヘテロ接合性であり得る（例えば、対象が女性である場合）。変異は、ヘミ接合性であり得る（例えば、対象が男性である場合）。対象が男性である場合、対象は、細胞のサブセットが変異を含む、モザイク変異を有し得る。変異は、ミスセンス変異又はナンセンス変異であり得る。変異は、フレームシフト変異であり得る。変異は、挿入又は欠失であり得る。

【0028】

上記態様のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、変異を含む対立遺伝子の発現を、変異を含まない対立遺伝子と比較して選択的に低減する。

【0029】

上記態様のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、変異を含む対立遺伝子及び野生型配列を含む対立遺伝子の発現を低減させる。

【0030】

上記態様のいくつかの実施形態では、治療は、PCDH19関連障害の1つ以上の症状

を軽減する。PCDH19 関連障害の1つ以上の症状は、長期発作、頻回発作、行動及び発達遅延、運動及び平衡問題、整形外科的状态、言語及び発話の遅延問題、成長及び栄養問題、睡眠障害、慢性感染症、感覚統合障害、自律神経系の乱れ、並びに発汗からなる群から選択され得る。

【図面の簡単な説明】

【0031】

本開示の例示的な実施形態は、以下の図面を参照して、単に非限定的な例として本明細書に記載される。

【0032】

【図1-1】例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)の0.2 nM(灰色バー)及び2.0 nM(黒色バー)のトランスフェクションから48時間後のHEK293細胞における相対的なPCDH19 mRNA発現である。PCDH19 mRNAについてのデータは、GAPDH mRNAに対して正規化され、モックトランスフェクト細胞及びPCDH19と交差反応しないAhsc1 ASOでトランスフェクトされた細胞の統合平均と比較して表される。データは、n=4の別々の実験から計算された平均及び標準偏差として示す。ASO番号付け(横座標値)は、表2に示されるASO番号付けに対応する。

10

【図1-2】例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)の0.2 nM(灰色バー)及び2.0 nM(黒色バー)のトランスフェクションから48時間後のHEK293細胞における相対的なPCDH19 mRNA発現である。PCDH19 mRNAについてのデータは、GAPDH mRNAに対して正規化され、モックトランスフェクト細胞及びPCDH19と交差反応しないAhsc1 ASOでトランスフェクトされた細胞の統合平均と比較して表される。データは、n=4の別々の実験から計算された平均及び標準偏差として示す。ASO番号付け(横座標値)は、表2に示されるASO番号付けに対応する。

20

【0033】

配列番号1は、NCBI参照配列NC_000023.11(領域100291644.100410273)のヒトPCDH19遺伝子のヌクレオチド配列を示す。本発明の例示的なASOは、配列番号2~385(表2)に示される。

【0034】

30

定義

便宜上、本明細書、実施例、及び添付の特許請求の範囲において使用されるいくつかの用語及び語句の意味を以下に提供する。別段の記載がない限り、又は文脈から暗示されない限り、以下の用語及び語句は、以下に提供される意味を含む。定義は、特定の実施形態を説明するのを助けるために提供され、本技術の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定されるので、特許請求される技術を限定することを意図しない。特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本技術が属する分野の当業者に共通して理解されるものと同じ意味を有している。当該技術分野における用語の用法と本明細書で提供されるその定義との間に明らかな矛盾がある場合、本明細書内で提供される定義が優先するものとする。

40

【0035】

本出願において、文脈から別段のことが明らかでない限り、(i)「a」という用語は、「少なくとも1つ」を意味すると理解され得、(ii)「又は」という用語は、「及び／又は」を意味すると理解され得、(iii)「含む(including)」及び「含む／備える(comprising)」という用語は、単独で提示されるか、又は1つ以上の追加の構成要素若しくは工程と一緒に提示されるかにかかわらず、箇条書きの構成要素又は工程を包含すると理解され得る。

【0036】

本明細書で使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は、記載されている値の上下10%以内の値を指す。例えば、「約5 nM」という用語は、4.5~5.5 nMの

50

範囲を示す。

【0037】

数又は一連の数の前の「少なくとも」という用語は、文脈から明らかなように、「少なくとも」という用語に隣接する数、及び論理的に含まれ得る全ての後続の数又は整数を含むと理解される。例えば、核酸分子中のヌクレオチドの数は整数である必要がある。例えば、「21ヌクレオチドの核酸分子の少なくとも18個のヌクレオチド」は、18、19、20、又は21個のヌクレオチドが示された特性を有することを意味する。一連の数又は範囲の前に少なくともが存在する場合、「少なくとも」は、一連の数又は範囲内の数の各々を修飾し得ることが理解される。

【0038】

本明細書で使用される場合、「以下」又は「未満」は、文脈から論理的に、0までの、句に隣接する値、及び論理的により低い値又は整数として理解される。例えば、「標的配列に対して3個以下のミスマッチ」を有するオリゴヌクレオチドは、標的配列に対して3、2、1、又は0個のミスマッチを有する。一連の数又は範囲の前に「以下」が存在する場合、「以下」は、一連の数又は範囲内の数の各々を修飾し得ることが理解される。

【0039】

本明細書及びそれに続く特許請求の範囲全体を通して、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含む／備える (comprise)」という語、並びに「含む／備える (comprise s)」及び「含む／備える (comprising)」などの変形は、記載された整数若しくは工程又は整数若しくは工程の群を含むが、あらゆる他の整数若しくは工程又は整数若しくは工程の群を除外しないことを意味すると理解される。

【0040】

本明細書で使用される場合、「投与」という用語は、対象又は系への組成物（例えば、本明細書に記載の化合物又は化合物を含む調製物）の投与を指す。動物対象（例えば、ヒト）への投与は、本明細書に記載されるものなどの任意の適切な経路によるものであり得る。

【0041】

本明細書で使用される場合、「併用療法」又は「組み合わせて投与される／併用投与される」とは、2つ（又はそれ以上）の異なる薬剤又は治療が、特定の疾患又は状態のための規定された治療レジメンの一部として対象に投与されることを意味する。治療レジメンは、対象に対する別々の薬剤の効果が重複するように、各薬剤の投与の用量及び周期を規定する。いくつかの実施形態では、2つ以上の薬剤の送達は、同時又は並行であり、薬剤は、共製剤化され得る。いくつかの実施形態では、2つ以上の薬剤は共製剤化されず、処方されたレジメンの一部として逐次的に投与される。いくつかの実施形態では、2つ以上の薬剤又は治療の併用投与は、疾患に関連する症状又は他のパラメータの低減が、1つの薬剤若しくは治療を単独で、又は他の薬剤若しくは治療の非存在下で送達した場合に観察される低減よりも大きくなるものである。2つの治療の効果は、部分的に相加的、完全に相加的、又は相加的より大きい（例えば、相乗的）ものであり得る。各治療薬の逐次的又は実質的に同時の投与は、任意の適切な経路（経口経路、静脈内経路、筋肉内経路、及び粘膜組織を介した直接吸収が挙げられるが、これらに限定されない）によって実行することができる。治療薬は、同じ経路又は異なる経路によって投与することができる。例えば、組み合わせの第1の治療薬が静脈内注射によって投与され得る一方、組み合わせの第2の治療薬は経口投与され得る。

【0042】

本明細書で使用される場合、「PCDH19」及び「プロトカドヘリン19」という用語は、発達中の脳において主に発現されるカルシウム依存性細胞接着タンパク質を指す。PCDH19は、特に明記しない限り、ヒト、ウシ、ニワトリ、げっ歯類、マウス、ラット、ブタ、ヒツジ、霊長類、サル、及びモルモットを含むがこれらに限定されない任意の脊椎動物又は哺乳動物源由来のアミノ酸配列を有し得る。この用語は、天然PCDH19の少なくとも1つのインビボ又はインビトロ活性を維持する、天然PCDH19の断片及

10

20

30

40

50

び変異体も指す。この用語は、PCDH19の全長のプロセッシングされていない前駆体形態に加えて、シグナルペプチドの翻訳後切断から生じる成熟形態を包含する。PCDH19は、PCDH19遺伝子によってコードされる。例示的なヒトPCDH19遺伝子の核酸配列は、NCBI参照番号NC_000023.11、NG_021319.1、NM_001105243.1、NM_001184880.1、及びNM_020766.2に示されている。「PCDH19」という用語はまた、野生型ヒトPCDH19のアミノ酸配列に対して少なくとも85%の同一性（例えば、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、又はそれ以上の同一性）を有するタンパク質などの野生型PCDH19タンパク質の天然変異体も指す。

10

【0043】

本明細書で使用される「PCDH19」という用語は、PCDH19遺伝子における一塩基多型などの、PCDH19遺伝子の天然に存在するDNA配列変異によって細胞内で発現される特定のポリペプチドも指す。PCDH19遺伝子内の多数のSNPが同定されており、例えば、NCBI dbSNP（例えば、www.ncbi.nlm.nih.gov/snpを参照）に見出すことができる。

【0044】

本明細書で使用される場合、「標的配列」は、一次転写産物のRNAプロセッシングの産物であるmRNAを含む、PCDH19遺伝子の転写中に形成されるmRNA分子のヌクレオチド配列の連続部分を指す。一実施形態では、配列の標的部分は、少なくとも、PCDH19遺伝子の転写中に形成されるmRNA分子のヌクレオチド配列のその部分又はその付近でのオリゴヌクレオチド指向性（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）指向性）切断のための基質として機能するのに十分な長さである。標的配列は、例えば、約9～36ヌクレオチド長、例えば、約15～30ヌクレオチド長、例えば、約18～22ヌクレオチド長であり得る。例えば、標的配列は、約15～30ヌクレオチド長、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、又は21～22ヌクレオチド長であり得る。上に列挙した範囲及び長さの中間の範囲及び長さも、本発明の一部であると考える。

20

30

【0045】

「G」、「C」、「A」、「T」、及び「U」は各々概して、塩基としてそれぞれグアニン、シトシン、アデニン、チミジン、及びウラシルを含有する天然に存在するヌクレオチドを表す。しかし、「ヌクレオチド」という用語はまた、以下に更に詳述されるような代替ヌクレオチド、又は代用置換部分を指し得ることが理解される。当業者は、グアニン、シトシン、アデニン、及びウラシルが、そのような置換部分を有するヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの塩基対合特性を実質的に変化させることなく、他の部分によって置換できることを十分に認識している。例えば、限定されないが、塩基としてイノシンを含むヌクレオチドは、アデニン、シトシン、又はウラシルを含有するヌクレオチドと塩基対合することができる。したがって、ウラシル、グアニン、又はアデニンを含有するヌクレオチドは、本発明において特徴とされるオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列において、例えばイノシンを含有するヌクレオチドによって置換することができる。別の例では、オリゴヌクレオチド中のどこであっても任意のアデニン及びシトシンをそれぞれグアニン及びウラシルで置換して、標的mRNAとのG-Uゆらぎ塩基対を形成することができる。このような置換部分を含む配列は、本発明において特徴とされる組成物及び方法に好

40

50

適である。

【0046】

「核酸塩基」及び「塩基」という用語は、核酸ハイブリダイゼーションにおいて水素結合を形成するヌクレオシド及びヌクレオチド中に存在するプリン（例えば、アデニン及びグアニン）及びピリミジン（例えば、ウラシル、チミン、及びシトシン）部分を含む。本発明の文脈において、核酸塩基という用語は、天然に存在する核酸塩基とは異なり得るが核酸ハイブリダイゼーション中に機能的である、代替核酸塩基も包含する。この文脈において、「核酸塩基」は、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン、ウラシル、キサンチン、及びヒポキサンチンなどの天然に存在する核酸塩基、並びに代替核酸塩基の両方を指す。このような変異体は、例えば、Hirao et al (2012) Accounts of Chemical Research vol. 45 page 2055及びBergstrom (2009) Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl. 37 1. 4. 1. に記載されている。

10

【0047】

「ヌクレオシド」という用語は、核酸塩基及び糖部分を有するオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドのモノマー単位を指す。ヌクレオシドとしては、天然に存在するヌクレオシドに加えて、本明細書に記載されるものなどの代替ヌクレオシドが挙げられ得る。ヌクレオシドの核酸塩基は、天然に存在する核酸塩基又は代替核酸塩基であり得る。同様に、ヌクレオシドの糖部分は、天然に存在する糖又は代替糖であり得る。

20

【0048】

「代替ヌクレオシド」という用語は、本明細書に記載されるものなどの代替糖又は代替核酸塩基を有するヌクレオシドを指す。

【0049】

いくつかの実施形態では、核酸塩基部分は、プリン又はピリミジンを修飾プリン又はピリミジン、例えば置換プリン又は置換ピリミジン、例えばイソシトシン、シュードイソシトシン、5-メチルシトシン、5-チオゾローシトシン、5-プロピニル-シトシン、5-プロピニル-ウリジン、5-プロモウリジン、5-チアゾローウリジン、2-チオーウリジン、シュードウリジン、1-メチルシュードウリジン、5-メトキシウリジン、2'-チオーチミン、イノシン、ジアミノプリン、6-アミノプリン、2-アミノプリン、2, 6-ジアミノプリン、及び2-クロロ-6-アミノプリンから選択される「代替核酸塩基」に変化させることによって修飾される。

30

【0050】

核酸塩基部分は、各対応する核酸塩基に対する文字コード、例えば、A、T、G、C、又はUによって示され得、各文字は、等価な機能の代替核酸塩基を任意選択で含み得る。いくつかの実施形態では、例えば、ギャップマーについて、5-メチルシトシンLNAヌクレオシドが使用され得る。

【0051】

「糖」又は「糖部分」は、フラノース環を有する天然に存在する糖を含む。糖は、ヌクレオシドのフラノース環を置換することができる構造として定義される「代替糖」も含む。ある特定の実施形態では、代替糖は、非フラノース（又は4'-置換フラノース）環若しくは環系又は開放系である。このような構造は、天然フラノース環、例えば、6員環に対する単純な変化を含み得、又はペプチド核酸において使用される非環系の場合のように、より複雑であり得る。代替糖はまた、フラノース環が別の環系、例えば、モルホリノ又はヘキシトール環系などで置換された糖代用物を含み得る。モチーフを有するオリゴヌクレオチドの調製に有用な糖部分としては、 β -D-リボース、 β -D-2'-デオキシリボース、置換糖（2'、5'及びビス置換糖など）、4'-S-糖（4'-S-リボース、4'-S-2'-デオキシリボース及び4'-S-2'-置換リボースなど）、二環式代替糖（2'-O-CH₂-4'又は2'-O-(C₂H₂-4'架橋リボース由来二環式糖など）及び糖代用物（リボース環がモルホリノ又はヘキシトール環系で置換された場合など）が挙

40

50

げられるが、これらに限定されない。各位置で使用される複素環塩基及びヌクレオシド間連結のタイプは可変であり、モチーフを決定する因子ではない。代替糖部分を有するほとんどのヌクレオシドにおいて、複素環式核酸塩基は、概して、ハイブリダイゼーションを可能にするように維持される。

【0052】

本明細書で使用される「ヌクレオチド」は、ヌクレオシド及びヌクレオシド間連結を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドのモノマー単位を指す。ヌクレオシド間連結は、リン酸連結を含んでも含まなくてもよい。同様に、「連結ヌクレオシド」は、リン酸連結によって連結されていてもされていなくてもよい。多くの「代替ヌクレオシド間連結」が当該技術分野で公知であり、これらとしては、ホスフェート連結、ホスホロチオエート連結、及びボロノホスフェート連結が挙げられるが、これらに限定されない。代替ヌクレオシドとしては、二環式ヌクレオシド（BNA）（例えば、ロックドヌクレオシド（LNA）及び拘束エチル（cEt）ヌクレオシド）、ペプチドヌクレオシド（PNA）、ホスホトリエステル、ホスホロチオネート、ホスホルアミデート、及び本明細書に記載されるものを含む天然ヌクレオシドのリン酸骨格の他の変異体が挙げられる。

10

【0053】

本明細書で使用される「代替ヌクレオチド」は、代替ヌクレオシド又は代替糖、及び代替ヌクレオシド連結を含み得るヌクレオシド間連結を有する、ヌクレオチドを指す。

【0054】

本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、2つ以上の共有結合したヌクレオシドを含む分子として当業者によって概ね理解されたとおり定義される。このような共有結合したヌクレオシドはまた、核酸分子又はオリゴマーと称され得る。「オリゴヌクレオチド」という用語は、短いポリヌクレオチド（典型的には100個以下の連結ヌクレオシド）を指す。オリゴヌクレオチドは、一般に、固相化学合成とそれに続く精製とによって実験室で作製される。オリゴヌクレオチドの配列に言及する場合、共有結合したヌクレオチド又はヌクレオシドの核酸塩基部分又はその修飾の配列若しくは順序が参照される。本発明のオリゴヌクレオチドは、人工であってもよく、化学的に合成され、典型的には、精製又は単離される。オリゴヌクレオチドはまた、（i）フラノース誘導体によって、又は塩基部分の共有結合点として使用され得る環状若しくは非環状の任意の構造によって置換される1つ以上のフラノース部分を有する化合物、（ii）ホスホルアミデート若しくはホスホロチオエート連結の場合のように修飾されたか、又はホルムアセタール若しくはリボアセタール連結の場合のように好適な連結部分によって完全に置換された、1つ以上のホスホジエステル連結を有する化合物、及び／又は（iii）塩基部分の共有結合点として使用され得る環状若しくは非環状の任意の構造によって置換された、1つ以上の連結されたフラノース-ホスホジエステル連結部分を有する化合物を含むことが意図される。本発明のオリゴヌクレオチドは、1つ以上の代替ヌクレオシド又はヌクレオチド（例えば、本明細書に記載されるものを含む）を含み得る。オリゴヌクレオチドは、糖部分又は核酸塩基を欠くが、依然として標的配列と対合を形成するか、又は標的配列にハイブリダイズすることができる、組成物を含むことも理解される。

20

30

【0055】

本開示の文脈において、「化合物」及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的に使用され得る。しかしながら、「化合物」という用語の範囲内に入るのは、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドを含む（includes）か又は含み（comprises）、1つ以上の追加の部分を含み（including）か又は含む（comprising）、化合物であり得る。

40

【0056】

「キメラ」オリゴヌクレオチド又は「キメラ」は、本発明の文脈において、2つ以上の化学的に異なる領域を含むオリゴヌクレオチドであり、各々は、少なくとも1つのモノマー単位、すなわち、オリゴヌクレオチドの場合、ヌクレオチド又はヌクレオシドから構成される。キメラオリゴヌクレオチドはまた、「ギャップマー」を含む。

50

【0057】

オリゴヌクレオチドは、RNAse H 媒介経路を介して所望の標的 RNA の特異的分解を可能にする任意の長さであり得、約 10～30 塩基対長、例えば、約 15～30 塩基対長又は約 16～22（例えば、18～20）塩基対長、例えば、約 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は 30 塩基対長、例えば、約 15～30、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、又は 21～22 塩基対長の範囲であり得る。上に列挙した範囲及び長さの中間の範囲及び長さも、本発明の一部であると考える。

10

【0058】

本明細書で使用される場合、「核酸塩基配列を含むオリゴヌクレオチド」という用語は、標準的なヌクレオチド命名法を使用して言及される配列によって記載されるヌクレオチド又はヌクレオシドの鎖を含む、オリゴヌクレオチドを指す。

20

【0059】

「連続核酸塩基領域」という用語は、標的核酸に相補的なオリゴヌクレオチドの領域を指す。この用語は、本明細書において、「連続ヌクレオチド配列」又は「連続核酸塩基配列」という用語と互換的に使用され得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの全てのヌクレオチドは、連続ヌクレオチド又はヌクレオシド領域に存在する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、連続ヌクレオチド領域を含んでおり、任意選択で、更なるヌクレオチド又はヌクレオシド、例えば、官能基を連続ヌクレオチド配列に結合させるために使用され得るヌクレオチドリナー領域を含み得る。ヌクレオチドリナー領域は、標的核酸に対して相補的であってもなくてもよい。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド領域のヌクレオチド間に存在するヌクレオシド間連結は、全てホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド領域は、1つ以上の糖修飾ヌクレオシドを含む。

30

【0060】

本明細書で使用される「ギャップマー」という用語は、1つ以上の親和性増強代替ヌクレオシド（ウィング又はフランク）を含む領域が 5' 及び 3' に隣接している RNAse H 動員オリゴヌクレオチド（ギャップ）の領域を含む、オリゴヌクレオチドを指す。様々なギャップマー設計が本明細書に記載される。ヘッドマー及びテイルマーは、ウィングの1つが欠失している、すなわち、オリゴヌクレオチドの末端の1つのみが親和性増強代替ヌクレオシドを含む、RNAse H を動員することができるオリゴヌクレオチドである。ヘッドマーについては、3' ウィングが欠失しており（すなわち、5' ウィングが親和性増強代替ヌクレオシドを含む）、テイルマーについては、5' ウィングが欠失している（すなわち、3' ウィングが親和性増強代替ヌクレオシドを含む）。「混合ウィングギャップマー」は、ウィング領域が、少なくとも1つの代替ヌクレオシド、例えば少なくとも1つの DNA ヌクレオシド又は少なくとも1つの 2' 置換代替ヌクレオシド、例えば 2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA（MOE）、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-RNA、2'-F-ANA ヌクレオシド、又は二環式ヌクレオシド（例えば、ロックドヌクレオシド又は拘束エチル（cEt）ヌクレオシド）などを含む、ギャップマーを指す。いくつかの実施形態では、混合ウィングギャップマーは、代替ヌクレオシド（例えば、5' 又は 3'）を含む一方のウィングを有し、他方のウィング（それぞれ 3' 又は 5'）は、2' 置換され

40

50

た代替ヌクレオシドを含む。

【0061】

「リンカー」又は「連結基」という用語は、1つ以上の共有結合を介して、1つの目的の化学基又はセグメントを、別の目的の化学基又はセグメントに連結する、2つの原子間の接続である。コンジュゲート部分は、オリゴヌクレオチドに直接、又は連結部分（例えば、リンカー又はテザー）を介して結合することができる。リンカーは、第3の領域、例えば、コンジュゲート部分をオリゴヌクレオチド（例えば、領域A又はCの末端）に共有結合的に接続する働きをする。本発明のいくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲート又はオリゴヌクレオチドコンジュゲートは、任意選択で、オリゴヌクレオチドとコンジュゲート部分との間に位置付けられたリンカー領域を含んでもよい。いくつかの実施形態では、コンジュゲートとオリゴヌクレオチドとの間のリンカーは生体切断可能である。ホスホジエステル含有生体切断可能リンカーは、国際公開第2014/076195号（参照により本明細書に組み込まれる）に、より詳細に記載されている。

10

【0062】

本明細書で使用される場合、別段の指示がない限り、「相補的」という用語は、第1のヌクレオチド又はヌクレオシド配列を第2のヌクレオチド又はヌクレオシド配列に対して説明するために使用される場合、当業者によって理解されるように、第1のヌクレオチド又はヌクレオシド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドが、ある特定の条件下で、第2のヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドとハイブリダイズし、二重鎖構造を形成する能力を指す。このような条件は、例えば、厳格な条件であり得、厳格な条件としては、400mMのNaCl、40mMのPIPES pH 6.4、1mMのEDTA、50℃、又は70℃で12～16時間、続いて洗浄することが挙げられ得る（例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照）。他の条件、例えば、生物の内部で遭遇し得る生理学的に関連する条件が適用され得る。当業者は、ハイブリダイズしたヌクレオチド又はヌクレオシドの最終的な用途に従って、2つの配列の相補性の試験に最も適切な条件のセットを決定することができる。

20

【0063】

本明細書で使用される場合、「相補的」配列はまた、ハイブリダイズする能力に関する上記の要件が満たされる限り、非ワトソン-クリック塩基対並びに／又は非天然及び代替のヌクレオチド若しくはヌクレオシドから形成される塩基対を含み得るか、又はそれらから完全に形成され得る。このような非ワトソン-クリック塩基対としては、G:Uゆらぎ塩基対又はフーグスティーン塩基対が挙げられるが、これに限定されない。本明細書に記載のオリゴヌクレオチドと標的配列との間の相補的配列は、第1のヌクレオチド又はヌクレオシド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの、第2のヌクレオチド又はヌクレオシド配列を含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドへの、一方又は両方のヌクレオチド又はヌクレオシド配列の全長にわたる塩基対合を含む。このような配列は、本明細書で互いに「完全に相補的」と称することができる。しかし、本明細書において第1の配列が第2の配列に関して「実質的に相補的」とであると称される場合、2つの配列は完全に相補的であり得るか、又はそれらの最終的な用途、例えば、RNase H媒介経路を介する遺伝子発現の阻害に最も関連する条件下でハイブリダイズする能力を保持しながら、最大30塩基対の二重鎖についてのハイブリダイゼーションの際に、1つ以上であるが、概ね5、4、3、又は2つ以下のミスマッチ塩基対を形成し得る。「実質的に相補的」はまた、目的のmRNA（例えば、PCDH19をコードするmRNA）の連続部分に実質的に相補的であるポリヌクレオチドを指すこともできる。例えば、配列が、PCDH19をコードするmRNAの中断されていない部分に実質的に相補的である場合、ポリヌクレオチドは、PCDH19 mRNAの少なくとも一部に相補的である。

30

40

【0064】

本明細書で使用される場合、「相補性領域」という用語は、内因性遺伝子（例えば、P

50

C D H 1 9) の発現を妨害するように、遺伝子、一次転写産物、配列 (例えば、標的配列、例えば、P C D H 1 9ヌクレオチド配列)、又はプロセシングされたm R N Aの全て又は一部分に実質的に相補的である、オリゴヌクレオチド上の領域を指す。相補性領域が標的配列に完全に相補的でない場合、ミスマッチは分子の内部領域又は末端領域に存在し得る。概して、最も許容されるミスマッチは、末端領域内、例えば、オリゴヌクレオチドの5'末端及び／又は3'末端の5、4、3、又は2ヌクレオチド以内にある。

【0065】

参照ポリヌクレオチド又はポリペプチド配列に関する「パーセント (%) 配列同一性」は、配列を整列させ、最大パーセント配列同一性を達成するために必要に応じてギャップを導入した後の、参照ポリヌクレオチド又はポリペプチド配列中の核酸又はアミノ酸と同一である候補配列中の核酸又はアミノ酸のパーセンテージとして定義される。パーセント核酸又はアミノ酸配列同一性を決定する目的のための整列は、例えば、B L A S T、B L A S T - 2、又はM e g a l i g nソフトウェアなどの公けに入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して、当業者の能力の範囲内である様々な方法で達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大の整列を達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列を整列するための適切なパラメータを決定することができる。例えば、パーセント配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムB L A S Tを使用して生成され得る。例示として、所与の核酸又はアミノ酸配列Aの、所与の核酸又はアミノ酸配列Bに対する、それとの、又はそれに対してのパーセント配列同一性 (代替的に、所与の核酸又はアミノ酸配列Aが、所与の核酸又はアミノ酸配列Bに対する、それとの、又はそれに対してのある特定のパーセント配列同一性を有すると言い換えることができる) は、以下のように計算される。

$$100 \times (\text{分数 } X / Y)$$

式中、Xは、AとBとのプログラムの整列において配列整列プログラム (例えば、B L A S T) によって同一のマッチとしてスコア付けされたヌクレオチド又はアミノ酸の数であり、式中、Yは、B中の核酸の総数である。核酸又はアミノ酸配列Aの長さが核酸又はアミノ酸配列Bの長さに等しくない場合、A対Bの配列同一性パーセントは、B対Aの配列同一性パーセントに等しくないことが理解されよう。

【0066】

本明細書で使用される場合、「ハイブリダイゼーション」は、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドとP C D H 1 9ヌクレオチド配列、例えばm R N A又はプレm R N A転写産物との間などの、核酸の実質的に相補的な鎖の対合を意味する。対合の1つの機構は、核酸の鎖の相補的核酸塩基間の、ワトソン-クリック、フーグスティーン又は逆フーグスティーン水素結合であり得る、水素結合を伴う。例えば、アデニン及びチミン又はウラシルは、水素結合の形成を介して対合する相補的ヌクレオチドである。ハイブリダイゼーションは、様々な状況下で起こり得る。本明細書で使用される「特異的にハイブリダイズする」への言及は、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、変異型P C D H 1 9対立遺伝子などの1つのP C D H 1 9対立遺伝子中の標的領域にハイブリダイズし、野生型P C D H 1 9対立遺伝子などの別のP C D H 1 9対立遺伝子中の同じ標的領域にハイブリダイズしないことを意味する。

【0067】

本明細書で使用される場合、「P C D H 1 9のレベル及び／又は活性を低下させる薬剤」は、細胞又は対象におけるP C D H 1 9のレベルを低下させるか、又はその発現を阻害する、任意のポリヌクレオチド薬剤 (例えば、オリゴヌクレオチド、例えば、A S O) を指す。本明細書で使用される「P C D H 1 9の発現を阻害する」という句は、任意のP C D H 1 9遺伝子 (例えば、マウスP C D H 1 9遺伝子、ラットP C D H 1 9遺伝子、サルP C D H 1 9遺伝子、又はヒトP C D H 1 9遺伝子など) の阻害に加えて、P C D H 1 9タンパク質をコードするP C D H 1 9遺伝子の変異体又は変異型の発現の阻害を含む。したがって、P C D H 1 9遺伝子は、野生型P C D H 1 9遺伝子、変異型P C D H 1 9遺伝子 (例えば、挿入、欠失、ナンセンス変異型、ミスセンス変異型、フレームシフト変異型

）、又は遺伝子操作された細胞、細胞群、若しくは生物の文脈におけるトランスジェニックPCDH19遺伝子であり得る。

【0068】

「PCDH19の活性を低下させる」とは、PCDH19に関連する活性（例えば、イオンチャネル機能）のレベルを低下させることを意味する。PCDH19の活性レベルは、当該技術分野で公知の任意の方法を使用して（例えば、標準的な生物物理学的方法を使用して）測定され得る。

【0069】

「PCDH19のレベルを低下させる」とは、例えば、オリゴヌクレオチドを細胞又は対象に投与することによって、細胞又は対象におけるPCDH19の量を減少させることを意味する。PCDH19のレベルは、当該技術分野で公知の任意の方法を使用して（例えば、細胞又は対象におけるPCDH19 mRNAのレベル又はPCDH19タンパク質のレベルを測定することによって）測定され得る。

【0070】

本明細書で使用される場合、「阻害剤」という用語は、タンパク質（例えば、PCDH19）のレベル及び／又は活性を低下させる任意の薬剤を指す。阻害剤の非限定的な例としては、ポリヌクレオチド（例えば、オリゴヌクレオチド、例えば、ASO）が挙げられる。本明細書で使用される場合、「阻害する」という用語は、「低減する」、「サイレンシングする」、「下方制御する」、「抑制する」、及び他の類似の用語と互換的に使用され、任意のレベルの阻害を含む。

【0071】

本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチドなどの「細胞をオリゴヌクレオチドと接触させる」という句は、任意の可能な手段によって細胞を接触させることを含む。細胞をオリゴヌクレオチドと接触させることは、細胞をインビトロでオリゴヌクレオチドと接触させること、又は細胞をインビボでオリゴヌクレオチドと接触させること、を含む。接触は、直接的又は間接的に行われ得る。したがって、例えば、オリゴヌクレオチドは、本方法を実施する個体によって細胞と物理的に接触させられ得るか、あるいは、オリゴヌクレオチド剤は、それが続いて細胞と接触することを可能にするか又は引き起こす状況に置かれ得る。

【0072】

細胞をインビトロ又はエクスビボで接触させることは、例えば、細胞をオリゴヌクレオチドとインキュベートすることによって行うことができる。細胞をインビボで接触させることは、例えば、細胞が位置する組織に若しくはその付近にオリゴヌクレオチドを注射することによって、又はオリゴヌクレオチド剤を別の領域、例えば血流若しくは皮下空間に注射して、その後、薬剤が、接触させる細胞が位置する組織に到達するようにすることによって、行われ得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドを目的の部位、例えば、肝臓に指向させるリガンド、例えば、GalNAc3を含有し得る、及び／又はそれに結合され得る。インビトロ、エクスビボ、及びインビボでの接触方法の組み合わせも可能である。例えば、細胞はまた、オリゴヌクレオチドとインビトロで接触し、続いて対象に移植され得る。

【0073】

一実施形態では、細胞をオリゴヌクレオチドと接触させることは、細胞への取り込み又は吸収を促進又は達成することによって、オリゴヌクレオチドを細胞に「導入する」又は「送達する」ことを含む。ASOの吸収又は取り込みは、補助されていない拡散若しくは活性な細胞プロセスを介して、又は補助剤若しくはデバイスによって、起こり得る。オリゴヌクレオチドの細胞への導入は、インビトロ、エクスビボ、及び／又はインビボであり得る。例えば、インビボでの導入のために、オリゴヌクレオチドは、組織部位に注射され得るか、又は全身投与され得る。細胞へのインビトロでの導入は、エレクトロポレーション及びリポフェクションなどの当該技術分野で公知の方法を含む。更なるアプローチは、本明細書において以下に記載され、及び／又は当該技術分野において公知である。

【0074】

本明細書で使用される場合、「脂質ナノ粒子」又は「LNP」は、核酸分子、例えばオリゴヌクレオチドなどの薬学的に活性な分子を封入する脂質層を含む小胞である。LNPは、安定な核酸-脂質粒子を指す。LNPは、典型的には、カチオン性脂質、非カチオン性脂質、及び粒子の凝集を防止する脂質（例えば、PEG-脂質コンジュゲート）を含有する。LNPは、例えば、米国特許第6,858,225号、同第6,815,432号、同第8,158,601号、及び同第8,058,069号（その内容全体は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0075】

本明細書で使用される場合、「リポソーム」という用語は、少なくとも1つの二重層（例えば、1つの二重層又は複数の二重層）に配置された両親媒性脂質から構成される小胞を指す。リポソームは、親油性材料及び水性内部から形成される膜を有する単層及び多層小胞を含む。水性部分は、オリゴヌクレオチド組成物を含有する。親油性材料は、典型的にはオリゴヌクレオチド組成物を含まないがいくつかの例では含んでもよい、水性外部から水性内部を隔離する。リポソームとしてはまた、「立体的に安定化された」リポソームも挙げられ、この用語は、本明細書で使用される場合、1つ以上の特化された脂質を含むリポソームを指し、この脂質は、リポソームに組み込まれた場合、このような特化された脂質を欠くリポソームと比較して、循環寿命の延長を生じる。

【0076】

「ミセル」は、本明細書において、分子の全ての疎水性部分が内側に向けられ、親水性部分を周囲の水相と接触させたままにするように、両親媒性分子が球状構造に配置されている、特定のタイプの分子集合体として定義される。環境が疎水性である場合、逆の配置が存在する。

【0077】

本明細書で使用される場合、「アンチセンス」という用語は、内因性遺伝子（例えば、PCDH19）の発現を妨害するように、遺伝子、一次転写産物、又はプロセシングされたmRNAの全部又は一部分に十分に相補的であるオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含む、核酸を指す。「相補的」ポリヌクレオチドは、標準的なワトソン-クリック相補性規則に従って塩基対合することができるものである。具体的には、プリンはピリミジンと塩基対合して、シトシンと対合したグアニン（G:C）と、DNAの場合はチミンと対合したアデニン（A:T）、又は、RNAの場合は、ウラシルと対合したアデニン（A:U）と、の組み合わせを形成する。2つのポリヌクレオチドは、互いに完全に相補的でない場合であっても、各々が他方に対して実質的に相補的である少なくとも1つの領域を有する限り、互いにハイブリダイズし得ることが理解される。

【0078】

本明細書で使用される場合、本明細書に記載される（例えば、細胞又は対象における）PCDH19のレベル及び／又は活性を低下させる薬剤の「有効量」、「治療有効量」、及び「十分な量」という用語は、ヒトを含む対象に投与された場合に、臨床結果を含む有益な又は所望の結果をもたらすのに十分な量を指し、したがって、「有効量」又はその同義語は、それが適用される状況に応じて異なる。例えば、PCDH19関連障害を治療する状況において、それは、PCDH19のレベル及び／又は活性を低下させる薬剤を投与せずに得られる奏功と比較して、治療奏功を達成するのに十分な、PCDH19のレベル及び／又は活性を低下させる薬剤の量である。そのような量に対応する、本明細書に記載されるPCDH19のレベル及び／又は活性を低下させる所与の薬剤の量は、所与の薬剤、医薬製剤、投与経路、疾患若しくは障害のタイプ、治療される対象の同一性（例えば、年齢、性別、及び／又は体重）又は宿主などの様々な因子に応じて変化するが、それにもかかわらず、当業者によって通常的に決定することができる。また、本明細書で使用される場合、本開示のPCDH19のレベル及び／又は活性を低下させる薬剤の「治療有効量」は、対照と比較して、対象において有益な又は所望の結果をもたらす量である。本明細書で定義される場合、本開示のPCDH19のレベル及び／又は活性を低下させる薬剤の

10

20

30

40

50

治療有効量は、当該技術分野で公知の通常の方法によって当業者によって容易に決定され得る。投与量レジメンは、最適の治療奏功が得られるように調整され得る。

【0079】

「予防有効量」は、本明細書で使用される場合、PCDH19関連障害を有する対象又はPCDH19関連障害を有する素因がある対象に投与された場合に、疾患又は疾患の1つ以上の症状を予防又は改善するのに十分である、オリゴヌクレオチドの量を含むことが意図される。疾患の改善としては、疾患の経過を遅らせること、又は後に発症する疾患の重症度を低下させることが挙げられる。「予防有効量」は、オリゴヌクレオチド、薬剤が投与される方法、疾患のリスクの程度、及び病歴、年齢、体重、家族歴、遺伝子構成、先行又は併用治療のタイプ（存在する場合）、及び治療される対象の他の個々の特徴に応じて変化し得る。予防有効量はまた、例えば、本明細書に記載される（例えば、細胞又は対象における）PCDH19のレベル及び／又は活性を低下させる薬剤の量を指し、ヒトを含む対象に投与された場合に、本明細書に記載されるPCDH19関連障害の発症を、予測される発症と比較して、少なくとも120日、例えば、少なくとも6ヶ月、少なくとも12ヶ月、少なくとも2年、少なくとも3年、少なくとも4年、少なくとも5年、少なくとも10年以上遅延させるのに十分な量を指す。

10

【0080】

「治療有効量」又は「予防有効量」はまた、任意の治療に適用可能な妥当なベネフィット／リスク比でいくつかの所望の局所的又は全身的効果をもたらすオリゴヌクレオチドの量（単回用量又は複数回用量のいずれかで投与される）を含む。本発明の方法に使用されるオリゴヌクレオチドは、そのような治療に適用可能な妥当なベネフィット／リスク比をもたらすのに十分な量で投与され得る。

20

【0081】

本明細書で使用される場合、「PCDH19関連障害を有すると同定された対象」という用語は、PCDH19関連障害又はその症状の同定など、PCDH19関連障害の分子的若しくは病理学的状態、疾患又は症状を有すると同定された対象を指すか、又は特定の治療レジメンから利益を得る可能性がある、PCDH19関連障害を有する若しくは有する疑いのある対象の同定を指す。

【0082】

本明細書で使用される場合、「PCDH19関連障害」は、PCDH19の異常な機能の特徴とする遺伝子疾患又は障害の分類を指す。PCDH19関連障害としては、例えば、統合失調症、自閉症、及びてんかんが挙げられる。例えば、てんかんは、早期乳児てんかん性脳症9（EIEE9）などの早期乳児てんかん性脳症を含む、てんかん性脳症であり得る。

30

【0083】

「タンパク質のレベルを決定する」とは、直接的又は間接的のいずれかの当該技術分野で公知の方法による、タンパク質又はタンパク質をコードするmRNAの検出を意味する。「直接的に決定する」とは、物理的実体又は値を得るためにプロセスを実施すること（例えば、試料に対してアッセイ若しくは試験を実施すること、又はその用語が本明細書で定義される「試料を分析すること」）を意味する。「間接的に決定する」とは、別の当事者又は供給源（例えば、物理的実体又は値を直接取得した第三者検査室）から、物理的実体又は値を受け取ることを指す。タンパク質レベルを測定するための方法としては、概して、ウェスタンブロッティング、イムノブロッティング、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、免疫沈降、免疫蛍光、表面プラズモン共鳴、化学発光、蛍光偏光、リン光、免疫組織化学分析、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型（MALDI-TOF）質量分析、液体クロマトグラフィー（LC）質量分析、マイクロサイトメトリー、顕微鏡法、蛍光活性化細胞選別（FACS）、及びフローサイトメトリー、並びに酵素活性又は他のタンパク質パートナーとの相互作用を含むがこれらに限定されないタンパク質の特性に基づくアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。mRNAレベルの測定方法は、当該技術分野で知られている。

40

50

【0084】

「レベル」とは、任意選択で参照と比較した、タンパク質、又はタンパク質（例えば、PCDH19）をコードするmRNAの、レベル又は活性を意味する。参照は、本明細書で定義される、任意の有用な参照であり得る。タンパク質の「低下したレベル」又は「上昇したレベル」とは、参照と比較したタンパク質レベルの低下又は上昇（例えば、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約100%、約150%、約200%、約300%、約400%、約500%、若しくはそれ以上の低下若しくは上昇；参照と比較して、約10%、約15%、約20%、約50%、約75%、約100%、若しくは約200%を超える低下若しくは上昇；約0.01倍、約0.02倍、約0.1倍、約0.3倍、約0.5倍、約0.8倍未満、若しくはそれ未満の低下若しくは上昇；又は、約1.2倍、約1.4倍、約1.5倍、約1.8倍、約2.0倍、約3.0倍、約3.5倍、約4.5倍、約5.0倍、約10倍、約15倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約100倍、約1000倍、若しくはそれ以上の上昇）を意味する。タンパク質のレベルは、質量／体積（例えば、g/dL、mg/mL、μg/mL、及びng/mL）又は試料中の総タンパク質若しくはmRNAに対するパーセンテージで表され得る。

10

【0085】

「医薬組成物」という用語は、本明細書で使用される場合、薬学的に許容される賦形剤と共に製剤化され、好ましくは、哺乳動物における疾患の治療のための治療レジメンの一部として政府規制機関の承認を得て製造又は販売される、本明細書に記載の化合物を含有する組成物を表す。医薬組成物は、例えば、単位剤形での経口投与用（例えば、錠剤、カプセル、カプレット、ゲルキャップ、又はシロップとして）；局所投与用（例えば、クリーム、ゲル、ローション、又は軟膏として）；静脈内投与用（例えば、粒子状塞栓を含まない無菌溶液として、静脈内使用に適した溶媒系中）；髄腔内注射用；脳室内注入用；実質内注入用；又は任意の他の薬学的に許容される製剤で製剤化することができる。

20

【0086】

本明細書で使用される「薬学的に許容される賦形剤」は、本明細書に記載される化合物以外の、対象において実質的に非毒性及び非炎症性である特性を有する、任意の成分（例えば、活性化化合物を懸濁又は溶解することができるビヒクル）を指す。賦形剤には、例えば、付着防止剤、抗酸化剤、結合剤、コーティング、圧縮助剤、崩壊剤、色素（着色剤）、皮膚軟化剤、乳化剤、充填剤（希釈剤）、フィルム形成剤又はコーティング、香料、香料、流動促進剤（流動の促進剤）、潤滑剤、保存剤、印刷インク、吸着剤、懸濁剤又は分散剤、甘味料、及び水和水が含まれ得る。例示的な賦形剤としては、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム（二塩基性）、ステアリン酸カルシウム、クロスカルメロース、架橋ポリビニルピロリドン、クエン酸、クロスポビドン、システイン、エチルセルロース、ゼラチン、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、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、マルチトール、マンニトール、メチオニン、メチルセルロース、メチルパラベン、微結晶性セルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、アルファ化デンプン、プロピルパラベン、パルミチン酸レチニル、シェラック、二酸化ケイ素、カルボキシメチルセルロースナトリウム、クエン酸ナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウム、ソルビトール、デンプン（トウモロコシ）、ステアリン酸、スクロース、タルク、二酸化チタン、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンC、及びキシリトールが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0087】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される塩」という用語は、本明細書に記載される化合物のうちのいずれかの化合物の任意の薬学的に許容される塩を意味する。例えば、本明細書に記載される化合物のいずれかの薬学的に許容される塩としては、正しい医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー応答を伴わずにヒト及び動物の組織

50

と接触させて使用するのに好適であるものが挙げられ、これは、妥当なベネフィット／リスク比に見合っている。薬学的に許容される塩は、当該技術分野でよく知られている。例えば、薬学的に許容される塩は、Berge et al., J. Pharmaceutical Sciences 66:1-19, 1977及びPharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, (Eds. P. H. Stahl及びC. G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008に記載されている。塩は、本明細書に記載の化合物の最終的な単離及び精製中にインサイチュで、又は遊離塩基を好適な有機酸と反応させることによって別個に、調製することができる。

【0088】

本明細書に記載の化合物は、薬学的に許容される塩として調製することができるように、イオン化可能な基を有し得る。これらの塩は、無機酸若しくは有機酸を含む酸付加塩であり得、又は塩は、本明細書に記載される化合物の酸性形態の場合、無機塩基若しくは有機塩基から調製され得る。多くの場合、化合物は、薬学的に許容される酸又は塩基の付加生成物として調製される薬学的に許容される塩として調製又は使用される。好適な薬学的に許容される酸及び塩基並びに適切な塩の調製のための方法は、当該技術分野で周知である。塩は、無機及び有機の酸及び塩基を含む、薬学的に許容される非毒性の酸及び塩基から調製され得る。代表的な酸付加塩としては、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、カンファースルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキサン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチニン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバリン酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、及び吉草酸が挙げられる。代表的なアルカリ金属塩又はアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、及びマグネシウム、並びにアンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、及びエチルアミンを含むがこれらに限定されない非毒性アンモニウム、第四級アンモニウム、及びアミンカチオンが挙げられる。

【0089】

「参照」とは、タンパク質又はmRNAのレベル又は活性を比較するために使用される任意の有用な参照を意味する。参照は、比較目的のために使用される任意の試料、標準、標準曲線、又はレベルであり得る。参照は、正常参照試料又は参照標準若しくはレベルであり得る。「参照試料」は、例えば、対照、例えば「正常対照」などの所定の陰性対照値、又は同じ対象から採取された以前の試料、正常細胞若しくは正常組織などの正常な健康対象からの試料、疾患を有していない対象からの試料（例えば、細胞若しくは組織）、疾患と診断されているが、本明細書に記載の化合物でまだ治療されていない対象からの試料、本明細書に記載の化合物によって治療された対象からの試料、又は既知の正常濃度の精製タンパク質（例えば、本明細書に記載されるいずれか）の試料であり得る。「参照標準又はレベル」とは、参照試料に由来する値又は数を意味する。「正常対照値」は、非疾患状態を示す所定の値、例えば、健康な対照対象において予想される値である。典型的には、正常対照値は、範囲（「XとYとの間」）、高閾値（「X以下」）、又は低閾値（「X以上」）として表される。特定のバイオマーカーについての正常対照値内の測定値を有する対象は、典型的には、そのバイオマーカーについて「正常範囲内」と称される。正常参照標準又はレベルは、疾患又は障害（例えば、PCDH19関連障害）を有していない正

10

20

30

40

50

常な対象、及び本明細書に記載の化合物で治療された対象、に由来する値又は数とすることができる。好ましい実施形態では、参照試料、標準、又はレベルは、以下の基準：年齢、体重、性別、疾患ステージ、及び全体的な健康状態のうちの少なくとも1つによって、試料、すなわち対象試料に適合される。正常参照範囲内の精製タンパク質、例えば、本明細書に記載のいずれかのレベルの標準曲線もまた、参照として使用することができる。

【0090】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、本発明による組成物が、例えば、実験目的、診断目的、予防目的、及び／又は治療目的のために投与され得る、任意の生物を指す。典型的な対象としては、任意の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、及びヒトなどの哺乳動物）が挙げられる。対象は、治療を求めているもよく、若しくは治療を必要としていてもよく、治療を要求していてもよく、治療を受けていてもよく、将来治療を受けてもよく、又は特定の疾患若しくは状態について訓練された専門家によってケア中であるヒト若しくは動物体であってもよい。対象は、新生児（newborn）、新生児（neonate）、乳児、幼児、青年、又は成人などの任意の年齢のものであってもよい。対象は、生まれる前であってもよい。

【0091】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療された」、又は「治療すること」という用語は、治療的処置及び予防的（prophylactic）又は防止的（preventative）手段の両方を意味し、その目的は、望まない生理学的状態、障害、若しくは疾患を予防若しくは遅延（軽減）すること、又は有益な若しくは所望の臨床結果を得ることである。有益又は所望の臨床結果としては、症状の緩和；状態、障害、若しくは疾患の程度の減少；状態、障害、若しくは疾患の安定した（すなわち、悪化していない）状態；状態、障害、若しくは疾患の進行の発症の遅延若しくは減速；検出可能であろうと検出不能であろうと、（部分的であろうと全体的であろうと）状態、障害、若しくは疾患状態の改善若しくは寛解；対象によって必ずしも識別可能ではない、少なくとも1つの測定可能な身体的パラメータの改善；又は状態、障害、若しくは疾患の増強若しくは改善が挙げられるが、これに限定されない。治療は、過剰なレベルの副作用を伴わずに臨床的に有意な奏功を誘発することを含む。治療はまた、治療を受けない場合に予想される生存期間と比較して、生存期間を延長することを含む。

【0092】

本明細書で使用される場合、「変異体」及び「誘導体」という用語は、互換的に使用され、本明細書に記載される化合物、ペプチド、タンパク質、又は他の物質の天然に存在する類似体、合成類似体、及び半合成類似体を指す。本明細書に記載される化合物、ペプチド、タンパク質、又は他の物質の変異体又は誘導体は、元の材料の生物学的活性を保持又は改善し得る。

【0093】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細は、下記の説明に記載される。本発明の他の特徴、目的、及び利点は、本明細書及び特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【発明を実施するための形態】

【0094】

本発明の実施形態によれば、細胞におけるPCDH19レベル及び／又は活性の阻害又は枯渇は、PCDH19関連障害の治療において有効である。したがって、本発明は、例えば、必要とする対象において、PCDH19関連障害を治療するための有用な組成物及び方法の特徴とする。本発明は、PCDH19遺伝子を標的とする一本鎖オリゴヌクレオチドの特徴とする。オリゴヌクレオチド（例えば、化学修飾オリゴヌクレオチド）は、PCDH19関連障害（例えば、てんかん、統合失調症、及び自閉症）を有する対象に、PCDH19関連障害を治療し、その症状を軽減し、又は予防するために投与され得る。オリゴヌクレオチドは、PCDH19（例えば、pre-mRNA及びプロセシングされたmRNAを含むPCDH19 mRNA）の標的領域に対してアンチセンス（例えば、少なくとも部分的に相補的）である。投与後、オリゴヌクレオチドは、PCDH19（例えば、

PCDH19 mRNA及び／又はタンパク質）のレベル、発現、及び／又は活性を低下させ、それによって、PCDH19関連障害を有する対象に治療効果をもたらす。

【0095】

PCDH19関連障害

PCDH19は、発達中の脳において主に発現されるカドヘリンファミリータンパク質である。PCDH19をコードする遺伝子は、X染色体の長（q）アーム上の22.1位に位置する。その機能は完全に解明されていないが、カルシウム依存性細胞接着において役割を果たすと考えられる。完全長ヒトプロセッシングPCDH19 mRNAは9765ヌクレオチド長であり、エクソン2が代替的にスプライシングされている。

【0096】

例示的なヒトPCDH19遺伝子には、NCBI参照番号NC_000023.11（配列番号1）、NG_021319.1、NM_001105243.1、NM_001184880.1、及びNM_020766.2に示されるヌクレオチド配列を有するもの、並びに一塩基多型を含有する変異体を含むそれらの変異体、例えば、様々な公けに利用可能なデータベース（例えば、ゲノムアグリゲーションデータベース（Genome Aggregation Database（gnomAD））（<http://gnomad.broadinstitute.org/>））に記載されているものが含まれる。ほんの一例として、PCDH19変異体は、配列番号1に示される配列に対して、少なくとも又は約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有し得る。

【0097】

PCDH19における変異（例えば、ミスセンス変異又はナンセンス変異）が、統合失調症、自閉症、及び初期乳児てんかん性脳症9（EIEE9）などのてんかんの特定の形態と関連付けられた。PCDH19はX染色体上に位置するので、EIEE9は固有のX連鎖遺伝様式に関連している。X連鎖変異は通常男性に影響を及ぼし、保因者女性には影響を及ぼさない。しかしながら、EIEE9は、継承する男性を害しない一方、保因者女性にのみ影響を及ぼす。EIEE9は女性のみに関連しており、モザイクPCDH19発現を受けた男性対象もまた、認知障害及び／又はてんかんになることが示された。モザイク現象は、PCDH19の異なる遺伝子型を発現する細胞の2つ以上の集団の存在を伴う。概して、変異は、特定の細胞において生じ（例えば、デノボ）、分裂中に娘細胞に伝えられるだけである。PCDH19関連障害に関連する既知の変異としては、N340S、E307K、V441E、Q85X、N557K、D594H、S671X、L677fsx717、I119fsX122、及びP364fsX375をコードする、変異が挙げられる。PCDH19関連障害に関連する他の既知の変異を以下の表1に列挙する。

【0098】

これらの変異の1つ以上を有する対象は、本明細書に記載される組成物及び方法で治療され得る。本明細書に記載のPCDH19関連障害（例えば、てんかん、自閉症、及び統合失調症）のいずれも、本明細書に記載のオリゴヌクレオチド（例えば、化学修飾オリゴヌクレオチド、例えば、ASO）を投与ことによって治療され、障害の症状を軽減又は排除し得る。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1. PCDH19 変異

DNA/タンパク質変異	名称	GRCh37 位置	GRCh38 染色体	GRCh38 位置	パリエーションID	対立遺伝子ID
1682C>G (p.Pro561Arg)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1006dup (p.Val336Glyfs)	99662590	X	100407592	521360	512551
1019A>C (p.Asn340Thr)	NM_001184880.1					
1700C>T (p.Pro567Leu)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1148G>A (p.Arg383His)	99662448	X	100407450	566197	575310
361G>A (p.Asp121Asn)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1281C>G (p.Asp427Glu)	99662315	X	100407317	533852	534955
424G>C (p.Ala142Pro)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1330A>G (p.Thr444Ala)	99662266	X	100407268	206296	203912
437C>G (p.Thr146Arg)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1335C>A (p.Asp445Glu)	99662261	X	100407263	206331	203911
593G>T (p.Arg198Leu)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1351C>T (p.Pro451Ser)	99662245	X	100407247	206332	203910
701A>G (p.Asn234Ser)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1355A>G (p.His452Arg)	99662241	X	100407243	568499	574230
134_135 del (D45G fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1382T>C (p.Ile461Thr)	99662214	X	100407216	206333	203908
152 dup T (A51R fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1384G>A (p.Val462Met)	99662212	X	100407214	432615	426389
1018A>T (p.Asn340Tyr)	NM_001184880.1					
1019A>G (p.Asn340Ser)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1419_1422delCTCT (p.Ser474Cysfs)	99662174 - 99662177	X	100407176 - 100407179	426961	415727
1031C>G (Asn340Arg)	NM_001184880.1(PCDH19):c.142G>T (p.Glu48Ter)	99663454	X	100408456	11020	26059
1031C>T (p.Pro344Leu)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1434C>T (p.Arg478=)	99662162	X	100407164	415290	404010
1036_1040dup(N347K fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1435G>A (p.Asp479Asn)	99662161	X	100407163	420880	411061
1049C>G (Ser350Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1442_1448delACCTGGG (p.Asp481Valfs)	99662148 - 99662154	X	100407150 - 100407156	465297	472034
1091delC (p.Pro364Argfs)	NM_001184880.1					
1091dupC (p.Tyr366Leufs)	NM_001184880.1					
1098C>G (p.Tyr366Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1465T>C (p.Ser489Pro)	99662131	X	100407133	450108	446442
1101delG (p.Ile368Serfs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1469A>C (p.Tyr490Ser)	99662127	X	100407129	451251	446441
1123G>T (D375V)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1478_1485delTGCCGTC G (p.Val493Alafs)	99662111 - 99662118	X	100407113 - 100407120	430517	422393
1129G>A (D377N)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1478T>A (p.Val493Glu)	99662118	X	100407120	408905	404419
1129G>C (D377H)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1521delC (p.Ile508Serfs)	99662075	X	100407077	429878	422392
1131C>A (D377E)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1521dup (p.Ile508Hisfs)	99662075	X	100407077	533849	534422
1143dupT (G381W fs)	NM_001184880.1					
1178C>T (P393L)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1555C>T (p.Arg519Ter)	99662041	X	100407043	533844	534418

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

(表 1 の続き)

DNA/タンパク質変異	名称	GRCh37 位置	GRCh38 染色体	GRCh38 位置	バリエーションID	対立遺伝子 ID
1183C>T (p.Arg395Ter)	NM_001184880.1					
1184G>C (R395P)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1625C>G (p.Ser542Ter)	99661971	X	100406973	206335	203906
1192G>T (E398Ter)	NM_001184880.1					
1240G>C (E414Q)	NM_001184880.1					
1240G>A (E414K)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1657_2616+3340del	99654184 - 99661941	X	100399184 - 100406941	565718	575309
1265_1266delCA (p.Thr422Asnfs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1671C>G (p.Asn557Lys)	99661925	X	100406927	11022	26061
1298C>T (L433P)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1676delA (p.Asn559Thrfs)	99661919 - 99661920	X	100406922	561073	552236
1300_1301 del (Q434E fs)	NM_001184880.1					
1322T>A (p.Val441Glu)	NM_001105243.1(PCDH19):c.1683_1696delGGTCATC ACAGCCC (p.Val562Thrfs)	99661900 - 99661913	X	100406902 - 100406915	206356	203903
1347_1348insAAC (N449_H450insN)	NM_001105243.1(PCDH19):c.1683G>A (p.Pro561=)	99661913	X	100406915	93672	99575
1352C>T (P451L)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1697C>A (p.Pro566Gln)	99661899	X	100406901	521852	512549
1375C>T (Q459Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.169C>T (p.Gln57Ter)	99663427	X	100408429	447917	442363
1376delA (p.Gln459Aargfs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1700C>T (p.Pro567Leu)	99661896	X	100406898	449356	446440
138_139delGinsTT (p.Arg47Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1720G>T (p.Glu574Ter)	99661876	X	100406878	425509	413843
1408_1417 del (A370S fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.172G>T (p.Ala58Ser)	99663424	X	100408426	588339	580730
142G>T (p.Glu48Ter)	NM_001105243.1(PCDH19):c.1752_1759delCTACCTG G (p.Tyr585Aspfs)	99661837 - 99661844	X	100406839 - 100406846	206357	203901
1456G>C (G486R)	NM_001184880.1					
1464_1466 del CTC (S489 del S)	NM_001184880.1					
1521dup (p.Ile508Hisfs)	NM_001184880.1					
1522_1528 del (I508P fs)	NM_001184880.1					
1537G>C (G513R)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1815C>G (p.Tyr605Ter)	99661781	X	100406783	445698	438970
1615G>C (G539R)	NM_001184880.1					
1628T>C L543P	NM_001184880.1(PCDH19):c.1853_1857delIACCAGins CGAAGTCAGAA (p.Asp618_Gln619delinsAlaLysSerGlu)	99661739 - 99661743	X	100406741 - 100406745	570838	573497
1649G>A (R550Q)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1854C>G (p.Asp618Glu)	99661742	X	100406744	576915	574221
1657_2616+3340del	NM_001184880.1(PCDH19):c.1855C>T (p.Gln619Ter)	99661741	X	100406743	206338	203899
1671C>G (p.Asn557Lys)	NM_001184880.1					

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

(表 1 の続き)

DNA/タンパク質変異	名称	GRCh37 位置	GRCh38 染色体	GRCh38 位置	バリエーションID	対立遺伝子 ID
1681C>T (P561S)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1864G>A (p.Gly622Ser)	99661732	X	100406734	589840	580590
1683_1696delGGTCATCA CAGCCC (p.Val562Thrfs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1873A>G (p.Arg625Gly) (p.Tyr585Aspfs)	99661723	X	100406725	206340	203898
1752_1759delCTACCTGG (p.Tyr585Aspfs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.1952dupC (p.Leu652Serfs)	99661644	X	100406646	206358	203895
1765_1766delGT V589C fs)	NM_001184880.1					
1780G>C (D594H)	NM_001105243.1(PCDH19):c.1956_1959delCTCT (p.Ser653Profs)	99661637 - 99661640	X	100406639 - 100406642	206369	203894
1786G>C (D596H)	NM_001105243.1(PCDH19):c.1958_1959dupCT (p.Ala654Leufs)	99661637 - 99661638	X	100406639 - 100406640	206359	203893
1787A>T (D596V)	NM_001105243.1(PCDH19):c.1969C>T (p.Leu657Phe)	99661627	X	100406629	159555	169842
1802G>A (G601D)	NM_001105243.1(PCDH19):c.199_207delTCGGCTCCA (p.Ser67_Pro69del)	99663389 - 99663397	X	100408391 - 100408399	206365	203952
1804C>T (R602Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2012C>G (p.Ser671Ter)	99661584	X	100406586	11018	26057
1825G>T (E609Ter)	NM_001184880.1					
1852G>A (D618N)	NM_001184880.1(PCDH19):c.202G>A (p.Ala68Thr)	99663394	X	100408396	425512	413846
1863 dup T (G622W fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.209_210del (p.His70Profs)	99663386 - 99663387	X	100408388 - 100408389	447918	442362
1864G>C (G622R)	NM_001184880.1(PCDH19):c.21_39del19 (p.Val8Tyrfs)	99663557 - 99663575	X	100408559 - 100408577	422077	411067
1924G>A (V642M)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2122A>T (p.Lys708Ter)	99661474	X	100406476	586210	577910
1955T>C (L652P)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2147+1G>A	99661448	X	100406450	489093	482227
1956_1959delCTCT (p.Ser653Profs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2147+2T>C	99661447	X	100406449	449522	446439
1958_1959dupCT (p.Ala654Leufs)	NM_001105243.1(PCDH19):c.218_219insG (p.Asp73Glu fs)	99663377 - 99663378	X	100408379 - 100408380	206367	203951
2012C>G (p.Ser671Ter)	NM_001184880.1					
2019 del C (S674L fs)	NM_001184880.1					
2030_2031insT (L677 fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2191G>A (p.Gly731Arg)	99658619	X	100403621	533846	534450
2147+2T>C	NM_001105243.1(PCDH19):c.2243delA (p.Glu748Gly fs)	99657754	X	100402756	206370	203888
215T>G (V72G)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2255A>G (p.Lys752Arg)	99658555	X	100403557	465298	470436
2156T>G (L719Ter)	NM_001105243.1(PCDH19):c.2258delA (p.Asn753Thrfs)	99657739	X	100402741	206360	203887

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

(表 1 の続き)

DNA／タンパク質変異	名称	GRCh37 位置	GRCh38 染色体	GRCh38 位置	バリエーシ ョンID	対立遺伝子 ID
2243delA (p.Glu748Glyfs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2263_2288+1dup	99658521 - 99658547	X	100403523 - 100403549	533850	534444
2341delA (p.Ile781Serfs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.228C>T (p.Pro76=)	99663368	X	100408370	193192	190357
2359C>T (R787C)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2308G>C (p.Gly770Arg)	99657830	X	100402832	573321	573492
241dupC (L81C fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2319G>T (p.Lys773Asn)	99657819	X	100402821	206345	203889
2453delA (p.Gln818Argfs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2341delA (p.Ile781Serfs)	99657797	X	100402799	408902	404418
253C>T (p.Gln85Ter)	NM_001184880.1					
2567delAGGGGCC, (Q856P fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2372G>A (p.Arg791Gln)	99657766	X	100402768	281920	266157
2656C>T (p.Arg886Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2391C>G (p.Asp797Glu)	99657747	X	100402749	533847	534410
2675-6A>G p.? (イントロン4／エクソン5)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2422A>T (p.Thr808Ser)	99657716	X	100402718	408907	404037
2675+1G>C p.? (エクソン／イントロン4)	NM_001184880.1					
2697dupA (E900R fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.242T>G (p.Leu81Arg)	99663354	X	100408356	575889	573500
269A>T (D90V)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2453delA (p.Gln818Argfs)	99657685	X	100402687	465300	471657
2705dupA (D902K fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2479C>G (p.Arg827Gly)	99657659	X	100402661	566027	573488
2903dupA (D968E fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2496C>T (p.Phe832=)	99657642	X	100402644	196321	193482
339C>A (C113Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2501dupA (p.Asn834Lysfs)	99657637	X	100402639	422860	411059
357delC (K120 fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2522G>A (p.Arg841His)	99657616	X	100402618	206302	203885
370G>A (D124N)	NM_001184880.1(PCDH19):c.253C>T (p.Gln85Ter)	99663343	X	100408345	11017	26056
415_423dup (S319_A141dup)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2564G>A (p.Ser855Asn)	99657574	X	100402576	206347	203884
416C>A (S139Ter)	NM_001184880.1					
445C>T (P149S)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2592T>A (p.Ile864=)	99657546	X	100402548	500578	492002
457G>A (A153T)	NM_001105243.1(PCDH19):c.2601A>G (p.Gln867=)	99597007	X	100342009	159557	169840
462C>A or G (Y154Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2617-7A>G	99605709	X	100350711	287548	271785
469G>A (D157N)	NM_001105243.1(PCDH19):c.2655C>T (p.Asn885=)	99596953	X	100341955	138601	142304
471C>A (D157E)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2656C>T (p.Arg886Ter)	99605663	X	100350665	206341	203882
473C>G (p.Ser158Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2657G>A (p.Arg886Gln)	99605662	X	100350664	579743	575308
488T>G (V163G)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2668A>G (p.Ile890Val)	99605651	X	100350653	206343	203881

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

(表 1 の続き)

DNA/タンパク質変異	名称	GRCh37 位置	GRCh38 染色体	GRCh38 位置	バリエーションID	対立遺伝子 ID
497_498 ins A (Y166ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2676-1_2683delGCAGCTCCA	99597066 - 99597074	X	100342068 - 100342076	420905	411058
498C>G (p.Tyr166Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.268G>C (p.Asp90His)	99663328	X	100408330	465301	471210
506 del C (T169S fs)	NM_001184880.1					
514 dup G (E172G fs)	NM_001184880.1					
569T>G (L190R)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2721T>C (p.Ser907=)	99597028	X	100342030	167420	177908
595G>C (E199Q)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2798A>G (p.Asp933Gly)	99596951	X	100341953	447919	442356
605C>A (S202 ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2828G>A (p.Gly943Glu)	99596921	X	100341923	465302	471655
608A>C & 617T>G (H203P & F206C)	NM_001105243.1(PCDH19):c.2834C>A (p.Ala945Glu)	99551747	X	100296749	159558	169839
619delC (p.Arg207Glu fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2849-2A>G	99551875	X	100296877	265682	260268
695A>G (p.Asn232Ser)	NM_001184880.1					
696T>A (p.Asn232Lys)	NM_001184880.1(PCDH19):c.295T>A (p.Cys99Ser)	99663301	X	100408303	421597	411064
697_700delinsTAAC (D233 ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2965A>C (p.Asn989His)	99551757	X	100296759	514057	507726
706C>T (P236S)	NM_001184880.1(PCDH19):c.2975C>T (p.Ala992Val)	99551747	X	100296749	374533	361419
718G>T (E240Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.298A>T (p.Ile100Phe)	99663298	X	100408300	206363	203949
729C>A (V243Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.301_303delATC (p.Ile101del)	99663293 - 99663295	X	100408295 - 100408297	206348	203948
730dupG (A244G fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3011C>T (p.Ala1004Val)	99551711	X	100296713	408906	404007
746A>G (E249G)	NM_001184880.1(PCDH19):c.301A>G (p.Ile101Val)	99663295	X	100408297	193194	190359
747A>T (E249D)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3021C>G (p.Asp1007Glu)	99551701	X	100296703	571607	575307
747C>T (L25P)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3057G>A (p.Gly1019=)	99551665	X	100296667	285391	269628
772_773 del (I258P fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3079G>A (p.Ala1027Thr)	99551643	X	100296645	206304	203876
78 del G (K26N fs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3095C>T (p.Thr1032Ile)	99551627	X	100296629	206305	203875
790G>C (D264H)	NM_001184880.1(PCDH19):c.311dup (p.Val105Gly fs)	99663285	X	100408287	503908	495607
799G>T (p.Glu267Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3127A>G (p.Ile1043Val)	99551595	X	100296597	449713	446438
823T>A (V275N)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3248A>G (p.Tyr1083Cys)	99551474	X	100296476	593456	584520
824A>C (V275N)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3262G>A (p.Ala1088Thr)	99551460	X	100296462	206306	203872
826T>C (S276P)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3319C>G (p.Arg1107Gly)	99551403	X	100296405	93675	99578

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

(表 1 の続き)

DNA/タンパク質変異	名称	GRCh37 位置	GRCh38 染色体	GRCh38 位置	バリエーションID	対立遺伝子 ID
83C>A (S28Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3341G>C (p.Arg1114Pro)	99551381	X	100296383	581970	572130
83C>A & 90A>G (S28* & E90E)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3352A>G (p.Ser1118Gly)	99551370	X	100296372	378327	377619
840C>G (V280Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3370G>C (p.Glu1124Gln)	99551352	X	100296354	575844	572128
859G>T (p.Glu287Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3379C>T (p.Pro1127Ser)	99551343	X	100296345	533855	534560
859G>T & 3319C>G (E287* & R1107G)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3398G>A (p.Arg1133His)	99551324	X	100296326	431843	426387
918C>G (p.Tyr306Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3405A>G (p.Lys1135=)	99551317	X	100296319	436167	430599
937G>A (E307K)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3437T>C (p.Ile1146Thr)	99551285	X	100296287	590086	580852
949C>T (Q317Ter)	NM_001184880.1(PCDH19):c.3439G>A (p.Val1147Ile)	99551283	X	100296285	206288	203869
958 dup G (D320G fs)	NM_001184880.1					
964G>C (G322R)	NM_001184880.1(PCDH19):c.361G>A (p.Asp121Asn)	99663235	X	100408237	427126	415728
966dupG (p.Pro323Alafs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.361G>C (p.Asp121His)	99663235	X	100408237	206309	203947
976_981delATCCGinsTT						
CCC (p.Ile326Phefs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.369C>A (p.Asn123Lys)	99663227	X	100408229	206310	203946
994delG (p.Val332Serfs)	NM_001184880.1(PCDH19):c.369C>G (p.Asn123Lys)	99663227	X	100408229	429767	422398
NC_000023.10:g.9966275 5delC	NM_001184880.1(PCDH19):c.370G>T (p.Asp124Tyr)	99663226	X	100408228	206311	203945
PCDH19, 5-BP DUP, NT1036	NM_001184880.1(PCDH19):c.372_373dup (p.Asn125Thrfs)	99663223 - 99663224	X	100408225 - 100408226	589933	580709
242T>G (p.Leu81Arg)	NM_001184880.1(PCDH19):c.619delC (p.Arg207Gluifs)	99662977	X	100407979	465307	472038
416C>T (p.Ser139Leu)	NM_001184880.1					
571G>C (p.Val191Leu)	NM_001184880.1(PCDH19):c.896C>T (p.Thr299Ile)	99662700	X	100407702	447922	442359
785C>A (p.Ala262Asp)	NM_001184880.1					
919G>A (p.Glu307Lys)	NC_000023.10:g.99662755delC	99662755			597883	588944
91G>A (p.Glu31Lys)	NM_001184880.1:c.2030dupT				11019	26058
全遺伝子欠失						

10

20

30

40

【0099】

オリゴヌクレオチド剤

細胞におけるPCDH19のレベル及び／又は活性（例えば、異常な活性）を低下させる本明細書に記載の薬剤は、例えば、ポリヌクレオチド、例えば、オリゴヌクレオチドであり得る。これらの薬剤は、PCDH19に関連する活性（例えば、結合活性）のレベル、若しくは関連する下流効果を低下させるか、又は細胞若しくは対象におけるPCDH19のレベルを低下させる。

【0100】

いくつかの実施形態では、PCDH19のレベル及び／又は活性を低下させる薬剤は、

50

ポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えば、RNAase H 媒介経路によって作用する一本鎖オリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、標的配列（例えば、PCDH19）のヌクレオチド塩基との水素結合相互作用を介してポリヌクレオチド標的配列又は配列部分を認識する、典型的には約10～30ヌクレオチド長のDNA及びDNA/RNAキメラ分子を含む。オリゴヌクレオチド分子は、PCDH19の発現レベル（例えば、タンパク質レベル又はmRNAレベル）を低下させることができる。例えば、オリゴヌクレオチドは、完全長PCDH19を標的とするオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド分子は、RNAase H 酵素を動員し、標的mRNA分解をもたらす。

【0101】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、機能の正の調節因子のレベル及び／又は活性を低下させる。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、機能の正の調節因子の阻害剤のレベル及び／又は活性を向上させる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、機能の負の調節因子のレベル及び／又は活性を向上させる。

【0102】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、PCDH19のレベル及び／又は活性若しくは機能を低下させる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、PCDH19の発現を阻害する。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、PCDH19の分解を向上させ、及び／又はPCDH19（例えば、mRNA）の安定性（すなわち、半減期）を低下させる。オリゴヌクレオチドは、化学的に合成することができる。

【0103】

オリゴヌクレオチドとしては、PCDH19遺伝子の発現において形成されるmRNAの少なくとも一部に相補的である相補性領域（例えば、連続核酸塩基領域）を有する、オリゴヌクレオチドが挙げられる。相補性領域は、約30以下のヌクレオチド長（例えば、約30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、又は10以下のヌクレオチド長）であり得る。PCDH19遺伝子を発現する細胞と接触すると、オリゴヌクレオチドは、PCDH19遺伝子（例えば、ヒト、霊長類、非霊長類、又は鳥類のPCDH19遺伝子）の発現を、例えば、PCR若しくは分岐DNA（bDNA）ベースの方法によって、又はタンパク質ベースの方法によって、例えば、ウェスタンブロッティング若しくはフローサイトメトリー技術を用いた免疫蛍光分析などによってアッセイした場合に、少なくとも約10%（例えば、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、99%、又は100%）阻害することができる。

【0104】

同様に、標的配列に対して相補的な領域は、10～30連結ヌクレオチド長、例えば、10～29、10～28、10～27、10～26、10～25、10～24、10～23、10～22、10～21、10～20、10～19、10～18、10～17、10～16、10～15、10～14、10～13、10～12、15～29、15～28、15～27、15～26、15～25、15～24、15～23、15～22、15～21、15～20、15～19、15～18、15～17、18～30、18～29、18～28、18～27、18～26、18～25、18～24、18～23、18～22、18～21、18～20、19～30、19～29、19～28、19～27、19～26、19～25、19～24、19～23、19～22、19～21、19～20、20～30、20～29、20～28、20～27、20～26、20～25、20～24、20～23、20～22、20～21、21～30、21～29、21～28、21～27、21～26、21～25、21～24、21～23、又は21～22連結ヌクレオチド長であり得る。上に列挙した範囲及び長さの中間の範囲及び長さも、本発明の一部であると考えられる。

【0105】

オリゴヌクレオチドは、PCDH19遺伝子の標的領域、例えば、PCDH19のプレ

10

20

30

40

50

mRNA 転写産物又は mRNA 転写産物の等しい長さの部分に対して少なくとも 80% (例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100%) 相補的な領域を含み得る。mRNA 転写産物又はプレ mRNA 転写産物は、変異を含有し得る (例えば、対象は、変異についてヘテロ接合性 (例えば、女性) 又はヘミ接合性 (例えば、男性) である)。オリゴヌクレオチドは、変異 (例えば、対立遺伝子特異的 ASO) を含有する mRNA 又はプレ mRNA を選択的に標的化し得る。オリゴヌクレオチドは、変異型対立遺伝子及び野生型対立遺伝子の両方を標的とし得る。

【0106】

オリゴヌクレオチドは、例えば、Biosearch, Applied Biosystems, Inc. から市販されているものなどの自動 DNA 合成装置の使用によって、以下で更に考察されるような当該技術分野で公知の標準的な方法によって合成され得る。

【0107】

オリゴヌクレオチド化合物は、溶液相若しくは固相有機合成又はその両方を用いて調製することができる。有機合成は、非天然又は代替ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを容易に調製することができるという利点をもたらす。本発明の一本鎖オリゴヌクレオチドは、溶液相若しくは固相有機合成又はその両方を用いて調製することができる。

【0108】

一態様では、本発明のオリゴヌクレオチドは、PCDH19 遺伝子の少なくとも 10 個の連続ヌクレオチドに対して少なくとも 80% (例えば、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又は少なくとも 99%) 相補的な少なくとも 10 個 (例えば、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個、又はそれ以上) の連続核酸塩基の領域を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、PCDH19 遺伝子の少なくとも 17 個の連続ヌクレオチド、19~23 個の連続ヌクレオチド、19 個の連続ヌクレオチド、又は 20 個の連続ヌクレオチドに対して相補的な配列を含む。この態様では、配列は、PCDH19 遺伝子の発現において生成される mRNA の配列に対して実質的に相補的である。

【0109】

いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド、又はその連続ヌクレオチド領域は、本明細書において単に「ギャップマー」とも呼ばれるギャップマー設計又は構造を有する。ギャップマー構造において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 3 つの別個の構造領域、5'-ウィング、ギャップ、及び 3'-ウィングを「5→3」配向で含む。この設計において、5' 及び 3' ウィング領域 (フランキング領域とも呼ばれる) は、ギャップ領域に隣接する少なくとも 1 つの代替ヌクレオシドを含み、いくつかの実施形態では、2~7 個の代替ヌクレオシドの連続ストレッチ、又は代替及び DNA ヌクレオシドの連続ストレッチ (代替及び DNA ヌクレオシドの両方を含む混合ウィング) を含み得る。5'-ウィング領域の長さは、少なくとも 2 ヌクレオシド長 (例えば、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、又はそれ以上のヌクレオシド長) であり得る。3'-ウィング領域の長さは、少なくとも 2 ヌクレオシド長 (例えば、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、又はそれ以上のヌクレオシド長) であり得る。5' 及び 3' ウィング領域は、それらが含むヌクレオシドの数に関して対称又は非対称であり得る。いくつかの実施形態では、ギャップ領域は、各々約 5 個のヌクレオシドを含む 5'-ウィング領域及び 3'-ウィング領域に隣接する、約 10 個のヌクレオシドを含み、5-10-5 ギャップマーとも呼ばれる。

【0110】

その結果、ギャップ領域に隣接する 5'-ウィング領域及び 3'-ウィング領域のヌクレオシドは、2' 代替ヌクレオシドなどの代替ヌクレオシドである。ギャップ領域は、オリゴヌクレオチドが PCDH19 標的核酸と二重鎖である場合、RNase H を動員することができるヌクレオチドの連続ストレッチを含む。いくつかの実施形態では、ギャップ領域

10

20

30

40

50

は、5～16個のDNAヌクレオシドの連続ストレッチを含む。他の実施形態では、ギャップ領域は、PCDH19遺伝子に対して少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%）の相補性を有する少なくとも10個の連続核酸塩基の領域を含む。いくつかの実施形態では、ギャップマーは、PCDH19遺伝子の少なくとも17個の連続ヌクレオチド、19～23個の連続ヌクレオチド、又は19個の連続ヌクレオチドに対して相補的な領域を含む。ギャップマーは、PCDH19標的核酸に対して相補的であり、したがって、オリゴヌクレオチドの連続ヌクレオシド領域であり得る。

【0111】

ギャップ領域の5'末端及び3'末端に隣接する5'ウィング領域及び3'ウィング領域は0、1つ以上の親和性増強代替ヌクレオシドを含み得る。いくつかの実施形態では、5'ウィング及び／又は3'ウィングは、少なくとも1つの2'-O-メトキシエチル（MOE）ヌクレオシド、好ましくは少なくとも2つのMOEヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、5'ウィングは、少なくとも1つのMOEヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、5'及び3'ウィング領域の両方が、MOEヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、ウィング領域内の全てのヌクレオシドが、MOEヌクレオシドである。他の実施形態では、ウィング領域は、MOEヌクレオシド及び他のヌクレオシド（混合ウィング）、例えば、DNAヌクレオシド及び／又は非MOE代替ヌクレオシド、例えば、二環式ヌクレオシド（BNA）（例えば、LNAヌクレオシド若しくはcETヌクレオシド）、又は他の2'置換ヌクレオシドの両方を含み得る。この場合、ギャップは、MOEヌクレオシドなどの親和性増強代替ヌクレオシドが5'及び3'末端に隣接する少なくとも5つのRNAse H動員ヌクレオシド（5～16個のDNAヌクレオシドなど）の連続配列として定義される。 20

【0112】

他の実施形態では、5'及び／又は3'ウィングは、少なくとも1つのBNA（例えば、少なくとも1つのLNAヌクレオシド又はcETヌクレオシド）、好ましくは、少なくとも2つの二環式ヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、5'ウィングは、少なくとも1つのBNAを含む。いくつかの実施形態では、5'ウィング領域及び3'ウィング領域の両方がBNAを含む。いくつかの実施形態では、ウィング領域内の全てのヌクレオシドがBNAである。他の実施形態では、ウィング領域は、BNA及び他のヌクレオシド（混合ウィング）、例えばDNAヌクレオシド及び／又は非BNA代替ヌクレオシド、例えば2'置換ヌクレオシドの両方を含み得る。この場合、ギャップは、親和性増強代替ヌクレオシド、例えばBNA、例えばLNA、例えばβ-D-オキシ-LNAが5'及び3'末端に隣接する少なくとも5つのRNAse H動員ヌクレオシド（例えば5～16個のDNAヌクレオシド）の連続配列として定義される。 30

【0113】

ギャップ領域の5'末端に結合した5'フランク又は5'ウィングは、少なくとも1つの代替糖部分（例えば、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又はそれ以上の代替糖部分）を含むか、含有するか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ウィング領域は、1～7個の代替核酸塩基、例えば、2～6個の代替核酸塩基、例えば、2～5個の代替核酸塩基、例えば、2～4個の代替核酸塩基、例えば、1～3個の代替核酸塩基、例えば、1、2、3、又は4個の代替核酸塩基を含むか、又はそれらからなる。いくつかの実施形態では、ウィング領域は、少なくとも1つの代替ヌクレオシド間連結（例えば、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又はそれ以上の代替ヌクレオシド間連結）を含むか、又はそれからなる。 40

【0114】

ギャップ領域の3'末端に結合した3'フランク又は3'ウィングは、少なくとも1つの代替糖部分（例えば、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又はそれ以上の代替糖部分）を含むか、含有するか、又はそれから 50

なる。いくつかの実施形態では、ウィング領域は、1～7個の代替核酸塩基、例えば2～6個の代替核酸塩基、例えば2～5個の代替核酸塩基、例えば2～4個の代替核酸塩基、例えば1～3個の代替核酸塩基、例えば1個、2個、3個、又は4個の代替核酸塩基を含むか、又はそれらからなる。いくつかの実施形態では、ウィング領域は、少なくとも1つの代替ヌクレオシド間連結（例えば、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又はそれ以上の代替ヌクレオシド間連結）を含むか、又はそれらからなる。

【0115】

一実施形態では、ウィング領域中の代替糖部分の1つ以上又は全てが、2'代替糖部分である。

10

【0116】

更なる実施形態では、ウィング領域中の1つ以上の2'代替糖部分は、2'-O-アルキル糖部分、2'-O-メチル糖部分、2'-アミノ糖部分、2'-フルオロ糖部分、2'-アルコキシ糖部分、MOE糖部分、LNA糖部分、アラビノ核酸（ANA）糖部分、及び2'-フルオロ-ANA糖部分から選択される。

【0117】

本発明の一実施形態では、ウィング領域中の全ての代替ヌクレオシドが、二環式ヌクレオシドである。更なる実施形態では、ウィング領域中の二環式ヌクレオシドは、β-D若しくはα-L配置のいずれかのオキシ-LNA、チオ-LNA、アミノ-LNA、cET、及び／又はENA、又はそれらの組み合わせからなる群から独立して選択される。

20

【0118】

いくつかの実施形態では、ウィング領域中の1つ以上の代替ヌクレオシド間連結は、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート連結は、立体化学的に純粋なホスホロチオエート連結である。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート連結は、Spホスホロチオエート連結である。他の実施形態では、ホスホロチオエート連結は、Rpホスホロチオエート連結である。いくつかの実施形態では、代替ヌクレオシド間連結は、2'-アルコキシヌクレオシド間連結である。他の実施形態では、代替ヌクレオシド間連結は、アルキルホスフェートヌクレオシド間連結である。

【0119】

ギャップ領域は、RNase Hを動員することができる少なくとも5～16個の連続DNAヌクレオシドを含むか、含有するか、又はそれらからなり得る。いくつかの実施形態では、ギャップ領域のヌクレオシドの全てがDNA単位である。更なる実施形態では、ギャップ領域は、DNAと、RNase H切断を媒介することができる他のヌクレオシドとの混合物からなり得る。いくつかの実施形態では、ギャップ領域のヌクレオシドの少なくとも50%、例えば、少なくとも60%、少なくとも70%又は少なくとも80%、又は少なくとも90%がDNAである。

30

【0120】

本発明のオリゴヌクレオチドは、標的核酸に対して相補的である連続領域を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、5'及び3'ウィング領域のいずれかに対して5'及び／又は3'に位置付けられた追加の連結ヌクレオシドを更に含み得る。これらの追加の連結ヌクレオシドは、それぞれ、5'ウィング領域の5'末端又は3'ウィング領域の3'末端に結合することができる。追加のヌクレオシドは、いくつかの実施形態では、標的核酸に対して相補的である連続配列の一部を形成し得、又は他の実施形態では、標的核酸に対して非相補的であり得る。

40

【0121】

5'及び3'ウィング領域のいずれか又は両方における追加のヌクレオシドの包含は、独立して、標的核酸に対して相補的又は非相補的であり得る、1、2、3、4、又は5個の追加のヌクレオチドを含み得る。これに関して、本発明のオリゴヌクレオチドは、いくつかの実施形態では、追加のヌクレオチドが5'及び／又は3'末端に隣接する標的を調節す

50

ることができる、連続配列を含み得る。このような追加のヌクレオシドは、ヌクレアーゼ感受性の生体切断可能リンカーとして働き得、それにより、コンジュゲート部分などの官能基を本発明のオリゴヌクレオチドに結合させるために使用され得る。いくつかの実施形態では、追加の5'及び／又は3'末端ヌクレオシドは、ホスホジエステル連結で連結され、DNA又はRNAであり得る。別の実施形態では、追加の5'及び／又は3'末端ヌクレオシドは、例えば、ヌクレアーゼ安定性を増強するために、又は合成を容易にするために含まれ得る、代替ヌクレオシドである。

【0122】

他の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、「アルチマー (altimer)」設計を利用し、交互の2'-フルオロ-ANA及び3つのヌクレオシドごとに交互になっているDNA領域を含む。アルチマーオリゴヌクレオチドは、Min, et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002, 12 (18): 2651-2654及びKalota, et al., Nuc. Acid Res. 2006, 34 (2): 451-61 (これらの文献は参照により本明細書に組み込まれる) に、より詳細に記載されている。

10

【0123】

他の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、「ヘミマー (hemimer)」設計を利用し、ギャップ領域 (の5'側又は3'側のいずれか) に隣接する単一の2'-修飾ウィングセグメントを含む。ヘミマーオリゴヌクレオチドは、Geary et al., 2001, J. Pharm. Exp. Therap., 296: 898-904 (これらの文献は参照により本明細書に組み込まれる) に、より詳細に記載されている。

20

【0124】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、PCDH19の等しい長さの標的配列に対して少なくとも50% (例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%) の配列同一性を有する核酸配列を有する。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、PCDH19の等しい長さの標的配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有する核酸配列を有する。

【0125】

ASO配列は、非修飾及び／又は非コンジュゲート配列として記載されているが、本発明のオリゴヌクレオチドのヌクレオシド、例えば、本発明のオリゴヌクレオチドは、以下に詳細に記載されるような代替ヌクレオシド及び／又はコンジュゲートである任意の配列を含んでもよいことが理解されるであろう。

30

【0126】

当業者であれば、約18~20個の塩基対の構造を有するオリゴヌクレオチドが、RNAse H媒介性分解を誘導するのに特に有効であり得ることを十分に承知している。しかし、より短い又はより長いオリゴヌクレオチドも有効であり得ることを理解することができる。上記の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチド配列の性質により、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは含むことができる。より短いオリゴヌクレオチドから、一方又は両方の末端にほんの数個の連結ヌクレオシドを差し引いたものが、上記のオリゴヌクレオチドと比較して同様に有効であり得ることが妥当に予想され得る。したがって、本明細書で提供される配列の1つに由来する少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、又はそれ以上の連続して連結されたヌクレオシドの配列を有するオリゴヌクレオチドであって、PCDH19遺伝子の発現を阻害する能力が、完全配列を含むオリゴヌクレオチドと約5、10、15、20、25、又は30%以下の阻害で異なる、オリゴヌクレオチドは、本発明の範囲内であると考えられる。

40

【0127】

本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは、標的核酸のヌクレアーゼ媒介分解を介し

50

て機能し得、本発明のオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ、特にエンドヌクレアーゼ、好ましくはRNase Hなどのエンドリボヌクレアーゼ（RNase H）を動員することができる。ヌクレアーゼ媒介機構を介して作動するオリゴヌクレオチド設計の例は、典型的には少なくとも5又は6個のDNAヌクレオシドの領域を含むオリゴヌクレオチドであり、これには、親和性増強代替ヌクレオシド、例えばギャップマー、ヘッドマー、及びテイルマーが片側又は両側に隣接する。

【0128】

オリゴヌクレオチドのRNase H活性は、相補的RNA分子との二重鎖中にあるときにRNase Hを動員する能力を指す。国際公開第01/23613号は、RNase Hを動員する能力を決定するために使用され得る、RNase H活性を決定するためのインビトロ方法を提供する。典型的には、オリゴヌクレオチドは、相補的標的核酸配列を提供された場合に、試験される修飾オリゴヌクレオチドと同じ塩基配列を有するが、オリゴヌクレオチド中の全てのモノマー間にホスホロチオエート連結を有するDNAモノマーのみを含有するオリゴヌクレオチドを使用し、国際公開第01/23613号（参照により本明細書に組み込まれる）の実施例91～95によって提供される方法を使用する場合に決定される、初速度の少なくとも5%、例えば少なくとも10%又は20%超の、pmol/l/分で測定される初速度を有する場合、RNase Hを動員することができる。とみなされる。

【0129】

更に、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは、RNase H媒介性切断に感受性であるPCDH19転写産物中の部位を同定する。したがって、本発明は更に、この部位内を標的とするオリゴヌクレオチドを特徴とする。本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチドは、そのオリゴヌクレオチドがRNA転写産物の特定の部位内のどこかで転写産物の切断を促進する場合、RNA転写産物の特定の部位内を標的化するといわれる。このようなオリゴヌクレオチドは、概して、PCDH19遺伝子中の選択された配列に連続している領域から得られる追加の連結ヌクレオシド配列に結合した、本明細書で提供される配列の1つに由来する少なくとも約5～10個の連続連結ヌクレオシドを含む。

【0130】

阻害性オリゴヌクレオチドは、当該技術分野で周知の方法によって設計することができる。標的配列は概ね約10～30連結ヌクレオシド長であるが、任意の所与の標的RNAの切断を指示するためのこの範囲内の特定の配列の適合性には幅広い変動が存在する。

【0131】

任意のRNAを固有に分解するのに必要な配列特異性を提供するのに十分な相同性を有するオリゴヌクレオチドは、当該技術分野で公知のプログラムを使用して設計することができる。

【0132】

阻害性オリゴヌクレオチド配列の最適化のためのいくつかの設計された種の系統的試験もまた、本明細書に提供される教示に従って行われ得る。妨害オリゴヌクレオチドを設計する際の考慮事項としては、生物物理学的、熱力学的、及び構造的考慮事項、特定の位置における塩基優先性、並びに相同性が挙げられるが、これらに限定されない。非コードオリゴヌクレオチドに基づく阻害性治療薬の作製及び使用もまた、当該技術分野で公知である。

【0133】

本明細書に記載される様々なソフトウェアパッケージ及びガイドラインは、任意の所与の遺伝子標的に対する最適な標的配列の同定のためのガイダンスを提供するが、所与のサイズ（非限定的な例として、21ヌクレオチド）の「ウィンドウ」又は「マスク」を文字通り又は比喩的に（例えば、インシリコを含む）標的RNA配列上に配置して、標的配列として役立ち得るサイズ範囲内の配列を同定する、経験的アプローチをとることもできる。配列「ウィンドウ」を初期標的配列位置の上流又は下流に1ヌクレオチドずつ漸進的に移動させることによって、選択された任意の所与の標的サイズについて可能な配列の完全

10

20

30

40

50

なセットが同定されるまで、次の潜在的な標的配列を同定することができる。最適に機能する配列を同定するための、同定された配列の系統的合成及び試験（本明細書に記載されるアッセイか、又は当該技術分野で公知のアッセイを使用する）と組み合わせたこのプロセスは、オリゴヌクレオチド剤で標的化される場合標的遺伝子発現の最良の阻害を媒介する、RNA配列を同定することができる。したがって、本明細書で同定される配列は有効な標的配列を表すが、阻害効率の更なる最適化は、等しいか又はより良好な阻害特性を有する配列を同定するために、所定の配列の上流又は下流に1ヌクレオチドずつ漸進的に「ウィンドウを移動させる」ことによって達成され得ることが企図される。

【0134】

更に、本明細書で同定される任意の配列について、連結されたヌクレオシドを系統的に付加又は除去して、より長い又はより短い配列を生成し、そしてより長い又はより短いサイズのウィンドウをその点から標的RNAを上又は下に移動させることによって生成された配列を試験することによって、更なる最適化が達成され得ることが意図される。ここでもまた、新しい候補標的を生成するためのこのアプローチを、当該技術分野で公知であるような、及び／又は本明細書に記載されるような阻害アッセイにおける標的配列に基づくオリゴヌクレオチドの有効性についての試験と組み合わせることは、阻害の効率における更なる改善をもたらすことができる。

【0135】

更になお、このような最適化された配列は、例えば、発現阻害剤として分子を更に最適化すること（例えば、血清安定性又は循環半減期を向上させること、熱安定性を向上させること、膜貫通送達を増強すること、特定の位置又は細胞型に標的化すること、サイレンシング経路酵素との相互作用を向上させること、エンドソームからの放出を増加させること）のための当該技術分野で公知の及び／又は本明細書で考察される代替ヌクレオシド、代替糖部分、及び／又は代替ヌクレオシド間連結を含む、本明細書に記載される又は当該技術分野で公知の代替ヌクレオシド、代替糖部分、及び／又は代替ヌクレオシド間連結の導入によって調整することができる。本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド剤は、標的配列に対する1つ以上のミスマッチを含有することができる。一実施形態では、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは、3個以下のミスマッチを含有する。オリゴヌクレオチドが標的配列に対するミスマッチを含有する場合、ミスマッチの領域は相補性領域の中心に位置しないことが好ましい。オリゴヌクレオチドが標的配列に対するミスマッチを含有する場合、ミスマッチは、相補性領域の5'末端又は3'末端のいずれかから最後の5ヌクレオチド以内に制限されることが好ましい。例えば、30-連結ヌクレオシドオリゴヌクレオチド剤について、PCDH19遺伝子の領域に対して相補的である連続核酸塩基領域は、概ね、中心の5~10個の連結ヌクレオシド内にいかなるミスマッチも含まない。本明細書に記載の方法又は当該技術分野で公知の方法を用いて、標的配列に対するミスマッチを含有するオリゴヌクレオチドがPCDH19遺伝子の発現を阻害するのに有効であるかどうかを判定することができる。PCDH19遺伝子の発現を阻害する際のミスマッチを有するオリゴヌクレオチドの有効性を検討することは、特にPCDH19遺伝子における特定の相補性領域が集団内で多型配列変異を有することが既知である場合、重要である。

【0136】

本発明における使用のためのポリヌクレオチドの発現のためのベクターの構築は、当業者に対する詳細な説明を必要としない従来の技術を使用して達成され得る。効率的な発現ベクターの生成のために、ポリヌクレオチドの発現を制御する、調節配列を有することが必要である。これらの調節配列は、プロモーター及びエンハンサー配列を含み、これらの配列と相互作用する特定の細胞因子によって影響を受け、当該技術分野で周知である。

代替オリゴヌクレオチド

【0137】

一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドの連結ヌクレオシド又はヌクレオシド間連結の1つ以上は、天然に存在し、例えば、当該技術分野で公知であり本明細書に記載さ

10

20

30

40

50

れている化学修飾及び／又はコンジュゲーションを含まない。別の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドの連結ヌクレオシド又はヌクレオシド間連結の1つ以上は、安定性又は他の有益な特徴を増強するために化学的に修飾される。理論に束縛されるものではないが、ある特定の修飾は、ヌクレアーゼ耐性及び／若しくは血清安定性を向上させることができ、又は免疫原性を低下させることができると考えられる。例えば、本発明のオリゴヌクレオチドは、DNA又はRNA中に天然に存在することが見出されたヌクレオチド（例えば、アデニン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、又はイノシン）を含有し得、又はヌクレオチドの1つ以上の成分（例えば、核酸塩基、糖、又はホスホリンカー部分）に対して1つ以上の化学修飾を有する代替ヌクレオシド又はヌクレオシド間連結を含有し得る。本発明のオリゴヌクレオチドは、天然に存在するホスホジエステル結合を介して互いに連結され得、又は代替連結（例えば、ホスホロチオエート（例えば、Spホスホロチオエート又はRpホスホロチオエート）、3'-メチレンホスホネート、5'-メチレンホスホネート、3'-ホスホアミデート、2'-5'ホスホジエステル、グアニジニウム、S-メチルチオ尿素、2'-アルコキシ、アルキルホスフェート、又はペプチド結合を介して共有結合される）を含有し得る。

10

20

30

40

50

【0138】

本発明のある特定の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドの実質的に全てのヌクレオシド又はヌクレオシド間連結は、代替ヌクレオシドである。本発明の他の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドのヌクレオシド又はヌクレオシド間連結の全てが代替ヌクレオシドである。「実質的に全てのヌクレオシドが代替ヌクレオシドである」本発明のオリゴヌクレオチドは、全体ではないが大部分が修飾されており、5個、4個、3個、2個、又は1個以下の天然ヌクレオシドを含むことができる。本発明の更に他の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、5個、4個、3個、2個、又は1個以下の代替ヌクレオシドを含むことができる。

【0139】

本発明において特徴とされる核酸は、「Current protocols in nucleic acid chemistry」, Beaucage, S. L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., 米国ニューヨーク州ニューヨーク（これは、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの、当該技術分野で十分に確立された方法によって合成及び／又は修飾することができる。代替のヌクレオチド及びヌクレオシドとしては、例えば、末端修飾、例えば、5'末端修飾（リン酸化、コンジュゲーション、逆連結）又は3'末端修飾（コンジュゲーション、DNAヌクレオチド、逆連結など）；塩基修飾、例えば、安定化塩基、不安定化塩基、又はパートナーの拡大レパートリーと塩基対合する塩基との置換、塩基（脱塩基ヌクレオチド）の除去、又は共役塩基；糖修飾（例えば、2'位若しくは4'位における）若しくは糖の置換；及び／又はホスホジエステル連結の修飾若しくは置換を含む骨格修飾などの修飾を有するものが挙げられる。核酸塩基はまた、核酸塩基が糖部分のC1位から異なる位置（例えば、C2、C3、C4、又はC5）に移動しているイソヌクレオシドであり得る。本明細書に記載される実施形態で有用なオリゴヌクレオチド化合物の具体例としては、修飾された骨格を含む、又は天然のヌクレオシド間連結を含まない、代替ヌクレオシドが挙げられるが、これらに限定されない。修飾された骨格を有するヌクレオチド及びヌクレオシドとしては、とりわけ、骨格中にリン原子を有していないものが挙げられる。本明細書の目的のために、及び当該技術分野において場合により参照されるように、ヌクレオシド間骨格にリン原子を有していない代替RNAも、オリゴヌクレオシドであるとみなすことができる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、そのヌクレオシド間骨格にリン原子を有する。

【0140】

代替ヌクレオシド間連結は、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び他のアルキルホスホネート（3'-アルキレンホスホネート及びキラルホスホネ

ートを含む)、ホスフィネート、ホスホルアミデート(3'-アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含む)、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、並びに通常の3'-5'連結を有するボロノホスフェート、これらの2'-5'連結類似体、並びに隣接対のヌクレオシド単位が3'-5'から5'-3'又は2'-5'から5'-2'連結である逆極性を有するものが挙げられる。様々な塩、混合塩、及び遊離酸形態も含まれる。

【0141】

上記リン含有連結の調製を教示する代表的な米国特許としては、米国特許第3,687,808号、同第4,469,863号、同第4,476,301号、同第5,023,243号、同第5,177,195号、同第5,188,897号、同第5,264,423号、同第5,276,019号、同第5,278,302号、同第5,286,717号、同第5,321,131号、同第5,399,676号、同第5,405,939号、同第5,453,496号、同第5,455,233号、同第5,466,677号、同第5,476,925号、同第5,519,126号、同第5,536,821号、同第5,541,316号、同第5,550,111号、同第5,563,253号、同第5,571,799号、同第5,587,361号、同第5,625,050号、同第6,028,188号、同第6,124,445号、同第6,160,109号、同第6,169,170号、同第6,172,209号、同第6,239,265号、同第6,277,603号、同第6,326,199号、同第6,346,614号、同第6,444,423号、同第6,531,590号、同第6,534,639号、同第6,608,035号、同第6,683,167号、同第6,858,715号、同第6,867,294号、同第6,878,805号、同第7,015,315号、同第7,041,816号、同第7,273,933号、同第7,321,029号、及び米国再発行特許第39464号が挙げられるが、これらに限定されない(これらの各々の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる)。

10

20

【0142】

中にリン原子を含まない代替ヌクレオシド間連結は、短鎖アルキル若しくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、混合ヘテロ原子及びアルキル若しくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、又は1つ以上の短鎖ヘテロ原子若しくは複素環式ヌクレオシド間連結によって形成される骨格を有する。これらとしては、モルホリノ連結(ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される)、シロキサ骨格、スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格、ホルミルアセチル及びチオホルミルアセチル骨格、メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファメート骨格、メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格、スルホネート及びスルホンアミド骨格、アミド骨格を有するもの、並びに混合されたN、O、S及びCH₂構成要素部分を有する他のものが挙げられる。

30

【0143】

上記オリゴヌクレオシドの調製を教示する代表的な米国特許としては、米国特許第5,034,506号、同第5,166,315号、同第5,185,444号、同第5,214,134号、同第5,216,141号、同第5,235,033号、同第5,645,62号、同第5,264,564号、同第5,405,938号、同第5,434,257号、同第5,466,677号、同第5,470,967号、同第5,489,677号、同第5,541,307号、同第5,561,225号、同第5,596,086号、同第5,602,240号、同第5,608,046号、同第5,610,289号、同第5,618,704号、同第5,623,070号、同第5,663,312号、同第5,633,360号、同第5,677,437号、及び同第5,677,439号が挙げられるが、これらに限定されない(これらの各々の内容は参照により本明細書に組み込まれる)。

40

【0144】

他の実施形態では、好適なオリゴヌクレオチドとしては、ヌクレオチド単位の糖及びヌクレオシド間連結の両方、すなわち、骨格が置換されているものが挙げられる。塩基単位

50

は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示された模倣体は、ペプチド核酸（PNA）と呼ばれる。PNA化合物において、ヌクレオシドの糖は、アミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格で置換される。核酸塩基は保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接又は間接的に結合される。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許としては、米国特許第5,539,082号、同第5,714,331号、及び同第5,719,262号（これらの各々の内容は参照により本明細書に組み込まれる）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のオリゴヌクレオチドにおける使用に好適な追加のPNA化合物は、例えば、Nielsenら, Science, 1991, 254, 1497-1500に記載されている。

10

【0145】

本発明で特徴とされるいくつかの実施形態は、ホスホロチオエート骨格を有するオリゴヌクレオチド、及びヘテロ原子骨格を有するオリゴヌクレオチド、特に $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [メチレン(メチルイミノ)又はMMI骨格として知られている]、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、及び $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [天然ホスホジエステル骨格は、上述の米国特許第5,489,677号の $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2$ として表される]、並びに上記で参照した米国特許第5,602,240号のアミド骨格を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で特徴とされるオリゴヌクレオチドは、上で参照した米国特許第5,034,506号のモルホリノ骨格構造を有する。他の実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは、デオキシリボース部分がモノホリン環で置換されたホスホロジアミデートモリフォリノオリゴマー(PMO)を含み、荷電したホスホジエステルサブユニット間連結が、Summerton, et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997:7-63, 70に記載されるように荷電されていないホスホロジアミデート連結に置換されている。

20

【0146】

代替のヌクレオシド及びヌクレオチドはまた、1つ以上の置換糖部分を含有することができる。オリゴヌクレオチド、例えば、本明細書で特徴とされるオリゴヌクレオチドは、2'位に以下の、OH、F、O-、S-、又はN-アルキル、O-、S-、又はN-アルケニル、O-、S-、又はN-アルキニル、又はO-アルキル-O-アルキルのうちの1つを含むことができ、アルキル、アルケニル、及びアルキニルは、置換又は非置換 $\text{C}_1\sim\text{C}_{10}$ アルキル又は $\text{C}_2\sim\text{C}_{10}$ アルケニル及びアルキニルであり得る。例示的な好適な修飾としては、 $-\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ 、

30

【0147】

$-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_n-\text{ONH}_2$ 、及び $-\text{O}(\text{CH}_2)_n-\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ が挙げられ、式中、n及びmは、1～約10である。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2'位に以下： $\text{G}\sim\text{C}_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルカリール、アラルキル、O-アルカリール又はO-アラルキル、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA切断基、レポーター基、インターカレータ、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善するための基、又はオリゴヌクレオチドの薬力学特性を改善するための基、及び同様の特性を有する他の置換基のうちの1つを含む。いくつかの実施形態では、修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'-O-C₂H₄OCH₃、別名2'-O-(2-メトキシエチル)又は2'-MOE)(Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504)、すなわち、アルコキシ-アルコキシ基を含む。MOEヌクレオシドは、修飾されていないオリゴヌクレオチドと比較して、ヌクレアーゼ耐性の向上、薬物動態特性の改善、非特異的タンパク質結合の低減、毒性の低減、免疫刺激特性の低減、及び標的親和性の増強を含むがこれ

40

50

らに限定されない、いくつかの有益な特性をオリゴヌクレオチドに付与する。

【0148】

別の例示的な代替物は、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、本明細書の以下の実施例に記載されるような2'-DMAOEとしても知られる-O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基、及び2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ（当該技術分野において2'-ジメチルアミノエトキシエチル又は2'-DMAEOEとしても知られる）、すなわち、2'-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-N(CH₃)₂を含有する。更なる例示的な代替物としては、5'-Me-2'-Fヌクレオチド、5'-Me-2'-OMeヌクレオチド、5'-Me-2'-デオキシヌクレオチド（これらの3つのファミリーにおけるR異性体及びS異性体の両方）；2'-アルコキシアルキル；及び2'-NMA（N-メチルアセトアミド）が挙げられる。

【0149】

他の代替物としては、2'-メトキシ（2'-OC₃H₇、2'-アミノプロポキシ（2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂）、及び2'-フルオロ（2'-F）が挙げられる。同様の修飾はまた、ヌクレオシド及びオリゴヌクレオチドのヌクレオチド上の他の位置、特に3'末端ヌクレオチド上又は2'-5'連結オリゴヌクレオチド中の糖の3'位及び5'末端ヌクレオチドの5'位でなされ得る。オリゴヌクレオチドはまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣体を有することができる。このような修飾された糖構造の調製を教示する代表的な米国特許としては、米国特許第4,981,957号、同第5,118,800号、同第5,319,080号、同第5,359,044号、同第5,393,878号、同第5,446,137号、同第5,466,786号、同第5,514,785号、同第5,519,134号、同第5,567,811号、同第5,576,427号、同第5,591,722号、同第5,597,909号、同第5,610,300号、同第5,627,053号、同第5,639,873号、同第5,646,265号、同第5,658,873号、同第5,670,633号、及び同第5,700,920号（これらのうちのいくつかは、本出願と共同所有されている）が挙げられるが、これらに限定されない。前述の各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0150】

本発明のオリゴヌクレオチドは、核酸塩基（当該技術分野では単に「塩基」と呼ばれることが多い）代替物（例えば、修飾又は置換）も含むことができる。非修飾又は天然核酸塩基には、プリン塩基アデニン（A）及びグアニン（G）、並びにピリミジン塩基チミン（T）、シトシン（C）、及びウラシル（U）が含まれる。別の核酸塩基には、他の合成及び天然核酸塩基、例えば、5-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、5-ホルミルシチジン、5-カルボキシシチジン、ピロロシチジン、ジデオキシシチジン、ウリジン、5-メトキシウリジン、5-ヒドロキシデオキシウリジン、ジヒドロウリジン、4-チオウリジン、プソイドウリジン、1-メチルプソイドウリジン、デオキシウリジン、5-ヒドロキシブチニル-2'-デオキシウリジン、キサンチン、ヒポキサンチン、7-デアザキサンチン、チエノグアニン、8-アザ-7-デアザグアノシン、7-メチルグアノシン、7-デアザグアノシン、6-アミノメチル-7-デアザグアノシン、8-アミノグアニン、2,2,7-トリメチルグアノシン、8-メチルアデニン、8-アジドアデニン、7-メチルアデニン、7-デアザアデニン、3-デアザアデニン、2,6-ジアミノプリン、2-アミノプリン、7-デアザ-8-アザアデニン、8-アミノアデニン、チミン、ジデオキシチミン、5-ニトロインドール、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他の誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他の誘導体、2-チオウリジン、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニルウリジン及びシチジン、6-アゾウリジン、シチジン及びチミン、4-チオウリジン、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及び他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル及び他の5-置換ウリジン及びシチジン、8-アザグアニン及

び 8-アザアデニン、及び 3-デアザグアニンが含まれる。更なる核酸塩基としては、米国特許第 3,687,808 号に開示されているもの、Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008 に開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990 に開示されているもの（これらは Englisch et al., (1991) Angewandte Chemie, International Edition, 30:613 に開示されている）、及び Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993 に開示されているものが挙げられる。これらの核酸塩基のうちある特定のもの、本発明で特徴とされるオリゴヌクレオチド化合物の結合親和性を向上させるのに特に有用である。これらには、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル、及び 5-プロピニルシトシンを含む、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、並びに N-2、N-6 及び O-6 置換プリンが含まれる。5-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を 0.6~1.2℃ 上昇させることが示され（Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278）、例示的な塩基置換であり、更により具体的には、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせた場合の塩基置換である。

10

20

30

50

【0151】

ある特定の上記代替核酸塩基及び他の代替核酸塩基の調製を教示する代表的な米国特許としては、上記米国特許第 3,687,808 号、同第 4,845,205 号、同第 5,130,30 号、同第 5,134,066 号、同第 5,175,273 号、同第 5,367,066 号、同第 5,432,272 号、同第 5,457,187 号、同第 5,459,255 号、同第 5,484,908 号、同第 5,502,177 号、同第 5,525,711 号、同第 5,552,540 号、同第 5,587,469 号、同第 5,594,121 号、同第 5,596,091 号、同第 5,614,617 号、同第 5,681,941 号、同第 5,750,692 号、同第 6,015,886 号、同第 6,147,200 号、同第 6,166,197 号、同第 6,222,025 号、同第 6,235,887 号、同第 6,380,368 号、同第 6,528,640 号、同第 6,639,062 号、同第 6,617,438 号、同第 7,045,610 号、同第 7,427,672 号、及び同第 7,495,088 号（これらの各々の内容は参照により本明細書に組み込まれる）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0152】

他の実施形態では、ヌクレオチド中の糖部分は、任意選択で、2'-O-メチル、2'-O-MOE、2'-F、2'-アミノ、2'-O-プロピル、2'-アミノプロピル、又は 2'-OH 修飾を有する、リボース分子であり得る。

【0153】

本発明のオリゴヌクレオチドは、1つ以上の二環式糖部分を含み得る。「二環式糖」は、2個の原子の架橋によって修飾されたフラノシル環である。「二環式ヌクレオシド」（「BNA」）は、糖環の2個の炭素原子を接続し、それによって二環式環系を形成する架橋を含む、糖部分を有するヌクレオシドである。ある特定の実施形態では、架橋は、糖環の4'-炭素と2'-炭素とを接続する。したがって、いくつかの実施形態では、本発明の薬剤は、1つ以上のロックドヌクレオシドを含み得る。ロックドヌクレオシドは、修飾リボース部分を有し、リボース部分が2'-炭素と4'-炭素を接続する余分な架橋を含む、ヌクレオシドである。言い換えれば、ロックドヌクレオシドは、4'-CH₂-O-2' 架橋

を含む、二環式糖部分を含むヌクレオシドである。この構造は、リボースを3'-末端構造立体配座に効果的に「ロック」する。オリゴヌクレオチドへのロックドヌクレオシドの付加は、血清中のオリゴヌクレオチド安定性を向上させ、オフターゲット効果を低減させることが示されている (Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31 (12): 3185-3193)。本発明のポリヌクレオチドにおける使用のための二環式ヌクレオシドの例としては、4'リボシル環原子と2'リボシル環原子との間に架橋を含むヌクレオシドが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、本発明のポリヌクレオチド剤は、4'-2'架橋を含む、1つ以上の二環式ヌクレオシドを含む。そのような4'-2'架橋二環式ヌクレオシドの例としては、4'-(CH₂)-O-2' (LNA) ; 4'-(CH₂)-S-2' ; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA) ; 4'-CH(CH₃)-O-2' (「拘束エチル」又は「cEt」とも呼ばれる) 及び4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (及びそれらの類似体 ; 例えば、米国特許第7,399,845号を参照) ; 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (及びその類似体 ; 例えば、米国特許第8,278,283号を参照) ; 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (及びその類似体 ; 例えば、米国特許第8,278,425号を参照) ; 4'-CH₂-O-N(CH₃)₂-2' (例えば、米国特許公開第2004/0171570号を参照) ; 4'-CH₂-N(R)-O-2' (式中、Rは、H、C₁₋₁₂アルキル、又は保護基である) (例えば、米国特許第7,427,672号を参照) ; 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (例えば、Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134を参照) ; 及び4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (及びその類似体 ; 例えば、米国特許第8,278,426号を参照) が挙げられるが、これらに限定されない。前述の各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0154】

ロックド核酸ヌクレオチドの調製を教示する更なる代表的な米国特許及び米国特許出願公開としては、米国特許第6,268,490号、同第6,525,191号、同第6,670,461号、同第6,770,748号、同第6,794,499号、同第6,998,484号、同第7,053,207号、同第7,034,133号、同第7,084,125号、同第7,399,845号、同第7,427,672号、同第7,569,686号、同第7,741,457号、同第8,022,193号、同第8,030,467号、同第8,278,425号、同第8,278,426号、同第8,278,283号、米国特許出願公開第2008/0039618号、及び同第2009/0012281号(その内容全体は参照により本明細書に組み込まれる)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0155】

例えばα-L-リボフラノース及びβ-D-リボフラノースを含む1つ以上の立体化学的糖配置を有する、前述の二環式ヌクレオシドのいずれかを調製することができる(国際公開第99/14226号を参照)。

【0156】

本発明のオリゴヌクレオチドはまた、1つ以上の拘束エチルヌクレオシドを含むように修飾され得る。本明細書で使用される場合、「拘束エチルヌクレオシド」又は「cEt」は、4'-CH(CH₃)-O-2'架橋を含む、二環式糖部分を含むロックドヌクレオシドである。一実施形態では、拘束エチルヌクレオシドは、本明細書において「S-cEt」と称されるS立体配座にある。

【0157】

本発明のオリゴヌクレオチドはまた、1つ以上の「立体配座的に制限されたヌクレオシド」(「CRN」)を含み得る。CRNは、リボースのC2'及びC4'炭素又はリボースのC3及びC5'炭素を連結するリンカーを有する、ヌクレオシド類似体である。CRNは、リボース環を安定な立体配座にロックし、mRNAに対するハイブリダイゼーション親和性を向上させる。リンカーは、安定性及び親和性のために最適な位置に酸素を配置

するのに十分な長さであり、リボース環のパッカリングが少なくなる。

【0158】

ある特定の上記CRNの調製を教示する代表的な公報としては、米国特許出願公開第2013/0190383号及び国際公開第2013/036868号が挙げられるが、これらに限定されず、これらのそれぞれの内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0159】

いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、UNA（アンロックドヌクレオシド）ヌクレオシドである1つ以上のモノマーを含む。UNAは、糖の結合のいずれかが除去されて、ロックされていない「糖」残基を形成した、ロックされていない非環式ヌクレオシドである。一例では、UNAは、C1'-C4'間の結合（すなわち、C1'炭素とC4'炭素間との間の炭素-酸素-炭素共有結合）が除去されたモノマーも包含する。別の例では、糖のC2'-C3'結合（すなわち、C2'炭素とC3'炭素との間の炭素-炭素共有結合）が除去されている（Nuc. Acids Symp. Series, 52, 133-134 (2008) 及び Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039（参照により本明細書に組み込まれる）を参照）。

【0160】

UNAの調製を教示する代表的な米国公開物としては、米国特許第8,314,227号、並びに米国特許出願公開第2013/0096289号、同第2013/0011922号、及び同第2011/0313020号（その内容全体は参照により本明細書に組み込まれる）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0161】

リボースはまた、シクロプロパン環で修飾されて、トリシクロデオキシ核酸（トリシクロDNA）を生成し得る。リボース部分は、別の糖、例えば1,5-アンヒドロヘキシトール、トレオースで置換されてトレオースヌクレオシド（TNA）を生成してもよく、又はアラビノースで置換されてアラビノヌクレオシドを生成してもよい。リボース分子はまた、非糖、例えば、シクロヘキセンで置換されて、シクロヘキセンヌクレオシドを生成してもよく、又はグリコールで置換されて、グリコールヌクレオシドを生成してもよい。

【0162】

ヌクレオシド分子の末端に対する潜在的な安定化修飾としては、N-（アセチルアミノカプロイル）-4-ヒドロキシプロリノール（Hyp-C6-NHAc）、N-（カプロイル）-4-ヒドロキシプロリノール（Hyp-C6）、N-（アセチル-4-ヒドロキシプロリノール（Hyp-NHAc）、チミジン-2'-O-デオキシチミジン（エーテル）、N-（アミノカプロイル）-4-ヒドロキシプロリノール（Hyp-C6-アミノ）、2-ドコサノイル-ウリジン-3','-リン酸、逆塩基dT（idT）などを挙げることができる。この修飾の開示は、国際公開第2011/005861号に見出すことができる。

【0163】

本発明のオリゴヌクレオチドの他の代替化学物質としては、5'リン酸又は5'リン酸模倣体、例えば、オリゴヌクレオチドの5'末端リン酸又はリン酸模倣体が挙げられる。好適なホスフェート模倣体は、例えば、米国特許出願公開第2012/0157511号に開示されており、その内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0164】

本発明の例示的なオリゴヌクレオチドは、代替の糖部分を有するヌクレオシドを含み、DNA又はRNAヌクレオシドも含み得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、代替糖部分を含むヌクレオシド及びDNAヌクレオシドを含む。本発明のオリゴヌクレオチドへの代替ヌクレオシドの組み込みは、標的核酸に対するオリゴヌクレオチドの親和性を増強し得る。その場合、代替ヌクレオシドは、親和性増強代替ヌクレオチドと呼ぶことができる。

【0165】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の代替ヌクレオシド

20

30

40

50

、例えば、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個又は少なくとも16個の代替ヌクレオシドを含む。他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1～10個の代替ヌクレオシド、例えば2～9個の代替ヌクレオシド、例えば3～8個の代替ヌクレオシド、例えば4～7個の代替ヌクレオシド、例えば6又は7個の代替ヌクレオシドを含む。一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、これらの3つのタイプの代替物（代替糖部分、代替核酸塩基、及び代替ヌクレオシド間連結）、又はそれらの組み合わせから独立して選択される代替物を含み得る。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、代替糖部分を含む1つ以上のヌクレオシド、例えば、2'糖代替ヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸（ANA）、2'-フルオロ-ANA、及びBNA（例えば、LNA）ヌクレオシドからなる群より独立して選択される、1つ以上の2'糖代替ヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の代替ヌクレオシドは、BNAである。

10

20

30

40

50

【0166】

いくつかの実施形態では、代替ヌクレオシドのうちの少なくとも1つはBNA（例えば、LNA）であり、例えば、代替ヌクレオシドのうちの少なくとも2つ、例えば少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、又は少なくとも8つがBNAである。なお更なる実施形態では、全ての代替ヌクレオシドが、BNAである。

【0167】

更なる実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの代替ヌクレオシド間連結を含む。いくつかの実施形態では、連続ヌクレオチド配列内のヌクレオシド間連結は、ホスホロチオエート又はボロノホスフェートヌクレオシド間連結である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの連続配列中の全てのヌクレオチド間連結が、ホスホロチオエート連結である。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート連結は、立体化学的に純粋なホスホロチオエート連結である。いくつかの実施形態では、ホスホロチオエート連結は、Spホスホロチオエート連結である。他の実施形態では、ホスホロチオエート連結は、Rpホスホロチオエート連結である。

【0168】

いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、2'-MOE-RNAである少なくとも1つの代替ヌクレオシド、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個の2'-MOE-RNAヌクレオシド単位を含む。いくつかの実施形態では、2'-MOE-RNAヌクレオシド単位は、ホスホロチオエート連結によって接続される。いくつかの実施形態では、当該代替ヌクレオシドのうちの少なくとも1つは、2'-フルオロDNA、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個の2'-フルオロDNAヌクレオシド単位である。いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのBNA単位及び少なくとも1つの2'置換修飾ヌクレオシドを含む。本発明のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2'糖修飾ヌクレオシド及びDNA単位の両方を含む。いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド又はその連続ヌクレオチド領域は、ギャップマーオリゴヌクレオチドである。

【0169】

リガンドにコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド

本発明のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布又は細胞取り込みを増強する、1つ以上のリガンド、部分又はコンジュゲートに化学的に連結され得る。そのような部分としては、脂質部分、例えば、コレステロール部分（Letting et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 6553-6556）、コール酸（Manoharan et al., (1994) Bio

rg. Med. Chem., 4:1053-1060)、チオエーテル、例えば、ベリル-S-トリチルチオール (Manoharan et al., (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci., 660:306-309; Manoharan et al., (1993) Biorg. Med. Chem. Lett., 3:2765-2770)、チオコレステロール (Oberhauser et al., (1992) Nucl. Acids Res., 20:533-538)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオール又はウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al., (1991) J. EMBO J, 10:1111-1118; Kabanov et al., (1990) FEBS Lett., 259:327-330; Svinarchuk et al., (1993), (1995) Biochimie, 75:49-54)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロール又はトリエチルアンモニウム1, 2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-ホスホネート (Manoharan et al., 36:3651-3654; Shea et al., (1990) Nucl. Acids Res., 18:3777-3783)、ポリアミン又はポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., (1995) Nucleosides & Nucleotides, 14:969-973)、又はアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., (1995) Tetrahedron Lett., 36:3651-3654)、パルミチル部分 (Mishra et al., (1995) Biochim. Biophys. Acta, 1264:229-237)、又はオクタデシルアミン若しくはヘキシルアミノ-カルボニルオキシコレステロール部分 (Crooke et al., (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther., 277:923-937) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0170】

一実施形態では、リガンドは、それが組み込まれるオリゴヌクレオチド剤の分布、標的化、又は寿命を変化させる。いくつかの実施形態では、リガンドは、例えば、そのようなリガンドが存在しない種と比較して、選択された標的、例えば、分子、細胞若しくは細胞型、区画、例えば、細胞若しくは器官区画、組織、器官、又は身体の領域に対する増強された親和性をもたらす。

【0171】

リガンドは、天然に存在する物質、例えば、タンパク質 (例えば、ヒト血清アルブミン (HSA)、低密度リポタンパク質 (LDL)、又はグロブリン) ; 炭水化物 (例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリン、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、又はヒアルロン酸) ; 又は脂質を含むことができる。リガンドはまた、組換え分子又は合成分子、例えば、合成ポリアミノ酸などの合成ポリマーであり得る。ポリアミノ酸の例としては、ポリリジン (PLL)、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ(L-ラクチド-コ-グリコリド) コポリマー、ジビニルエーテル-無水マレイン酸コポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル) メタクリルアミドコポリマー (HMPA)、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリウレタン、ポリ(2-エチルアクリル酸)、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、又はポリホスファジンが挙げられる。ポリアミンの例としては、ポリエチレンジイミン、ポリリジン (PLL)、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、プソイドペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、カチオン性ポリフィリン、ポリアミンの四級塩、又は α ヘリックスペプチドが挙げられる。

【0172】

リガンドはまた、標的化基、例えば、細胞又は組織標的化剤、例えばレクチン、糖タンパク質、脂質、又はタンパク質、例えば腎細胞などの特定の細胞型に結合する抗体を含むことができる。標的化基は、サイトロロピン (甲状腺刺激ホルモン)、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントタンパク質A、ムチン炭水化物、多価ラクト

ース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンB12、ビタミンA、ビオチン、又はRGDペプチド若しくはRGDペプチド模倣体であり得る。

【0173】

リガンドの他の例としては、色素、挿入剤（例えば、アクリジン）、架橋剤（例えば、ソラレン、マイトマイシンC）、ポルフィリン（TPPC4、テキサフィリン、サブフィリン）、多環式芳香族炭化水素（例えば、フェナジン、ジヒドロフェナジン）、人工エンドヌクレアーゼ（例えば、EDTA）、親油性分子、例えば、コレステロール、コール酸、アダマンタン酢酸、1-ピレン酪酸、ジヒドロテストステロン、1,3-ビス-O（ヘキサデシル）グリセロール、ゲラニルオキシヘキシル基、ヘキサデシルグリセロール、ボルネオール、メントール、1,3-プロパンジオール、ヘプタデシル基、パルミチン酸、ミリスチン酸、O3-（オレオイル）リトコール酸、O3-（オレオイル）コレン酸、ジメトキシトリチル、又はフェノキサジン）及びペプチドコンジュケート（例えば、アンテナペディアペプチド、Tateペプチド）、アルキル化剤、ホスフェート、アミノ、メルカプト、PEG（例えば、PEG-40K）、MPEG、[MPEG]₂、ポリアミノ、アルキル、置換アルキル、放射性標識マーカー、酵素、ハプテン（例えば、ビオチン）、輸送／吸収促進剤（例えば、アスピリン、ビタミンE、葉酸）、合成リボヌクレアーゼ（例えば、イミダゾール、ビスイミダゾール、ヒスタミン、イミダゾールクラスター、アクリジン-イミダゾールコンジュケート、テトラアザ大環状分子のEu³⁺複合体）、ジニトロフェニル、HRP、又はAPが挙げられる。

【0174】

リガンドは、タンパク質、例えば糖タンパク質、又はペプチド、例えばコリガンドに対して特異的親和性を有する分子、又は抗体、例えば肝細胞などの特定の細胞型に結合する抗体であり得る。リガンドはまた、ホルモン及びホルモン受容体を含み得る。それらはまた、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン、多価マンノース、又は多価フコースなどの非ペプチド種を含むことができる。

【0175】

リガンドは、例えば、細胞の細胞骨格を破壊することによって、例えば、細胞の微小管、マイクロフィラメント、及び／又は中間径フィラメントを破壊することによって、オリゴヌクレオチド剤の細胞への取り込みを増加させることができる物質、例えば、薬物であり得る。薬物は、例えば、タクソン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、ノコダゾール、ジャブラキノリド、ラトランキュリンA、ファロイジン、スウィンホリドA、インダノシン、又はミオセルビンであり得る。

【0176】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドに結合したリガンドは、薬物動態モジュレータ（PKモジュレータ）として作用する。PKモジュレータとしては、親油性物質、胆汁酸、ステロイド、リン脂質類似体、ペプチド、タンパク質結合剤、PEG、ビタミンなどが挙げられる。例示的なPKモジュレータとしては、コレステロール、脂肪酸、コール酸、リトコール酸、ジアルキルグリセリド、ジアシルグリセリド、リン脂質、スフィンゴ脂質、ナプロキセン、イブプロフェン、ビタミンE、ビオチンなどが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかのホスホロチオエート連結を含むオリゴヌクレオチドも血清タンパク質に結合することが知られており、したがって、骨格に複数のホスホロチオエート連結を含む短いオリゴヌクレオチド、例えば、約5塩基、10塩基、15塩基、又は20塩基のオリゴヌクレオチドも、リガンドとして（例えば、PK調節リガンドとして）本発明に適している。更に、血清成分（例えば、血清タンパク質）に結合するアプタマーもまた、本明細書に記載される実施形態におけるPK調節リガンドとしての使用に適している。

【0177】

本発明のリガンドコンジュゲートオリゴヌクレオチドは、ペンダント反応性官能基（例えば、連結分子のオリゴヌクレオチドへの結合に由来するもの（以下に記載される））を有する、オリゴヌクレオチドの使用によって合成され得る。この反応性オリゴヌクレオチドを、市販のリガンド、種々の保護基のいずれかを有する合成されたリガンド、又はそれに結合した連結部分を有するリガンドと直接反応させ得る。

【0178】

本発明のコンジュゲートにおいて使用されるオリゴヌクレオチドは、固相合成の周知の技術によって簡便かつ通常的に作製され得る。このような合成のための装置は、例えば、Applied Biosystems（カリフォルニア州フォスターシティ）を含むいくつかの業者によって販売されている。当該技術分野で公知のこのような合成のための任意の他の手段が、追加的に又は代替的に使用され得る。他のオリゴヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート及びアルキル化誘導体）を調製するために類似の技術を使用することもまた公知である。

10

【0179】

本発明のリガンドコンジュゲートオリゴヌクレオチド、例えば、本発明の配列特異的連結ヌクレオチドを有するリガンド分子において、オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドは、標準的なヌクレオチド若しくはヌクレオチド前駆体、又は連結部分を既に有するヌクレオチド若しくはヌクレオチドコンジュゲート前駆体、リガンド分子を既に有するリガンドーヌクレオチド若しくはヌクレオチドコンジュゲート前駆体、又は非ヌクレオチドリガンド保有構築ブロックを利用して、好適なDNA合成装置上で組み立てられ得る。

20

【0180】

既に連結部分を有するコンジュゲート前駆体を使用する場合、配列特異的連結ヌクレオチドの合成を、典型的には完了させ、次いでリガンド分子を連結部分と反応させてリガンドコンジュゲートオリゴヌクレオチドを形成する。いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチド又は連結ヌクレオチドは、市販されオリゴヌクレオチド合成において通常的に使用されている標準ホスホラミダイト及び非標準ホスホラミダイトに加えて、リガンドーヌクレオチドコンジュゲートに由来するホスホラミダイトを使用して、自動合成装置によって合成される。

【0181】

30

脂質コンジュゲート

一実施形態では、リガンド又はコンジュゲートは、脂質又は脂質ベースの分子である。このような脂質又は脂質ベースの分子は、好ましくは、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン（HSA）に結合する。HSA結合リガンドは、標的組織、例えば、身体の不腎臓標的組織へのコンジュゲートの分布を可能にする。脂質又は脂質ベースのリガンドは、（a）コンジュゲートの分解に対する耐性を向上させる、（b）標的細胞又は細胞膜への標的化又は輸送を向上させる、及び／又は（c）血清タンパク質、例えば、HSAへの結合を調節するために使用することができる。

【0182】

別の態様では、リガンドは、標的細胞、例えば、増殖細胞によって取り込まれる部分、例えばビタミンである。例示的なビタミンとしては、ビタミンA、E、及びKが挙げられる。

40

【0183】

細胞透過剤

別の態様では、リガンドは細胞透過剤、好ましくは、ヘリックス細胞透過剤である。好ましくは、薬剤は、両親媒性である。例示的な薬剤は、tat又はアンテナペディアなどのペプチドである。薬剤がペプチドである場合、ペプチドを修飾することができ、これには、ペプチジル模倣体、逆転異性体、非ペプチド又はプソイドペプチド連結、及びD-アミノ酸の使用が挙げられる。ヘリックス剤は、好ましくは α ヘリックス剤であり、これは、好ましくは親油性相及び疎油性相を有する。

50

【0184】

リガンドは、ペプチド又はペプチド模倣体であり得る。ペプチド模倣体（本明細書においてオリゴペプチド模倣体とも呼ばれる）は、天然ペプチドに類似した画定された三次元構造に折り畳むことができる分子である。オリゴヌクレオチド剤へのペプチド及びペプチド模倣体の結合は、例えば、細胞認識及び吸収を増強することによって、オリゴヌクレオチドの薬物動態分布に影響を及ぼすことができる。ペプチド又はペプチド模倣体部分は、約5～50アミノ酸長、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、又は50アミノ酸長であり得る。

【0185】

ペプチド又はペプチド模倣体は、例えば、細胞透過性ペプチド、カチオン性ペプチド、両親媒性ペプチド、又は疎水性ペプチド（例えば、主にTyr、Trp、又はPheからなる）であり得る。ペプチド部分は、デンドリマーペプチド、拘束ペプチド、又は架橋ペプチドであり得る。別の代替例において、ペプチド部分は、疎水性膜移行配列（membrane translocation sequence、MTS）を含むことができる。例示的な疎水性MTS含有ペプチドは、アミノ酸配列AAVALLPVLLALLAPを有するRFGFである。疎水性MTSを含有するRFGF類似体（例えば、アミノ酸配列AALLPVLLAAP）もまた、標的化部分であり得る。ペプチド部分は、ペプチド、オリゴヌクレオチド、及びタンパク質を含む大きな極性分子を、細胞膜を横切って運ぶことができる、「送達」ペプチドであり得る。例えば、HIV Tatタンパク質（GRKKRRQRRRPQ）及びDrosophilaアンテナペディアンタンパク質（RQIKIWFQNRRMKWKK）由来の配列は、送達ペプチドとして機能することができることを見出された。ペプチド又はペプチド模倣体は、ファージディスプレイライブラリ、又は1ビーズ1化合物（OBOC）コンビナトリアルライブラリから同定されたペプチドなど、DNAのランダム配列によってコードされ得る（Lam et al., Nature, 354: 82-84, 1991）。細胞標的化目的のために組み込まれたモノマー単位を介してオリゴヌクレオチド剤に連結されたペプチド又はペプチド模倣体の例は、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸（RGD）-ペプチド、又はRGD模倣体である。ペプチド部分は、約5アミノ酸～約40アミノ酸長の範囲であり得る。ペプチド部分は、安定性又は直接的な立体配座特性を向上させるためなどの構造修飾を有することができる。以下に記載する構造修飾のいずれかを利用することができる。

【0186】

本発明の組成物及び方法における使用のためのRGDペプチドは、直鎖状又は環状であり得、そして特定の組織への標的化を容易にするために修飾（例えば、グリコシル化又はメチル化）され得る。RGD含有ペプチド及びペプチド模倣体は、D-アミノ酸に加えて、合成RGD模倣体を含み得る。RGDに加えて、インテグリンリガンドを標的とする他の部分を使用することができる。このリガンドのいくつかのコンジュゲートは、PECAM-1又はVEGFを標的とする。

【0187】

細胞透過性ペプチドは、細胞、例えば、細菌若しくは真菌細胞などの微生物細胞、又はヒト細胞などの哺乳動物細胞を透過することができる。微生物細胞透過性ペプチドは、例えば、 α -ヘリックス直鎖状ペプチド（例えば、LL-37若しくはセクロピンP1）、ジスルフィド結合含有ペプチド（例えば、 α -デフェンシン、 β -デフェンシン、若しくはバクテネシン）、又は1つ若しくは2つのみの優勢アミノ酸を含有するペプチド（例えば、PR-39若しくはインドリシジン）であり得る。細胞透過性ペプチドはまた、核局在化シグナル（NLS）を含むことができる。例えば、細胞透過性ペプチドは、HIV-1 gp41の融合ペプチドドメイン及びSV40ラージT抗原のNLSに由来する、MPGなどの二部型両親媒性ペプチドであり得る（Simeoni et al., Nucleic Acid Res. 31: 2717-2724, 2003）。

【0188】

炭水化物コンジュゲート

本発明の組成物及び方法のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、炭水化物を更に含む。炭水化物コンジュゲートオリゴヌクレオチドは、核酸のインビボ送達、及び本明細書に記載されるようなインビトロ治療使用に適した組成物に有利である。本明細書で使用される場合、「炭水化物」は、少なくとも6個の炭素原子（これは、直鎖、分岐又は環状であり得る）を有し、各炭素原子に結合した酸素、窒素、若しくは硫黄原子を有する1つ以上の単糖単位から本質的に構成される炭水化物である化合物、又は各々少なくとも6個の炭素原子（これは、直鎖、分岐又は環状であり得る）を有し、各炭素原子に結合した酸素原子、窒素原子、若しくは硫黄原子を有する1つ以上の単糖単位から構成される炭水化物部分を一部として有する化合物のいずれかを指す。代表的な炭水化物としては、糖（単糖、二糖、三糖及び約4、5、6、7、8、又は9個の単糖単位を含有するオリゴ糖）、並びにデンプン、グリコーゲン、セルロース及び多糖ガムなどの多糖が挙げられる。具体的な単糖としては、C5以上（例えば、C5、C6、C7、又はC8）の糖が挙げられ、二糖及び三糖としては、2つ又は3つの単糖単位（例えば、C5、C6、C7、又はC8）を有する糖が挙げられる。

10

【0189】

一実施形態では、本発明の組成物及び方法において使用するための炭水化物コンジュゲートは、単糖である。

【0190】

いくつかの実施形態では、炭水化物コンジュゲートは、PKモジュレータ及び／又は細胞透過ペプチドなどであるがこれらに限定されない、上記の1つ以上の追加のリガンドを更に含む。

20

【0191】

本発明における使用に適した追加の炭水化物コンジュゲート（及びリンカー）としては、国際公開第2014/179620号及び同第2014/179627号に記載されるものが挙げられ、これらの各々の内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0192】

リンカー

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲート又はリガンドは、切断可能又は切断不能であり得る様々なリンカーを用いてオリゴヌクレオチドに結合することができる。

30

【0193】

リンカーは、典型的には、直接結合又は酸素原子若しくは硫黄原子などの原子、 NR^8 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NH}$ 、 SO 、 SO_2 、 SO_2NH などの単位、又は限定されないが、置換若しくは非置換アルキル、置換若しくは非置換アルケニル、置換若しくは非置換アルキニル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールアルキニル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロアリールアルケニル、ヘテロアリールアルキニル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルキルアリールアルキル、アルキルアリールアルケニル、アルキルアリールアルキニル、アルケニルアリールアルキル、アルケニルアリールアルケニル、アルケニルアリールアルキニル、アルキニルアリールアルキル、アルキニルアリールアルケニル、アルキニルアリールアルキニル、アルキルヘテロアリールアルキル、アルキルヘテロアリールアルケニル、アルキルヘテロアリールアルキニル、アルケニルヘテロアリールアルキル、アルケニルヘテロアリールアルケニル、アルケニルヘテロアリールアルキニル、アルキニルヘテロアリールアルキル、アルキニルヘテロアリールアルケニル、アルキニルヘテロアリールアルキニル、アルキルヘテロシクリルアルキル、アルキルヘテロシクリルアルケニル、アルキルヘテロシクリルアルキニル、アルケニルヘテロシクリルアルキル、アルケニルヘテロシクリルアルケニル、アルケニルヘテロシクリルアルキニル、アルキニルヘテロシクリルアルキル、アルキニルヘテロシクリルアルケニル、アルキニルヘテロシクリルアルキニル、アルキルアリール、アルケニルアリール、アルキニルアリール、アルキルヘテロアリール、アルケニルヘテロアリ

40

50

ール、アルキニルヘテロアリールなどの原子鎖を含み、1つ以上のメチレンは、O、S、S(O)、SO₂、N(R⁸)、C(O)、置換若しくは非置換アリール、置換若しくは非置換ヘテロアリール、置換若しくは非置換複素環によって中断又は終結され得、式中、R⁸は、水素、アシル、脂肪族、又は置換脂肪族である。一実施形態では、リンカーは、約1~24個の原子、2~24、3~24、4~24、5~24、6~24、6~18、7~18、8~18個の原子、7~17、8~17、6~16、7~17、又は8~16個の原子である。

【0194】

切断可能連結基は、細胞外では十分に安定であるが、標的細胞に入ると切断されて、リンカーと一緒に保持している2つの部分を放出する基である。好ましい実施形態では、切断可能連結基は、標的細胞中で、又は第1の参照条件（例えば、細胞内条件を再現又は代表するように選択され得る）下で、対象の血液中よりも、又は第2の参照条件（例えば、血液又は血清中で見出される条件を再現又は代表するように選択され得る）下よりも、少なくとも約10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、若しくはそれ以上、又は少なくとも100倍速く切断される。

10

【0195】

切断可能連結基は、切断剤（切断作用因子）（例えば、pH、レドックス電位又は分解性分子の存在）に対して感受性である。概して、切断剤は、血清又は血液中よりも細胞内でより優勢であるか、又はより高いレベル若しくは活性で見出される。そのような分解剤の例としては、特定の基質に対して選択的であるか、又は基質特異性を有していないレドックス剤（例えば、細胞内に存在する酸化酵素若しくは還元酵素又はメルカプタンなどの還元剤で、還元によってレドックス切断可能連結基を分解することできるものなど）、エステラーゼ；エンドソーム又は酸性環境を作り出すことができる剤、例えば、5以下のpHをもたらす剤、一般酸、ペプチダーゼ（基質特異的であり得る）、及びホスファターゼとして作用することにより、酸切断可能連結基を加水分解又は分解することができる酵素が挙げられる。

20

【0196】

切断可能連結基、例えば、ジスルフィド結合は、pHに感受性であり得る。ヒト血清のpHは、7.4であるが、平均細胞内pHは、わずかに低く、約7.1~7.3の範囲である。エンドソームは、5.5~6.0の範囲のより酸性のpHを有し、リソソームは、約5.0の更により酸性のpHを有する。いくつかのリンカーは、好ましいpHで切断される切断可能連結基を有し、それによって細胞内のリガンドから、又は細胞の所望の区画内にカチオン性脂質を放出する。

30

【0197】

リンカーは、特定の酵素によって切断可能な切断可能連結基を含むことができる。コンジュゲートに組み込まれる切断可能連結基のタイプは、標的化されるべき細胞に応じて異なり得る。例えば、肝臓標的化リガンドは、エステル基を含むリンカーを介して、カチオン性脂質に連結することができる。肝細胞は、エステラーゼが豊富であり、したがって、リンカーは、エステラーゼが豊富でない細胞型よりも肝細胞においてより効率的に切断される。エステラーゼが豊富な他の細胞型としては、肺、腎皮質、及び精巣の細胞が挙げられる。

40

【0198】

ペプチド結合を含有するリンカーは、肝細胞及び滑膜細胞などのペプチダーゼが豊富な細胞型を標的とする場合に使用することができる。

【0199】

概して、候補切断可能連結基の好適性は、候補連結基を切断する分解剤の能力（又は条件）を試験することによって評価することができる。血液中で、又は他の非標的組織と接触した場合に切断に抵抗する能力について、候補切断可能連結基を試験することもまた望ましい。したがって、第1の条件と第2の条件との間の切断に対する相対的な感受性を決定し得、第1の条件は、標的細胞における切断を示すように選択され、第2の条件は、他

50

の組織又は生物学的流体、例えば、血液又は血清における切断を示すように選択される。評価は、無細胞系において、細胞において、細胞培養物において、器官若しくは組織培養物において、又は動物全体において行うことができる。初期評価を無細胞又は培養条件で行い、動物全体における更なる評価によって確認することが有用であり得る。好ましい実施形態では、有用な候補化合物は、血液又は血清（又は細胞外条件を再現するように選択されたインビトロ条件下）と比較して、細胞（又は細胞内条件を再現するように選択されたインビトロ条件下）において少なくとも2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は約100倍速く切断される。

【0200】

レドックス切断可能連結基

一実施形態では、切断可能連結基は、還元又は酸化の際に切断されるレドックス切断可能連結基である。還元的切断可能連結基の例は、ジスルフィド連結基（ $-S-S-$ ）である。候補切断可能連結基が好適な「還元的切断可能連結基」であるか、又は例えば、特定のオリゴヌクレオチド部分及び特定の標的化剤で使用するのに好適であるかを決定するために、本明細書に記載される方法を検討することができる。例えば、候補は、細胞、例えば、標的細胞において観察される切断速度を再現する当該技術分野で公知の試薬を使用して、ジチオスレイトール（DTT）又は他の還元剤とのインキュベーションによって評価することができる。候補はまた、血液又は血清条件を再現するように選択された条件下で評価することができる。一実施形態では、候補化合物は、血液中で最大約10%切断される。他の実施形態では、有用な候補化合物は、血液（又は細胞外条件を再現するように選択されたインビトロ条件下）と比較して、細胞（又は細胞内条件を再現するように選択されたインビトロ条件下）において少なくとも約2、4、10、20、30、40、50、60、70、80、90、又は約100倍速く分解される。候補化合物の切断速度は、細胞内媒体を再現するように選択された条件下で標準的な酵素動態アッセイを使用して決定し、細胞外媒体を再現するように選択された条件と比較することができる。

【0201】

ホスフェートベースの切断可能連結基

別の実施形態では、切断可能リンカーは、ホスフェートベースの切断可能連結基を含む。ホスフェートベースの切断可能連結基は、ホスフェート基を分解又は加水分解する剤によって切断される。細胞内のホスフェート基（リン酸基）を切断する剤の例は、細胞内のホスファターゼなどの酵素である。ホスフェートベースの連結基の例は、 $-O-P(O)(OR^k)-O-$ 、

$-O-P(S)(OR^k)-O-$ 、 $-O-P(S)(SR^k)-O-$ 、 $-S-P(O)(OR^k)-O-$ 、 $-O-P(O)(OR^k)-S-$ 、 $-S-P(O)(OR^k)-S-$ 、 $-O-P(S)(OR^k)-S-$ 、 $-S-P(S)(OR^k)-O-$ 、 $-O-P(O)(R^k)-O-$ 、 $-O-P(S)(R^k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R^k)-O-$ 、 $-S-P(S)(R^k)-O-$ 、 $-S-P(O)(R^k)-S-$ 、 $-O-P(S)(R^k)-S-$ である。これらの候補

は、上記の方法と類似の方法を使用して評価することができる。

【0202】

酸切断可能連結基

別の実施形態では、切断可能リンカーは、酸切断可能連結基を含む。酸切断可能連結基は、酸性条件下で切断される連結基である。好ましい実施形態では、酸切断可能連結基は、約6.5以下（例えば、約6.0、5.75、5.5、5.25、5.0、又はそれ以下）のpHを有する酸性環境において、又は一般酸として作用し得る酵素などの剤によって切断される。細胞において、エンドソーム及びリソソームなどの特定の低pHオルガネラは、酸切断可能連結基のための切断環境を提供することができる。酸切断可能連結基の例としては、ヒドラゾン、エステル、及びアミノ酸のエステルが挙げられるが、これらに限定されない。酸切断可能基は、一般式 $-C=NN-$ 、 $C(O)O$ 、又は $-OC(O)$ を有することができる。好ましい実施形態は、エステル（アルコキシ基）の酸素に結合した

炭素が、アリール基、置換アルキル基、又はジメチルペンチル若しくはセブチルなどの第三級アルキル基である場合である。これらの候補は、上記の方法と類似の方法を使用して評価することができる。

【0203】

エステルベースの連結基

別の実施形態では、切断可能リンカーは、エステルベースの切断可能連結基を含む。エステルベースの切断可能連結基は、細胞中のエステラーゼ及びアミダーゼなどの酵素によって切断される。エステルベースの切断可能基の例としては、エステルの、アルキレン基、アルケニレン基、及びアルキニレン基が挙げられるが、これらに限定されない。エステル切断可能連結基は、一般式 $-C(O)O-$ 又は $-OC(O)-$ を有する。これらの候補は、上記の方法と類似の方法を使用して評価することができる。

10

【0204】

ペプチドベースの切断基

更に別の実施形態では、切断可能リンカーは、ペプチドベースの切断可能連結基を含む。ペプチドベースの切断可能連結基は、細胞中のペプチダーゼ及びプロテアーゼなどの酵素によって切断される。ペプチドベースの切断可能連結基は、アミノ酸間に形成されてオリゴペプチド（例えば、ジペプチド、トリペプチドなど）及びポリペプチドを生じる、ペプチド結合である。ペプチドベースの切断可能基は、アミド基 $(-C(O)NH-)$ を含むものではない。アミド基は、任意のアルキレン、アルケニレン、又はアルキニレンの間で形成することができる。ペプチド結合は、アミノ酸間に形成されてペプチド及びタンパク質を生じる、特定のタイプのアミド結合である。ペプチドベースの切断可能基は、概して、ペプチド及びタンパク質を生じるアミノ酸間に形成されるペプチド結合（すなわち、アミド結合）に限定され、アミド官能基全体を含むものではない。ペプチドベースの切断可能連結基は、以下の一般式を有し、

20

【0205】

$-NHCHR^A C(O)NHCHR^B C(O)-$ 、式中、 R^A 及び R^B は、2つの隣接するアミノ酸のR基である。これらの候補は、上記の方法と類似の方法を使用して評価することができる。

【0206】

一実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、リンカーを介して炭水化物にコンジュゲートされる。リンカーは、二価及び三価の分岐リンカー基を含む。オリゴヌクレオチド炭水化物コンジュゲートのためのリンカーとしては、国際公開第2018/195165号の式24～35に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0207】

オリゴヌクレオチドコンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許としては、米国特許第4,828,979号、同第4,948,882号、同第5,218,105号、同第5,525,465号、同第5,541,313号、同第5,545,730号、同第5,552,538号、同第5,578,717号、同第5,580,731号、同第5,591,584号、同第5,109,124号、同第5,118,802号、同第5,138,045号、同第5,414,077号、同第5,486,603号、同第5,512,439号、同第5,578,718号、同第5,608,046号、同第4,587,044号、同第4,605,735号、同第4,667,025号、同第4,762,779号、同第4,789,737号、同第4,824,941号、同第4,835,263号、同第4,876,335号、同第4,904,582号、同第4,958,013号、同第5,082,830号、同第5,112,963号、同第5,214,136号、同第5,082,830号、同第5,112,963号、同第5,214,136号、同第5,245,022号、同第5,254,469号、同第5,258,506号、同第5,262,536号、同第5,272,250号、同第5,292,873号、同第5,317,098号、同第5,371,241号、同第5,391,723号、同第5,416,203号、同第5,451,463号、同第5,510,475号、同

40

50

第5, 512, 667号、同第5, 514, 785号、同第5, 565, 552号、同第5, 567, 810号、同第5, 574, 142号、同第5, 585, 481号、同第5, 587, 371号、同第5, 595, 726号、同第5, 597, 696号、同第5, 599, 923号、同第5, 599, 928号、同第5, 688, 941号、同第6, 294, 664号、同第6, 320, 017号、同第6, 576, 752号、同第6, 783, 931号、同第6, 900, 297号、同第7, 037, 646号、同第8, 106, 022号が挙げられるが、これらに限定されない（これらの各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる）。

【0208】

所与の化合物中の全ての位置が均一に修飾される必要はなく、実際には、前述の修飾のうち2つ以上を、単一の化合物に、又は更にオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオシドに組み込むことができる。本発明はまた、キメラ化合物であるオリゴヌクレオチド化合物を含む。キメラオリゴヌクレオチドは、典型的には、ヌクレアーゼ分解に対する耐性の向上、細胞取り込みの向上、及び／又は標的核酸に対する結合親和性の向上をオリゴヌクレオチドに付与するようにRNAが修飾されている、少なくとも1つの領域を含む。オリゴヌクレオチドの追加の領域は、RNA:DNAを切断することができる酵素の基質として機能することができる。例として、RNase Hは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する、細胞エンドヌクレアーゼである。したがって、RNase Hの活性化は、RNA標的の切断をもたらし、それによって遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の効率を大幅に増強する。結果として、キメラオリゴヌクレオチドが使用される場合、同じ標的領域にハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、より短いオリゴヌクレオチドを用いて同等の結果が得られることが多い。RNA標的の切断は、ゲル電気泳動、及び必要に応じて、当該技術分野で公知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技術によって通常的に検出され得る。

【0209】

ある特定の例において、オリゴヌクレオチドのヌクレオチドは、非リガンド基によって修飾することができる。多くの非リガンド分子が、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、又は細胞取り込みを増強するためにオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされており、このようなコンジュゲーションを行うための手順は、科学文献において入手可能である。このような非リガンド部分は、脂質部分、例えば、コレステロール (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365 (1): 54-61; Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553)、コール酸 (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4: 1053)、チオエーテル、例えば、ヘキシル-S-トリチルチオール (Manoharan et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, 660: 306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3: 2765)、チオコレステロール (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20: 533)、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオール又はウンデシル残基 (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10: 111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259: 327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75: 49)、リン脂質、例えば、ジ-ヘキサデシル-rac-グリセロール若しくはトリエチルアンモニウム1, 2-ジ-0-ヘキサデシル-rac-グリセロール-3-H-ホスホネート (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18: 3777)、ポリアミン若しくはポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14: 969)、又はアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651)、パルミチル

部分 (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229)、又はオクタデシルアミン若しくはヘキシルアミノカルボニル-オキシコレステロール部分 (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. 1996:277-923) を含んでいた。このようなオリゴヌクレオチドコンジュゲートの調製を教示する代表的な米国特許は、上に列挙されている。典型的なコンジュゲーションプロトコルは、配列の1つ以上の位置にアミノリンカーを有するオリゴヌクレオチドの合成を伴う。次いで、アミノ基を、適切なカップリング試薬又は活性化試薬を使用して、コンジュゲートされる分子と反応させる。コンジュゲーション反応は、固相支持体にまだ結合しているオリゴヌクレオチドを用いて、又はオリゴヌクレオチドの切断後に、溶液相中で行うことができる。HPLCによるオリゴヌクレオチドコンジュゲートの精製によって、典型的には純粋なコンジュゲートが得られる。

10

【0210】

薬学的使用

本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド組成物は、本発明の方法において有用であり、理論に束縛されるものではないが、例えば、哺乳動物の細胞におけるPCDH19タンパク質の活性又はレベルを阻害することによって、PCDH19のレベル、状態、及び／又は活性を調節するそれらの能力を通じて、望ましい効果を発揮すると考えられる。

【0211】

本発明の一態様は、必要とする対象においてPCDH19に関連する障害（例えば、てんかん、統合失調症、及び自閉症）を治療する方法に関する。本発明の別の態様は、PCDH19関連障害を有すると同定された対象の細胞においてPCDH19のレベルを、（例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、99%、又は100%）低下させることを含む。更に別の態様は、対象の細胞におけるPCDH19の発現を阻害する方法を含む。本方法は、細胞を、細胞においてPCDH19の発現を阻害するのに有効な量のオリゴヌクレオチドと接触させ、それによって細胞におけるPCDH19の発現を阻害することを含むことができる。

20

【0212】

上記の方法に基づいて、本発明の更なる態様は、治療における使用のための、又は医薬としての使用のための、又は必要とする対象におけるPCDH19関連障害の治療における使用のための、又はPCDH19関連障害を有すると同定された対象の細胞におけるPCDH19のレベルの低減における使用のための、又は対象における細胞におけるPCDH19の発現の阻害における使用のための、本発明のオリゴヌクレオチド、又はそのようなオリゴヌクレオチドを含む組成物を含む。この使用は、細胞を、細胞においてPCDH19の発現を阻害するのに有効な量のオリゴヌクレオチドと接触させ、それによって細胞においてPCDH19の発現を阻害することを含む。本発明の方法に関連して以下に記載される実施形態は、これらの更なる態様にも適用可能である。

30

【0213】

細胞とオリゴヌクレオチドとの接触は、インビトロ又はインビボで行われ得る。細胞をオリゴヌクレオチドとインビボで接触させることは、対象、例えばヒト対象内の細胞又は細胞群をオリゴヌクレオチドと接触させることを含む。細胞を接触させるインビトロ方法とインビボ方法との組み合わせも可能である。細胞を接触させることは、上記のように、直接的又は間接的であり得る。更に、細胞を接触させることは、本明細書に記載されるか又は当該技術分野で公知の任意のリガンドを含む、標的化リガンドを介して達成され得る。いくつかの実施形態では、標的化リガンドは、炭水化物部分、例えば、GalNAc₃ リガンド、又はオリゴヌクレオチドを目的の部位に指向させる任意の他のリガンドである。細胞としては、中枢神経系の細胞又は筋細胞が挙げられ得る。

40

【0214】

PCDH19遺伝子の発現を阻害することは、PCDH19遺伝子の任意のレベルの阻害、例えば、PCDH19遺伝子の発現の少なくとも部分的な抑制、例えば少なくとも約20%の阻害を含む。ある特定の実施形態では、阻害は、少なくとも約25%、少なくと

50

も約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%である。

【0215】

P C D H 1 9 遺伝子の発現を阻害することは、W T 対立遺伝子、変異型対立遺伝子、又はそれらの組み合わせの発現を阻害することを含む。例えば、対象は、P C D H 1 9 遺伝子の一方の対立遺伝子に変異（例えば、ナンセンス、ミスセンス、及び／又はフレームシフト変異）を有し得る。遺伝子はX連鎖性であるので、女性対象はヘテロ接合性であり、男性対象はヘミ接合性である（他方のコピーは不活性化されている）。オリゴヌクレオチドは、変異型対立遺伝子を選択的に標的とし得る。オリゴヌクレオチドは、W T 対立遺伝子を選択的に標的とし得る。オリゴヌクレオチドは、両方の対立遺伝子を標的とし得る。

【0216】

P C D H 1 9 遺伝子の発現は、P C D H 1 9 遺伝子発現に関連する任意の可変要素のレベル、例えば、P C D H 1 9 mRNAレベル又はP C D H 1 9 タンパク質レベルに基づいて評価され得る。

【0217】

阻害は、対照レベルと比較したこれらの可変要素の1つ以上の絶対レベル又は相対レベルの低下によって評価され得る。対照レベルは、当該技術分野で利用される任意のタイプの対照レベル、例えば、投与前ベースラインレベル、又は対照（例えば、緩衝液のみの対照又は不活性薬剤対照など）で治療されていない又は治療されている同様の対象、細胞、又は試料から決定されたレベルであり得る。

【0218】

ある特定の実施形態では、代用マーカーを使用して、P C D H 1 9 の阻害を検出することができる。例えば、P C D H 1 9 関連障害の有効な治療は、P C D H 1 9 発現を低下させる薬剤を用いた許容可能な診断及びモニタリング基準によって示されるように、P C D H 1 9 の臨床的に関連する低下を示すと理解することができる。

【0219】

本発明の方法のいくつかの実施形態では、P C D H 1 9 遺伝子の発現は、少なくとも20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、若しくは95%阻害され、又はアッセイの検出レベル未満まで阻害される。ある特定の実施形態では、本方法は、例えば、P C D H 1 9 の発現を低下させる薬剤による対象の治療後の臨床的に関連する転帰によって示されるような、P C D H 1 9 の発現の臨床的に関連する阻害を含む。

【0220】

P C D H 1 9 遺伝子の発現の阻害は、第1の細胞又は細胞群と実質的に同一であるが、処置されていない第2の細胞又は処置されていない第2の細胞群（目的の遺伝子を標的とするオリゴヌクレオチドで処置されていない対照細胞）と比較して、P C D H 1 9 遺伝子の発現が阻害されるように、P C D H 1 9 遺伝子が転写され、処置された（例えば、細胞を本発明のオリゴヌクレオチドと接触させることによって、又は細胞が存在するか又は存在していた対象に本発明のオリゴヌクレオチドを投与することによって）、第1の細胞又は細胞群（このような細胞は、例えば、対象由来の試料中に存在し得る）によって発現されるmRNAの量の減少によって明らかにされ得る。阻害の程度は、以下の式で表され得る。

【数1】

$$\left(\text{対照細胞中のmRNA} \right) - \left(\text{処置された細胞中のmRNA} \right) / \left(\left(\text{対照細胞中のmRNA} \right) \right) \times 100\%$$

10

20

30

40

50

【0221】

他の実施形態では、PCDH19遺伝子の発現の阻害は、PCDH19遺伝子発現、例えば、PCDH19タンパク質発現又はPCDH19活性に機能的に関連するパラメータの低減に関して評価され得る。PCDH19遺伝子サイレンシングは、発現構築物から内因性又は異種のいずれかのPCDH19を発現する任意の細胞において、当該技術分野で公知の任意のアッセイによって決定され得る。

【0222】

PCDH19タンパク質の発現の阻害は、細胞又は細胞群によって発現されるPCDH19タンパク質のレベル（例えば、対象に由来する試料において発現されるタンパク質のレベル）の低下によって明らかにされ得る。上記で説明したように、mRNA抑制の評価のために、処置された細胞又は細胞群におけるタンパク質発現レベルの阻害は、同様に、対照細胞又は細胞群におけるタンパク質レベルのパーセンテージとして表され得る。

【0223】

PCDH19遺伝子の発現の阻害を評価するために使用され得る対照細胞又は細胞群としては、本発明のオリゴヌクレオチドとまだ接触していない細胞又は細胞群が挙げられる。例えば、対照細胞又は細胞群は、対象をオリゴヌクレオチドで処置する前の個々の対象（例えば、ヒト又は動物対象）に由来し得る。

【0224】

細胞又は細胞群によって発現されるPCDH19 mRNAのレベルは、mRNA発現を評価するための当該技術分野で公知の任意の方法を用いて決定され得る。一実施形態では、試料中のPCDH19の発現レベルは、転写されたポリヌクレオチド又はその一部分、例えば、PCDH19遺伝子のmRNAを検出することによって決定される。RNAは、例えば、酸フェノール／グアニジンイソチオシアネート抽出（RNAzol B；Bioogenesiss）、RNEASY（商標）RNA調製キット（Qiagen）、又はPAXgene（PreAnalytix、スイス）の使用を含む、RNA抽出技術を用いて細胞から抽出され得る。リボ核酸ハイブリダイゼーションを利用する典型的なアッセイ形式としては、核ランオンアッセイ、RT-PCR、RNase保護アッセイ、ノーザンブロッティング、インサイチュハイブリダイゼーション、及びマイクロアレイ分析が挙げられる。循環PCDH19 mRNAは、国際公開第2012／177906号（その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法を用いて検出され得る。いくつかの実施形態では、PCDH19の発現レベルは、核酸プローブを使用して決定される。本明細書で使用される「プローブ」という用語は、特定のPCDH19配列、例えば、mRNA又はポリペプチドに選択的に結合することができる、任意の分子を指す。プローブは、当業者によって合成され得、又は適切な生物学的調製物に由来し得る。プローブは、標識されるように特異的に設計され得る。プローブとして利用され得る分子の例としては、RNA、DNA、タンパク質、抗体、及び有機分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0225】

単離されたmRNAは、サザン又はノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）分析、及びプローブアレイを含むがこれらに限定されない、ハイブリダイゼーション又は増幅アッセイにおいて使用することができる。mRNAレベルを決定するための1つの方法は、単離されたmRNAを、PCDH19 mRNAにハイブリダイズすることができる核酸分子（プローブ）と接触させることを伴う。一実施形態では、mRNAは、固体表面上に固定化され、例えば、単離されたmRNAをアガロースゲル上で泳動し、mRNAをゲルからニトロセルロースなどの膜に移すことによって、プローブと接触させられる。別の実施形態では、プローブを固体表面上に固定化し、mRNAを、例えばAFFYMETRIX遺伝子チップアレイ中でプローブと接触させる。当業者であれば、PCDH19 mRNAのレベルを決定する際に使用するために、既知のmRNA検出方法を容易に適合させることができる。

【0226】

試料中のPCDH19の発現レベルを決定するための代替方法は、例えば、RT-PCR (Mullis, 1987, 米国特許第4,683,202号に記載されている実験の実施形態)、リガーゼ連鎖反応 (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193)、自己持続配列複製 (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅システム (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-ベータレプリカーゼ (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197)、ローリングサークル複製 (Lizardi et al., 米国特許第5,854,033号)、又は任意の他の核酸増幅法による、核酸増幅及び／又は(cDNAを調製する)逆転写酵素のプロセスを伴い、その後、当業者に周知の技術を使用して増幅された分子の検出を行うことができる。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に少ない数で存在する場合、そのような核酸分子の検出に特に有用である。本発明の特定の態様では、PCDH19の発現レベルは、定量的蛍光発生RT-PCR(すなわち、TAQMAN(商標)システム)又はDUAL-GLO(登録商標)ルシフェラーゼアッセイによって決定される。

10

【0227】

PCDH19 mRNAの発現レベルは、膜プロット(ノーザン、サザン、ドットなどのハイブリダイゼーション分析で使用されるものなど)、又はマイクロウェル、試料チューブ、ゲル、ビーズ、若しくはファイバー(又は結合した核酸を含む任意の固体支持体)を使用してモニターされ得る。例えば、米国特許第5,770,722号、同第5,874,219号、同第5,744,305号、同第5,677,195号、及び同第5,445,934号(全て参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。PCDH19発現レベルの決定は、溶液中の核酸プローブを使用することも含み得る。

20

【0228】

いくつかの実施形態では、mRNA発現のレベルは、分岐DNA(bDNA)アッセイ又はリアルタイムPCR(qPCR)を使用して評価される。このPCR法の使用は、本明細書に提示される実施例に記載され、例示される。このような方法は、PCDH19核酸の検出のためにも使用することができる。

【0229】

PCDH19タンパク質発現のレベルは、タンパク質レベルの測定のための当該技術分野で公知の任意の方法を用いて決定され得る。このような方法としては、例えば、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、超拡散クロマトグラフィー、液体又はゲル沈降反応、吸収分光法、比色アッセイ、分光光度アッセイ、フローサイトメトリー、免疫拡散(単一又は二重)、免疫電気泳動、ウェスタンブロッティング、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫蛍光アッセイ、電気化学発光アッセイなどが挙げられる。このようなアッセイはまた、PCDH19タンパク質の存在又は複製を示すタンパク質の検出にも使用することができる。

30

【0230】

本発明の方法のいくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドが対象内の特定の部位に送達されるように対象に投与される。PCDH19の発現の阻害は、対象内の特定の部位に由来する試料中のPCDH19 mRNA又はPCDH19タンパク質のレベル又はレベルの変化の測定を用いて評価され得る。ある特定の実施形態では、本方法は、例えば、PCDH19の発現を低下させる薬剤による対象の治療後の臨床的に関連する転帰によって示されるような、PCDH19の発現の臨床的に関連する阻害を含む。

40

【0231】

他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、PCDH19関連障害の1つ以上の症状の低減(例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、9

50

0%、又は100%)をもたらすのに有効な量及び時間で投与される。このような症状としては、長期発作、頻繁発作、行動及び発達遅延、運動及び平衡問題、整形外科的状态、言語及び発話の遅延問題、成長及び栄養問題、睡眠障害、慢性感染症、感覚統合障害、自律神経系の乱れ、並びに発汗が挙げられるが、これらに限定されない。

【0232】

PCDH19関連障害の治療は、未治療対象の集団と比較して、本発明によって治療された個体又は対象の集団の平均生存期間の向上をもたらし得る。例えば、個体の生存期間又は集団の平均生存期間は、30日超(60日、90日、又は120日超)向上する。個体の生存期間又は集団の平均生存期間の向上は、任意の再現可能な手段によって測定され得る。個体の生存期間の向上は、例えば、個体について、本明細書に記載の化合物による治療の開始後の生存期間の長さを計算することによって測定され得る。集団の平均生存期間の向上は、例えば、本明細書に記載の化合物による治療の開始後の生存期間の平均長さを計算することによって測定され得る。個体の生存期間の向上はまた、例えば、本明細書に記載される化合物又は化合物の薬学的に許容される塩による治療の第1ラウンドの完了後の個体の生存期間の長さを計算することによって測定され得る。集団の平均生存期間の向上はまた、例えば、集団について、本明細書に記載される化合物又は化合物の薬学的に許容される塩による治療の第1ラウンドの完了後の生存期間の平均長さを計算することによって測定され得る。

10

【0233】

PCDH19関連障害を治療することはまた、未治療集団と比較して、治療された対象の集団の死亡率の低下をもたらし得る。例えば、死亡率は、2%超(例えば、5%、10%、又は25%超)低下する。治療された対象の集団の死亡率の低下は、任意の再現可能な手段によって、例えば、集団について、本明細書に記載の化合物又は化合物の薬学的に許容される塩による治療の開始後の単位時間当たりの疾患関連死の平均数を計算することによって測定され得る。集団の死亡率の低下は、例えば、集団について、本明細書に記載の化合物又は化合物の薬学的に許容される塩による第1ラウンドの治療の完了後の単位時間当たりの疾患関連死の平均数を計算することによっても測定され得る。

20

【0234】

オリゴヌクレオチドの送達

本発明のオリゴヌクレオチドの、細胞への送達、例えば、ヒト対象などの対象内の細胞への送達、例えば、必要とする対象内の細胞への送達、例えば、PCDH19関連障害を有する対象内の細胞への送達は、いくつかの異なる方法で達成することができる。例えば、送達は、細胞を本発明のオリゴヌクレオチドとインビトロで又はインビボで接触させることによって実行され得る。インビボ送達はまた、オリゴヌクレオチドを含む組成物を対象に投与することによって直接実行され得る。これらの代替例については、以下で更に説明する。

30

【0235】

概して、核酸分子を送達する任意の方法(インビトロ又はインビボ)を、本発明のオリゴヌクレオチドで使用するために適合させることができる(例えば、Akhtar S. 及びJulian RL., (1992) Trends Cell. Biol. 2(5): 139-144、及び国際公開第94/02595号(それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照)。インビボ送達のために、オリゴヌクレオチド分子を送達するために考慮すべき因子としては、例えば、送達される分子の生物学的安定性、非特異的効果の防止、及び標的組織における送達される分子の蓄積が挙げられる。オリゴヌクレオチドの非特異的効果は、局所投与によって、例えば、組織への直接注射若しくは移植、又は調製物の局所投与によって、最小限に抑えることができる。治療部位への局所投与は、薬剤の局所濃度を最大にし、そうでなければ薬剤によって害されるか又は薬剤を分解する可能性のある全身組織への薬剤の曝露を制限し、そして投与されるオリゴヌクレオチド分子のより低い総用量を可能にする。

40

【0236】

50

疾患の治療のためにオリゴヌクレオチドを全身投与する場合、オリゴヌクレオチドは、代替核酸塩基、代替糖部分、及び／又は代替ヌクレオシド間連結を含むことができ、あるいは薬物送達系を使用して送達することができ、両方の方法は、エンド及びエキソヌクレアーゼによってインビボでオリゴヌクレオチドの急速な分解を防止するように作用する。オリゴヌクレオチド又は医薬担体の修飾はまた、標的組織へのオリゴヌクレオチド組成物の標的化を可能にし得、望ましくないオフターゲット効果を回避し得る。オリゴヌクレオチド分子は、コレステロールなどの親油性基への化学的コンジュゲーションによって修飾して、細胞取り込みを増強し、分解を防止することができる。代替実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ナノ粒子、脂質ナノ粒子、ポリプレックスナノ粒子、リポプレックスナノ粒子、デンドリマー、ポリマー、リボソーム、又はカチオン性送達系などの薬物送達系を使用して送達することができる。正に荷電したカチオン性送達系は、オリゴヌクレオチド分子（負に荷電した）の結合を容易にし、そしてまた、負に荷電した細胞膜での相互作用を増強して、細胞によるオリゴヌクレオチドの効率的な取り込みを可能にする。カチオン性脂質、デンドリマー、又はポリマーは、オリゴヌクレオチドに結合されるか、又はオリゴヌクレオチドを包む小胞若しくはミセルを形成するように誘導されるかのいずれかであり得る。小胞又はミセルの形成は、全身投与された場合にオリゴヌクレオチドの分解を更に防止する。概して、当該技術分野で公知の核酸の送達の任意の方法が、本発明のオリゴヌクレオチドの送達に適合可能であり得る。カチオン性オリゴヌクレオチド複合体を複製及び投与するための方法は、十分に当業者の能力の範囲内である（例えば、Sorensen, D.R. et al. (2003) J. Mol. Biol. 327: 761-766 Verma, U.N. et al., (2003) Clin. Cancer Res. 9: 1291-1300; Arnold, A.S. et al., (2007) J. Hypertens. 25: 197-205 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照)。オリゴヌクレオチドの全身送達に有用な薬物送達系のいくつかの非限定的な例としては、DOTAP (Sorensen, D.R., et al (2003), supra; Verma, U.N. et al., (2003), supra)、オリゴフェクタミン「solid nucleic acid lipid particles」(Zimmermann, T.S. et al., (2006) Nature 441: 111-114)、カルジオリピン (Chien, P.Y. et al., (2005) Cancer Gene Ther. 12: 321-328; Pal, A. et al., (2005) Int. J. Oncol. 26: 1087-1091)、ポリエチレンイミン (Bonnet M.E. et al., (2008) Pharm. Res. Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659)、Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチド (Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3: 472-487)、及びポリアミドアミン (Tomalia, D.A. et al., (2007) Biochem. Soc. Trans. 35: 61-67; Yoo, H. et al., (1999) Pharm. Res. 16: 1799-1804) が挙げられる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、全身投与のためにシクロデキストリンと複合体を形成する。オリゴヌクレオチド及びシクロデキストリンの投与方法及び医薬組成物は、米国特許第7,427,605号に見出すことができ、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、ポリプレックス又はリポプレックスナノ粒子によって送達される。オリゴヌクレオチド並びにポリプレックスナノ粒子及びリポプレックスナノ粒子の投与方法及び医薬組成物は、米国特許出願公開【0237】

第2017/0121454号、同第2016/0369269号、同第2016/0279256号、同第2016/0251478号、同第2016/0230189号、同第2015/0335764号、同第2015/0307554号、同第2015/0174549号、同第2014/0342003号、同第2014/0135376号、及び同第2013/0317086に見出すことができる。

10

20

30

40

50

【0238】

膜分子集合体送達方法

本発明のオリゴヌクレオチドはまた、当該技術分野で公知のポリマー送達デバイス、生分解性マイクロ粒子送達デバイス、又はマイクロカプセル送達デバイスを含む、種々の膜分子集合体送達方法を使用して送達することができる。例えば、コロイド分散系が、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド剤の標的化送達のために使用され得る。コロイド分散系としては、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、並びに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む脂質ベースの系が挙げられる。リポソームは、インビトロ及びインビボ送達ビヒクルとして有用な人工膜小胞である。サイズが0.2～4.0 μm の範囲である大きな単層小胞（LUV）は、大きな高分子を含有するかなりのパーセンテージの水性緩衝液を封入することができることが示された。リポソームは、作用部位への活性成分の移動及び送達に有用である。リポソーム膜は生体膜に構造的に類似しているため、リポソームが組織に適用されると、リポソーム二重層は細胞膜の二重層と融合する。リポソームと細胞との融合が進行するにつれて、オリゴヌクレオチドを含む内部水性内容物が細胞内に送達され、オリゴヌクレオチドは標的RNAに特異的に結合することができ、RNAase H媒介遺伝子サイレンシングを媒介することができる。場合によっては、リポソームはまた、例えば、オリゴヌクレオチドを特定の細胞型に指向させるために、特異的に標的化される。リポソームの組成物は、通常、リン脂質の組み合わせであり、通常、ステロイド、特にコレステロールとの組み合わせである。他のリン脂質又は他の脂質も使用され得る。リポソームの物理的特性は、pH、イオン強度、及び二価カチオンの存在に応じて異なる。

10

20

【0239】

オリゴヌクレオチドを含有するリポソームは、様々な方法によって調製することができる。一例では、リポソームの脂質成分は、ミセルが脂質成分で形成されるように、洗剤中に溶解される。例えば、脂質成分は、両親媒性カチオン性脂質又は脂質コンジュゲートであり得る。洗剤は、高い臨界ミセル濃度を有し得、非イオン性であり得る。例示的な洗剤としては、コール酸塩、CHAPS、オクチルグルコシド、デオキシコール酸塩、及びラウロイルサルコシンが挙げられる。次いで、オリゴヌクレオチド調製物を、脂質成分を含むミセルに添加する。脂質上のカチオン性基はオリゴヌクレオチドと相互作用し、オリゴヌクレオチドの周囲で縮合してリポソームを形成する。縮合後、洗剤を、例えば透析によって除去して、オリゴヌクレオチドのリポソーム調製物を得る。

30

【0240】

必要に応じて、縮合を補助する担体化合物を、例えば制御された添加によって縮合反応中に添加することができる。例えば、担体化合物は、核酸以外のポリマー（例えば、スペルミン又はスペルミジン）であり得る。pHは、縮合に有利になるように調整することもできる。

【0241】

送達ビヒクルの構成成分としてポリヌクレオチド／カチオン性脂質複合体を組み込む、安定なポリヌクレオチド送達ビヒクルを産生するための方法は、例えば、国際公開第96／37194号（その内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる）に更に記載されている。リポソーム形成はまた、Feigner, P. L. et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417; 米国特許第4,897,355号; 米国特許第5,171,678号; Bangham et al., (1965) M. Mol. Biol. 23:238; Olson et al., (1979) Biochim. Biophys. Acta 557:9; Szoka et al., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75:4194; Mayhew et al., (1984) Biochim. Biophys. Acta 775:169; Kim et al., (1983) Biochim. Biophys. Acta 728:339、及びFukunaga et al., (1984) Endocrinol. 115:757に記載される例示的な方法の1つ以上の態様も含み得る。

40

50

送達ビヒクルとしての使用に適切なサイズの脂質凝集体を調製するために一般的に使用される技術としては、超音波処理及び凍結融解+押出が挙げられる（例えば、Mayer et al., (1986) Biochim. Biophys. Acta 858:161を参照）。一貫して小さく（50～200nm）かつ比較的均一な凝集体が所望である場合、マイクロ流動化を使用することができる（Mayhew et al., (1984) Biochim. Biophys. Acta 775:169）。これらの方法は、オリゴヌクレオチド調製物をリポソームにパッケージングするために容易に適合される。

【0242】

リポソームは、2つの広い分類に分類される。カチオン性リポソームは、負に荷電した核酸分子と相互作用して安定な複合体を形成する、正に荷電したリポソームである。正に荷電した核酸/リポソーム複合体は、負に荷電した細胞表面に結合し、エンドソーム内に内在化される。エンドソーム内の酸性pHにより、リポソームは破裂し、それらの内容物を細胞質に放出する（Wang et al., (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., 147:980-985）。

【0243】

pH感受性又は負に荷電したリポソームは、核酸と複合体を形成するのではなく、核酸を捕捉する。核酸及び脂質の両方が同様に荷電しているので、複合体形成ではなく反発が起こる。それにもかかわらず、いくつらの核酸は、これらのリポソームの水性内部に捕捉される。pH感受性リポソームは、チミジンキナーゼ遺伝子をコードする核酸を培養物中の細胞単層に送達するために使用された。外因性遺伝子の発現が、標的細胞において検出されている（Zhou et al., (1992) Journal of Controlled Release, 19:269-274）。

【0244】

リポソーム組成物の1つの主要なタイプは、天然由来ホスファチジルコリン以外のリン脂質を含む。中性リポソーム組成物は、例えば、ジミリスティルホスファチジルコリン（DMPC）又はジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）から形成することができる。アニオン性リポソーム組成物は、概してジミリスティルホスファチジルグリセロールから形成され、アニオン性融合性リポソームは、主にジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）から形成される。別のタイプのリポソーム組成物は、例えば、ダイズホスファチジルコリン（PC）及び卵PCなどのPCから形成される。別のタイプは、リン脂質及び/又はホスファチジルコリン及び/又はコレステロールの、混合物から形成される。

【0245】

リポソームをインビトロ及びインビボで細胞に導入する他の方法の例としては、米国特許第5283185号、米国特許第5,171,678号、国際公開第94/00569号、国際公開第93/24640号、国際公開第91/16024号、Feigner, (1994) J. Biol. Chem. 269(2550):Nabel, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307; Nabel, (1992) Human Gene Ther. 3:649; Gershon, (1993) Biochem. 32:7143、及びStrauss, (1992) EMBO J. 11:417が挙げられる。

【0246】

非イオン性リポソーム系、特に、非イオン性界面活性剤及びコレステロールを含む系もまた、皮膚への薬物の送達におけるそれらの有用性を決定するために試験された。NOVASOME（商標）I（ジラウリン酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル）及びNOVASOME（商標）II（ジステアリン酸グリセリル/コレステロール/ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル）を含む非イオン性リポソーム製剤を使用して、シクロスポリン-Aをマウス皮膚の真皮に送達した。結果は、そのような非イオン性リポソーム系が、皮膚の異なる層へのシクロスポリンAの沈着を促進するのに有効であることを示した（Hu et al., (1994) S. T

10

20

30

40

50

. P. Pharma. Sci., 4 (6) : 466)。

【0247】

リポソームはまた、立体的に安定化されたリポソームであり得、これは、1つ以上の特化された脂質を含み、このような特化された脂質を欠くリポソームと比較して、循環寿命の延長をもたらす。立体的に安定化されたリポソームの例は、リポソームの小胞形成脂質部分の一部が、(A) モノシアロガングリオシド G_{M1} などの1つ以上の糖脂質を含むもの、又は(B) ポリエチレングリコール (PEG) 部分などの1つ以上の親水性ポリマーで誘導体化されているものである。いかなる特定の理論にも束縛されるものではないが、少なくともガングリオシド、スフィンゴミエリン、又はPEG誘導体化脂質を含有する立体的に安定化されたリポソームについて、これらの立体的に安定化されたリポソームの循環半減期の延長は、細網内皮系 (RES) の細胞への取り込みの減少に由来すると当該技術分野では考えられている (Allen et al., (1987) FEBS Letters, 223:42; Wu et al., (1993) Cancer Research, 53:3765)。

【0248】

1つ以上の糖脂質を含む種々のリポソームが、当該技術分野で公知である。Papahadjopoulos et al. (Ann. N. Y. Acad. Sci., (1987), 507:64) は、モノシアロガングリオサイド G_{M1} 、硫酸ガラクトセレブロシド、及びホスファチジルイノシトールの、リポソームの血中半減期を改善する能力を報告した。これらの知見は、Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988), 85:6949) によって詳述されている。米国特許第4,837,028号及び国際公開第88/04924号(両方ともAllen et al) は、(1) スフィンゴミエリン及び(2) ガングリオシド G_{M1} 又はガラクトセレブロシド硫酸エステルを含む、リポソームを開示している。米国特許第5,543,152号(Webbら) は、スフィンゴミエリンを含むリポソームを開示している。1,2-スナージミリストイルホスファチジルコリンを含むリポソームは、国際公開第97/13499号(Lim et al) に開示されている。

【0249】

一実施形態では、カチオン性リポソームが使用される。カチオン性リポソームは、細胞膜に融合することができるという利点を有する。非カチオン性リポソームは、原形質膜と効率的に融合することはできないが、マクロファージによってインビボで取り込まれ、オリゴヌクレオチドをマクロファージに送達するために使用することができる。

【0250】

リポソームの更なる利点には以下が挙げられる。天然リン脂質から得られるリポソームは、生体適合性及び生分解性である。リポソームは、広範囲の水溶性及び脂溶性薬物を組み込むことができる。リポソームは、その内部区画に封入されたオリゴヌクレオチドを代謝及び分解から保護することができる (Rosoff, in "Pharmaceutical Dosage Forms", Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245)。リポソーム製剤の調製における重要な考慮事項は、脂質表面電荷、小胞サイズ、及びリポソームの水分量である。

【0251】

正に荷電した合成カチオン性脂質、N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)は、小さなリポソームを形成するために使用することができ、この小さなリポソームは、核酸と自発的に相互作用して、組織培養細胞の細胞膜の負に荷電した脂質と融合することができる脂質-核酸複合体を形成し、オリゴヌクレオチドの送達をもたらす(例えば、DOTMA及びDNAでのその使用については、Feigner, P. L. et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417、及び米国特許第4,897,355号を参照)。

10

20

30

40

50

【0252】

DOTMA類似体である1, 2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニア)プロパン(DOTAP)をリン脂質と組み合わせて使用して、DNA複合体化小胞を形成することができる。LIPOFECTIN(商標) Bethesda Research Laboratories, メリーランド州ゲイサースバーグ)は、負に荷電したポリヌクレオチドと自発的に相互作用して複合体を形成する正に荷電したDOTMAリポソームを含む生組織培養細胞への高度にアニオン性の核酸の送達のための有効な薬剤である。十分に正に荷電したリポソームが使用される場合、得られる複合体上の正味電荷もまた正である。このようにして調製された正に荷電した複合体は、負に荷電した細胞表面に自発的に付着し、原形質膜と融合し、機能的核酸を例えば組織培養細胞に効率的に送達する。別の市販のカチオン性脂質、1, 2-ビス(オレオイルオキシ)-3, 3-(トリメチルアンモニア)プロパン(「DOTAP」)(Boehringer Mannheim、インディアナ州インディアナポリス)は、オレオイル部分がエーテル連結ではなくエステルによって連結されている点でDOTMAとは異なる。

10

【0253】

他の報告されたカチオン性脂質化合物としては、例えば、2つのタイプの脂質のうちの1つにコンジュゲートされたカルボキシスベルミンを含む、種々の部分にコンジュゲートされたものが挙げられ、また、5-カルボキシスベルミルグリシンジオクタオレオイルアミド(「DOGS」)(TRANSFECTAM(商標)、Promega、ウィスコンシン州マディソン)及びジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシスベルミルアミド(「DPPES」)(例えば、米国特許第5, 171, 678号を参照)などの化合物が挙げられる。

20

【0254】

別のカチオン性脂質コンジュゲートは、DOPEと組み合わせてリポソームに製剤化されたコレステロール(「DC-Chol」)による脂質の誘導体化を含む(Gao, X. 及びHuang, L., (1991) Biochim. Biophys. Res. Commun. 179:280を参照)。ポリリジンとDOPEにコンジュゲートすることによって作製されたリポポリリジンは、血清の存在下でのトランスフェクションに有効であることが報告されている(Zhou, X. et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 1065:8)。ある特定の細胞株について、コンジュゲートされたカチオン性脂質を含むこれらのリポソームは、DOTMA含有組成物よりも低い毒性を示し、そしてより効率的なトランスフェクションを提供するといわれる。他の市販のカチオン性脂質製品としては、DMRIE及びDMRIE-HP(Vical、カリフォルニア州ラホーヤ)及びLipofectamine(DOSPA)(Life Technology, Inc., メリーランド州ゲイサースバーグ)が挙げられる。オリゴヌクレオチドの送達に適した他のカチオン性脂質は、国際公開第98/39359号及び国際公開第96/37194号に記載されている。

30

【0255】

リポソーム製剤は局所投与に特に適しており、リポソームは他の製剤に対していくつかの利点を示す。このような利点としては、投与された薬物の高い全身吸収に関連する副作用の減少、所望の標的における投与された薬物の蓄積の増加、及びオリゴヌクレオチドを皮膚に投与する能力が挙げられる。いくつかの実施態様では、リポソームは、オリゴヌクレオチドを表皮細胞に送達するために、そしてまた、オリゴヌクレオチドの真皮組織(例えば、皮膚)への浸透を増強するために使用される。例えば、リポソームは局所的に適用することができる。リポソームとして製剤化された薬物の皮膚への局所送達が示されている(例えば、Weiner et al., (1992) Journal of Drug Targeting, vol. 2405-410及びdu Plessis et al., (1992) Antiviral Research, 18:259-265; Mannino, R. J. 及びFould-Fogerite, S., (1998) Biotechniques 6:682-690; Itani, T. et al., (19

40

50

87) Gene 56:267-276; Nicolau, C. et al. (1987) Meth. Enzymol. 149:157-176; Straubinger, R. M. 及び Papahadjopoulos, D. (1983) Meth. Enzymol. 101:512-527; Wang, C. Y. and Huang, L., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851-7855を参照)。
【0256】

非イオン性リポソーム系、特に、非イオン性界面活性剤及びコレステロールを含む系もまた、皮膚への薬物の送達におけるそれらの有用性を決定するために試験された。NOVASOME I (ジラウリン酸グリセリル／コレステロール／ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル) 及びNOVASOME II (ジステアリン酸グリセリル／コレステロール／ポリオキシエチレン-10-ステアリルエーテル) を含む非イオン性リポソーム製剤を使用して、薬物をマウス皮膚の真皮に送達した。オリゴヌクレオチドを含むこのような製剤は、皮膚疾患の治療に有用である。

10

【0257】

リポソームの標的化はまた、例えば、器官特異性、細胞特異性、及びオルガネラ特異性に基づいて可能であり、そして当該技術分野で公知である。リポソーム標的化送達系の場合、標的化リガンドをリポソーム二重層と安定に会合させて維持するために、脂質基をリポソームの脂質二重層に組み込むことができる。脂質鎖を標的リガンドに結合するために、様々な連結基を使用することができる。更なる方法が当該技術分野で公知であり、例えば、米国特許出願公開第20060058255号に記載されており、その連結基は参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0258】

オリゴヌクレオチドを含むリポソームは、高度に変形可能にすることができる。そのような変形性は、リポソームがリポソームの平均半径よりも小さい孔を通して浸透することを可能にすることができる。例えば、トランスファーソームは、更に別のタイプのリポソームであり、薬物送達ビヒクルの魅力的な候補である高度に変形可能な脂質凝集体である。トランスファーソームは、非常に変形しやすいので液滴よりも小さい細孔を通して容易に浸透することができる脂質液滴として、説明することができる。トランスファーソームは、表面エッジ活性化剤、通常は界面活性剤を標準的なリポソーム組成物に添加することによって作製することができる。オリゴヌクレオチドを含むトランスファーソームは、例えば、皮膚中のケラチノサイトにオリゴヌクレオチドを送達するために、感染によって皮下に送達することができる。無傷の哺乳動物の皮膚を通るために、脂質小胞は、好適な経皮勾配の影響下で、各々が50nm未満の直径を有する一連の微細孔を通過する必要がある。更に、脂質特性により、これらのトランスファーソームは、自己最適化（例えば、皮膚における孔の形状に適応する）、自己修復することができ、断片化することなく、多くの場合、自己投入して、それらの標的に頻繁に到達することができる。トランスファーソームは、血清アルブミンを皮膚に送達するために使用された。血清アルブミンのトランスファーソーム媒介送達は、血清アルブミンを含有する溶液の皮下注射と同程度に有効であることが示された。

30

【0259】

本発明に適した他の製剤は、2008年1月2日に出願された米国仮出願第61/018,616号、2008年1月2日に出願された米国仮特許出願第61/018,611号、2008年3月26日に出願された米国仮特許出願第61/039,748号、2008年4月22日に出願された米国仮特許出願第61/047,087号、及び2008年5月8日に出願された米国仮特許出願第61/051,528号に記載されている。2007年10月3日に出願された国際出願第PCT/US2007/080331号も、本発明に適した製剤を記載している。

40

【0260】

界面活性剤は、エマルジョン（マイクロエマルジョンを含む）及びリポソームなどの製剤に広く適用されている。天然及び合成の両方の多くの異なるタイプの界面活性剤の特性

50

を分類及びランク付けする最も一般的な方法は、親水性／親油性バランス（HLB）の使用によるものである。親水性基（「ヘッド」としても知られる）の性質は、製剤に使用される異なる界面活性剤を分類するための最も有用な手段を提供する（Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク州ニューヨーク, 1988, p. 285）。

【0261】

界面活性剤分子がイオン化しない場合、それは非イオン性界面活性剤として分類される。非イオン性界面活性剤は、医薬品及び化粧品に広く適用されており、広範囲のpH値にわたって使用可能である。概ね、それらのHLB値は、それらの構造に応じて2～約18の範囲である。非イオン性界面活性剤としては、エチレングリコールエステル、プロピレングリコールエステル、グリセリルエステル、ポリグリセリルエステル、ソルビタンエステル、スクロースエステル、及びエトキシ化エステルなどの非イオン性エステルが挙げられる。脂肪アルコールエトキシレート、プロポキシ化アルコール、及びエトキシ化／プロポキシ化ブロックポリマーなどの、非イオン性アルカノールアミド及びエーテルもこの分類に含まれる。ポリオキシエチレン界面活性剤は、非イオン性界面活性剤分類の最も一般的なメンバーである。

【0262】

界面活性剤分子が水に溶解又は分散されたときに負電荷を有する場合、界面活性剤はアニオン性として分類される。アニオン性界面活性剤としては、カルボキシレート、例えば石鹸、アシルラクチレート、アミノ酸のアシルアミド、硫酸のエステル、例えばアルキルサルフェート及びエトキシ化アルキルサルフェート、スルホネート、例えばアルキルベンゼンスルホネート、アシルイセチオネート、アシルタウレート及びスルホスクシネート、並びにホスフェートが挙げられる。アニオン性界面活性剤分類の最も重要なメンバーは、アルキルサルフェート及び石鹸である。

【0263】

界面活性剤分子が水に溶解又は分散されたときに正電荷を有する場合、界面活性剤はカチオン性として分類される。カチオン性界面活性剤としては、第四級アンモニウム塩及びエトキシ化アミンが挙げられる。第四級アンモニウム塩は、この分類の最も使用されるメンバーである。

【0264】

界面活性剤分子が正電荷又は負電荷のいずれかを有する能力を有する場合、界面活性剤は両性として分類される。両性界面活性剤としては、アクリル酸誘導体、置換アルキルアミド、N-アルキルベタイン、及びホスファチドが挙げられる。

【0265】

薬物製品、製剤、及びエマルジョンにおける界面活性剤の使用が概説されている（Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク州ニューヨーク, 1988, p. 285）。

【0266】

本発明の方法における使用のためのオリゴヌクレオチドはまた、ミセル製剤として提供することができる。ミセルは、分子の全ての疎水性部分が内側に向けられ、親水性部分を周囲の水相と接触させたままにするように、両親媒性分子が球状構造に配置されている特定のタイプの分子集合体である。環境が疎水性である場合、逆の配置が存在する。

【0267】

脂質ナノ粒子ベースの送達方法

本発明のオリゴヌクレオチドは、脂質製剤、例えば、脂質ナノ粒子（LNP）、又は他の核酸-脂質粒子中に完全に封入され得る。LNPは、静脈内（i.v.）注射後に循環寿命の延長を示し、遠位部位（例えば、投与部位から物理的に離れた部位）に蓄積するので、全身適用に極めて有用である。LNPとしては、「pSPLP」が挙げられ、これには、国際公開第00／03683号に記載されているカプセル化縮合剤-核酸複合体が含まれる。本発明の粒子は、典型的には約50nm～約150nm、より典型的には約60

nm～約130nmの平均直径、より典型的には約70nm～約110nm、最も典型的には約70nm～約90nmの平均直径を有し、実質的に非毒性である。更に、核酸は、本発明の核酸-脂質粒子中に存在する場合、水溶液中でヌクレアーゼによる分解に対して耐性である。核酸-脂質粒子及びそれらの調製方法は、例えば、米国特許第5,976,567号、同第5,981,501号、同第6,534,484号、同第6,586,410号、同第6,815,432号、米国公開第2010/0324120号、及び国際公開第96/40964号に開示されている。

【0268】

一実施形態では、脂質対薬物比（質量／質量比）（例えば、脂質対オリゴヌクレオチド比）は、約1：1～約50：1、約1：1～約25：1、約3：1～約15：1、約4：1～約10：1、約5：1～約9：1、又は約6：1～約9：1の範囲である。上記範囲の中間の範囲もまた、本発明の一部であると考えられる。

【0269】

カチオン性脂質の非限定的な例としては、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド（DODAC）、N,N-ジステアシル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド（DDAB）、N-（I-（2,3-ジオレオイルオキシ）プロピル）-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTAP）、N-（I-（2,3-ジオレイルオキシ）プロピル）-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（DOTMA）、N,N-ジメチル-2,3-ジオレイルオキシ）プロピルアミン（DODMA）、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLinDMA）、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLenDMA）、1,2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン（DLin-C-DAP）、1,2-ジリノレイオキシ-3-（ジメチルアミノ）アセトキシプロパン（DLin-DAC）、1,2-ジリノレイオキシ-3-モルホリノプロパン（DLin-MA）、1,2-ジリノレオイル-3-ジメチルアミノプロパン（DLinDAP）、1,2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン（DLin-S-DMA）、1-リノレオイル-2-リノレイロキシ-3-ジメチルアミノプロパン（DLin-2-DMAP）、1,2-ジリノレイロキシ-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩（DLin-TMA・Cl）、1,2-ジリノレオイル-3-トリメチルアミノプロパンクロリド塩（DLin-TAP・Cl）、1,2-ジリノレイロキシ-3-（N-メチルピペラジノ）プロパン（DLin-MPZ）、又は3-（N,N-ジリノレイルアミノ）-1,2-プロパンジオール（DLinAP）、3-（N,N-ジオレイルアミノ）-1,2-プロパンジオール（DOAP）、1,2-ジリノレイルキソ-3-（2-N,N-ジメチルアミノ）エトキシプロパン（DLin-EG-DMA）、1,2-ジリノレニルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLinDMA）、2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-〔1,3〕-ジオキソラン（DLin-K-DMA）又はその類似体、（3aR,5s,6aS）-N,N-ジメチル-2,2-ジ（（9Z,12Z）-オクタデカ-9,12-ジエニエテトラヒドロ-3aH-シクロペンタ〔d〕〔1,3〕ジオキソール-5-アミン（ALN100）、（6Z,9Z,28Z,31Z）-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31テトラエン-19-イル4-（ジメチルアミノ）ブタノエート（MC3）、1,1'-（2-（4-（2-（（2-（ビス（2-ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（2-ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピペラジン-1-イエエチラザンジエジドデカン-2-オール（テックG1）又はその混合物が挙げられる。カチオン性脂質は、例えば、粒子中に存在する総脂質の約20mol%～約50mol%又は約40mol%を構成することができる。

【0270】

イオン性／非カチオン性脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールア

10

20

30

40

50

ミン (D O P E)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (P O P C)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (P O P E)、ジオレオイルーホスファチジルエタノールアミン 4- (N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート (D O P E-m a l)、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン (D P P E)、ジミリストイルホスホエタノールアミン (D M P E)、ジステアロイルーフォスファチジルエタノールアミン (D S P E)、16-O-モノメチル P E、16-O-ジメチル P E、18-1-トランス P E、1-ステアロイル-2-オレオイルーホスファチジルエタノールアミン (S O P E)、コレステロール、又はそれらの混合物を含むアニオン性脂質又は中性脂質であり得るが、これらに限定されない。非カチオン性脂質は、例えば、コレステロールが含まれる場合、粒子中に存在する総脂質の約 5 m o l % ~ 約 9 0 m o l %、約 1 0 m o l %、又は約 6 0 m o l % であり得る。

10

【0271】

粒子の凝集を阻害するコンジュゲート脂質は、例えば、P E G-ジアシルグリセロール (D A G)、P E G-ジアルキルオキシプロピル (D A A)、P E G-リン脂質、P E G-セラミド (C e r)、又はそれらの混合物を含むがこれらに限定されない、ポリエチレングリコール (P E G)-脂質であり得る。P E G-D A A コンジュゲートは、例えば、P E G-ジラウリルオキシプロピル (C₁₂)、P E G-ジミリスチルオキシプロピル (C₁₄)、P E G-ジパルミチルオキシプロピル (C₁₆)、又は P E G-ジステアリルオキシプロピル (C₁₈) であり得る。粒子の凝集を防止するコンジュゲート脂質は、例えば、粒子中に存在する総脂質の 0 m o l % ~ 約 2 0 m o l % 又は約 2 m o l % であり得る。

20

【0272】

いくつかの実施形態では、核酸-脂質粒子は、例えば、粒子中に存在する総脂質の約 1 0 m o l % ~ 約 6 0 m o l % 又は約 5 0 m o l % でコレステロールを更に含む。

併用療法

【0273】

本発明の方法は、単独で、又は追加の治療薬 (治療作用因子)、例えば、P C D H 1 9 関連障害若しくはそれに関連する症状を治療する他の薬剤と組み合わせて、又は P C D H 1 9 関連障害を治療するための他のタイプの療法と組み合わせて使用することができる。併用治療において、1つ以上の治療化合物の投与量は、単独で投与される場合の標準的な投与量から低減され得る。例えば、用量は、薬物の組み合わせ及び順列から経験的に決定され得、又はアイソボログラフ分析によって推定され得る (例えば、B l a c k e t a l., N e u r o l o g y 65: S3-S6 (2005))。この場合、組み合わせたときの化合物の投与量は、治療効果をもたらすものとする。

30

【0274】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド剤は、P C D H 1 9 関連障害を治療するための追加の治療薬と組み合わせて使用され得る。いくつかの実施形態では、追加の治療薬は、P C D H 1 9 関連障害に関連する遺伝子の m R N A とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド (例えば、A S O) であり得る。

40

【0275】

いくつかの実施形態では、第2の治療薬は、化学療法剤 (例えば、細胞毒性剤又は P C D H 1 9 関連障害の治療に有用な他の化学化合物) である。

【0276】

いくつかの実施形態では、第2の治療薬は、抗発作剤である。

【0277】

第2の作用因子は、非薬物治療である治療作用因子であり得る。例えば、第2の治療作用因子は、理学療法である。

【0278】

本明細書に記載の組み合わせ実施形態のいずれかにおいて、第1及び第2の治療薬は、同時に、又はいずれかの順序で逐次的に投与され得る。第1の治療薬は、第2の治療薬の

50

直前若しくは直後、又は最大 1 時間、最大 2 時間、最大 3 時間、最大 4 時間、最大 5 時間、最大 6 時間、最大 7 時間、最大 8 時間、最大 9 時間、最大 10 時間、最大 11 時間、最大 12 時間、最大 13 時間、14 時間、最大 16 時間、最大 17 時間、最大 18 時間、最大 19 時間、最大 20 時間、最大 21 時間、最大 22 時間、最大 23 時間、最大 24 時間、又は最大 1～7 日、1～14 日、1～21 日、若しくは 1～30 日前若しくは後に投与され得る。

【0279】

医薬組成物

本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは、好ましくは、インビボでの投与に適した生物学的に適合性の形態でヒト対象に投与するための医薬組成物に製剤化される。

10

【0280】

本明細書に記載の化合物は、遊離塩基の形態で、塩、溶媒和物の形態で、及びプロドラッグとして使用され得る。全ての形態が、本明細書に記載される方法の範囲内である。本発明の方法によれば、記載の化合物、又はその塩、溶媒和物、若しくはプロドラッグは、当業者によって理解されるように、選択された投与経路に応じて様々な形態で対象に投与され得る。本明細書に記載される化合物は、例えば、経口、非経口、髄腔内、脳室内、実質内、口腔内、舌下、経鼻、直腸内、パッチ、ポンプ、又は経皮投与によって投与され得、医薬組成物はそれに応じて製剤化され得る。非経口投与としては、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、経上皮、経鼻、肺内、脊髄内、脳室内、実質内、直腸内、及び局所投与様式が挙げられる。非経口投与は、選択された期間にわたる連続注入によるものであり得る。

20

【0281】

本明細書に記載される化合物は、生涯のうちの任意の期間中に投与され得る。化合物は、新生児 (newborn)、新生児 (neonate)、乳児、幼児、青年、又は成人に投与され得る。化合物は、生まれる前に投与され得る。化合物は、出生直後に投与され得る。

【0282】

本明細書に記載される化合物は、例えば、不活性希釈剤若しくは同化可能な食用担体と共に経口投与され得、又は硬質若しくは軟質シェルゼラチンカプセルに封入され得、又は錠剤に圧縮されてもよく、又は食事の食物に直接組み込まれ得る。経口治療投与のために、本明細書に記載される化合物は、賦形剤と共に組み込まれ得、摂取可能な錠剤、バッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、及びウエハーの形態で使用され得る。本明細書に記載の化合物はまた、非経口投与され得る。本明細書に記載の化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と好適に混合された水中で調製することができる。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、DMSO、及びアルコールを含む又は含まないそれらの混合物中、並びに油中で調製することができる。保存及び使用の通常の条件下で、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するために保存剤を含み得る。好適な製剤の選択及び調製のための、従来の手順及び成分は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (2012, 22nd ed.) 及び 2018 年に公開された The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 41 NF 36) に記載されている。注射用途に適した医薬形態としては、滅菌注射液又は分散液、及び滅菌注射液又は分散液の即席調製のための滅菌粉末が挙げられる。全ての場合において、形態は無菌である必要があり、シリンジによって投与され得る程度まで流動性である必要がある。経鼻投与のための組成物は、エアロゾル、ドロップ、ゲル、及び粉末として簡便に製剤化され得る。エアロゾル製剤は、典型的には、生理学的に許容される水性又は非水性溶媒中の活性物質の溶液又は微細懸濁液を含み、通常、噴霧装置で使用するためのカートリッジ又はリフィルの形態をとることができる密封容器中に滅菌形態で単回又は複数回用量で提供される。あるいは、密封容器は、単回用量鼻吸入器又は使用後に廃棄することを意図した計量弁を備えたエアロゾルディスペンサなどの一体型分配装置であってもよい。剤形がエアロゾルディスペンサを含む場合、圧縮空気などの圧縮ガス又はフルオロクロロ炭化水素などの有機噴射剤であり得る、噴射剤を含有す

30

40

50

る。エアロゾル剤形はまた、ポンプ噴霧器の形態をとることもできる。口腔投与又は舌下投与に適した組成物としては、錠剤、ロゼンジ剤、及びトローチ剤が挙げられ、活性成分は、糖、アカシア、トラガカント、ゼラチン、及びグリセリンなどの担体と共に製剤化される。直腸投与のための組成物は、好都合には、カカオ脂などの従来の坐剤基剤を含有する坐剤の形態である。

【0283】

本明細書に記載の化合物は、動物、例えばヒトに、単独で、又は本明細書に記載の薬学的に許容される担体と組み合わせて投与することができ、その割合は、化合物の溶解度及び化学的性質、選択された投与経路、並びに標準的な薬学的実務によって決定される。

投与量

【0284】

本明細書に記載される組成物（例えば、オリゴヌクレオチドを含む組成物）の投与量は、化合物の薬力学特性、投与様式、レシピエントの年齢、健康状態、及び体重、症状の性質及び程度、治療の頻度、併用治療のタイプ（存在する場合）、並びに治療される動物における化合物のクリアランス速度などの多くの因子に応じて変動し得る。本明細書に記載される組成物は、初期に、臨床奏功に応じて、必要に応じて調整され得る好適な投与量で投与され得る。いくつかの実施形態では、組成物（例えば、オリゴヌクレオチドを含む組成物）の投与量は、予防的又は治療的有效量である。

【0285】

キット

本発明はまた、（a）本明細書に記載の細胞又は対象におけるPCDH19のレベル及び／又は活性を低下させるオリゴヌクレオチド剤を含む医薬組成物と、（b）本明細書に記載の方法のいずれかを実施するための説明書を含む添付文書と、を含むキットを特徴とする。いくつかの実施形態では、キットは、（a）本明細書に記載の細胞又は対象におけるPCDH19のレベル及び／又は活性を低下させるオリゴヌクレオチド剤を含む医薬組成物と、（b）追加の治療薬と、（c）本明細書に記載の方法のいずれかを実施するための説明書を含む添付文書と、を含む。

【0286】

ASOの選択方法

ASO治療における使用に適したオリゴヌクレオチドは、バイオインフォマティック方法を使用して選択され得る。オリゴヌクレオチドは、15～30（例えば、18～22、例えば、19、20、又は21）のヌクレオチド長であり得る。オリゴヌクレオチドは、約40%～約70%（例えば、45%、50%、55%、60%、65%、又は70%）のGC含有量を有し得る。オリゴヌクレオチドは、ヒトPCDH19に対して3つ以下（例えば、2、1、又は0）のミスマッチを含み得る。オリゴヌクレオチドは、ヒトPCDH19の等しい長さの標的に対して少なくとも80%（例えば、85%、90%、95%、97%、99%、及び100%）の配列同一性を含み得る。オリゴヌクレオチドは、非PCDH19転写産物に対して少なくとも3つ（例えば、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上）のミスマッチを含み得る。オリゴヌクレオチドは、二量体を形成しなくてもよい。オリゴヌクレオチドは、ヘアピンを形成しなくてもよい。オリゴヌクレオチドは、GGGGなどのポリGランを欠いていてもよい。

【0287】

ASOの評価

本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性は、当該技術分野で公知の様々な技術を使用して評価及び確認することができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドのPCDH19発現阻害能力をインビトロアッセイで評価して、アンチセンスオリゴヌクレオチドがPCDH19の変異に関連する疾患又は状態の治療における使用に適していることを、確認することができる。マウスモデルを使用して、アンチセンスオリゴヌクレオチドのPCDH19発現阻害能力を評価するだけでなく、PCDH19変異に関連する症状を改善することもできる。

10

20

30

40

50

【0288】

一例では、PCDH19でトランスフェクトされこの遺伝子を発現する、哺乳動物細胞（例えば、CHO細胞）などの細胞も、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトされる。典型的には、PCDH19は、ミスセンス変異、ナンセンス変異、又はフレームシフト（例えば、挿入又は欠失）変異などの変異を含有する。別の例では、天然野生型PCDH19を天然に発現するヒト神経細胞株（例えば、SH-SY5Y）が使用される。任意選択で、この細胞のゲノムは、変異を含むように編集され、その結果、得られたPCDH19単細胞は、疾患を引き起こす変異体である。PCDH19 mRNAのレベルは、当該技術分野で周知のqRT-PCR又はノーザンブロットを使用して評価することができる。PCDH19からのタンパクの発現レベルは、Rizzo et al. (Mol Cell Neurosci. 72:54-63, 2016)に記載されるように総細胞溶解物又は画分上でウェスタンブロットによって評価することができる。

10

【0289】

特定の例において、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性は、幹細胞モデリングを使用して評価及び確認される（参考のために、例えば、Tidball and Parent Stem Cells 34:27-33, 2016; Parent and Anderson Nature Neuroscience 18:360-366, 2015を参照）。例えば、ヒト人工多能性幹細胞（iPSC）は、PCDH19変異を有し、関連する疾患又は状態（例えば、EIEE9）を示す、患者に由来する体細胞（例えば、皮膚線維芽細胞又は血液由来造血細胞）から産生することができる。任意選択で、ゲノム編集を使用して、変異を野生型に戻して同質遺伝子対照細胞株を作製することができる（Gaj et al. Trends Biotechnol 31, 397-405, 2013）、これを使用して、その後のオリゴヌクレオチドの評価及び比較のための活性の望ましい野生型レベルを決定することもできる。あるいは、ゲノム編集を使用して、野生型対照iPSC（例えば、参照iPSC株）のPCDH19遺伝子に変異を導入することができる。次いで、変異を含有するiPSC、及び任意選択で同質遺伝子対照を、公知の技法を使用して、興奮性ニューロンを含むニューロンに分化させることができる（例えば、Kim et al. Front Cell Neurosci 8:109, 2014; Zhang et al. 2013, Chambers et al. Nat Biotechnol 27, 275-280, 2009を参照）。次いで、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの、PCDH19発現（PCDH19 mRNA又はタンパクレベルによって評価される）及び／又は活性（例えば、カルシウム結合によって評価される）に対する効果を、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドへのiPSCの曝露後に評価することができる。

20

30

【0290】

PCDH19を発現する細胞を本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチドに曝露した場合に観察される、PCDH19発現（mRNA又はタンパク）のレベルを、PCDH19を発現する細胞を陰性対照アンチセンスオリゴヌクレオチドに曝露した場合に観察される、それぞれのレベルと比較して、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチドからもたらされる阻害のレベルを決定する。典型的には、PCDH19の発現レベルは、少なくとも又は約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又はそれ以上低下する。したがって、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、PCDH19における変異に関連する疾患又は状態を治療するために使用することができる。

40

【0291】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの投与の機能的効果はまた、PederickらNeuron 97:59-66, 2018に記載されるものなどの混合実験を使用することによって評価され得、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。内因性PCDH及び古典的カドヘリンの欠如により、K562細胞は培養中に凝集しないので、K562細胞を使用することができる。細胞は、PCDH17及び／又はPCDH10などの

50

別の非クラスター化PCDHと組み合わせるPCDH19（WT又は変異型のいずれか）を発現するように操作され得る。いくつかの特定の例では、細胞は、WT及び変異型PCDH19の両方を発現し得る。同一又は異なるPCDHの組み合わせを発現する蛍光標識されたK562細胞の2つの集団を、1：1の比で混合することができる。得られた細胞凝集体を、各集団の寄与について評価することができる。1つの集団に偏っている凝集体は、異なる接着特異性によって細胞選別を示し得るのに対して、不均一な凝集体は、同一の接着特異性によって細胞混合を示し得る。疾患を引き起こす変異体が混合とは対照的に選別を引き起こす場合、PCDH19変異型を含有する細胞をASO（例えば、対立遺伝子特異的ASO）で処置することができ、細胞選別実験の結果を再評価することができる。結果がその後、選別の代わりに混合を示す場合、ASOは、変異型PCDH19の標的化及び発現の低減として成功とみなすことができる。

10

【0292】

また、マウスモデルを使用して、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性を評価及び確認することもできる。例えば、ノックイン又はトランスジェニックマウスモデルは、SCN1A及びSCN2Aノックイン及びトランスジェニックマウスモデルについて以前に記載されたものと同様の様式で、変異を含有するPCDH19遺伝子を使用して作製することができる（例えば、Kearney et al. *Neuroscience* 102, 307-317, 2001; Ogiwara et al. *J Neurosci* 27:5903-5914, 2007; Yu et al. *Nat Neurosci* 9:1142-1149, 2006を参照）。特定の例では、特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドにマッチするPCDH19遺伝子を用いて、ノックインマウス又はトランスジェニックマウスは、EIEE9に類似した表現型（例えば、ニューロン活性の向上、自発的発作、及び脳波図（EEG）における不均一な焦点発作活性を含む）を示し得る。次いで、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの、これらのマウスにおいてPCDH19の発現を阻害する能力、及びPCDH19変異に関連する任意の症状を改善する能力を評価することができる。

20

【0293】

別の例では、PCDH19 mRNA及び／又はタンパクのレベルは、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は陰性対照アンチセンスオリゴヌクレオチドのマウスへの投与後に評価することができる。特定の例において、脳、特にニューロンにおけるPCDH19 mRNA及び／又はタンパクレベルが評価される。本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与後のPCDH19発現のレベルを、陰性対照アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与した場合に観察されるそれぞれのレベルと比較して、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチドによってもたらされる阻害のレベルを決定する。典型的には、マウスにおける（例えば、マウスの脳における）PCDH19の発現レベルは、少なくとも又は約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、又はそれ以上低下する。

30

【0294】

更に別の例では、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与の機能的効果が評価される。例えば、発作の数、重症度、及び／又はタイプは、視覚的に及び／又はEEGによって評価することができる。ニューロン興奮性はまた、例えば、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチド又は陰性対照アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与されたマウスから脳切片を切除し、全細胞電流を評価する（例えば、全細胞パッチクランプ技術を使用して）ことによって評価することができる。同様のニューロン興奮性分析を、マウスから単離され次いで培養されたニューロンを用いて実行することができる。更に、歩行特性を含むマウス挙動を評価して、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与の機能的効果を決定することができる。

40

【0295】

本明細書で言及された全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各々の、個々の刊行物、

50

特許、又は特許出願が具体的かつ個別に示され参照により全体が組み込まれている場合と同程度に、参照により全体が本明細書に組み込まれる。本出願における用語が、参照により本明細書に組み込まれる文献において異なって定義されることが見出された場合、本明細書において提供される定義が、その用語の定義としての役割を果たす。

【0296】

本明細書における任意の先行する刊行物（若しくはそれに由来する情報）、又は既知の任意の事項への言及は、その先行する刊行物（若しくはそれに由来する情報）又は既知の事項が、本明細書が関連する取り組みの分野における共通の全般的知識の一部を形成することの承認若しくは容認又は任意の形態の示唆として解釈されるものではなく、またそのように解釈されるべきではない。

【0297】

本発明は、その特定の実施形態に関連して説明されているが、更なる修正が可能であり、本出願は、概して本発明の原理に従い、本明細書で前述した本質的な特徴に対して、本発明が関連する技術内で公知又は慣習的に行われる本開示からの逸脱、及び特許請求の範囲に従う本開示からの逸脱を含む、本発明の任意の変形、使用、又は適応を包含することを意図していることを理解されたい。

【実施例】

【0298】

実施例 1. ASO の設計及び作製

例示的な 15-、16-、17-及び 20-mer アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を、領域 100291644.100410273) (配列番号 1) 内の相補鎖上に位置する、NCBI 参照配列: NC_000023.11 (配列番号 1) に示されるヒト PCDH19 遺伝子に対して作製した。ASO 標的部位の 5' 末端を、以下の表 2 に列挙される遺伝子内の位置に割り当てた。ヌクレオチド組成を決定し、20% 未満又は 80% 超の GC 含有量を有する ASO を更なる分析から除外した。ASO の交差反応性を、NCBI RefSeq DB 及び Ensembl DB からの全ての既知の PCDH19 mRNA 及びプレ mRNA 転写産物について計算して、可能な限り多くの異なるタンパク質コード転写産物を標的とする ASO を同定した。オフターゲット ASO (最大 2 つのミスマッチを有する) を更なる分析から除外した。ASO 標的部位に位置する一塩基多型 (SNP) を、ヒト PCDH19 遺伝子 (NC_000023.11; B. 領域: 相補体 (100291644.100410273)) に基づいて同定し、1% 以上のマイナー対立遺伝子頻度を有する SNP を有する ASO 標的化部位を、更なる分析から除外した。残りの ASO を、非ヒト霊長類及びイヌとの交差反応性について更にスクリーニングした。この分析から、表 2 に示されるように、384 個の ASO 候補 (配列番号 2 ~ 配列番号 385) を合成及びインビトロスクリーニングのために選択した。

【0299】

実施例 2. PCDH19 に対する阻害活性を評価することによる ASO のスクリーニング

表 2 に示される例示的な ASO (配列番号 2 ~ 385) を、96 ウェルプレートにおいてウェル当たり 30000 細胞の密度で播種された HEK293 細胞 (ATCC) を使用してスクリーニングした。0.4 μ l / ウェルの Lipofectamine 2000 トランスフェクション試薬 (Invitrogen) を使用して、0.2 nM 又は 2.0 nM の各 ASO で細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後 48 時間で、Quantigene singleplex branched DNA アッセイ (ThermoFisher) を使用して、細胞溶解物から PCDH19 mRNA 発現を定量した。PCDH19 発現を GAPDH に対して正規化し、モックトランスフェクト細胞、及び PCDH19 と交差反応しない Ahsa1 ASO でトランスフェクトされた細胞の統合平均と比較して表した。4 回の別々の実験から計算したデータを表 2 (平均及び標準偏差として) 及び図 1 に示す。

【0300】

実施例 3 . A S O の投与による E I E E 9 の治療。

E I E E 9 の女性患者を A S O 治療のために選択する。P C D H 1 9 m R N A を標的とする 1 6 m e r の A S O が合成され、ホスホロチオエート連結が全体にわたり、2 つの M O E 修飾が全ての糖部分にある。A S O を、ヒトへの投与に適合する好適な賦形剤に溶解する。A S O 溶液が脳内の標的ニューロンと相互作用するように、溶解した A S O を含有する溶液が患者の脳に注入される。A S O はニューロンをトランスフェクトし、標的細胞における P C D H 1 9 の翻訳を変化させ、P C D H 1 9 タンパク質の減少をもたらす。定量アッセイを実施して、P C D H 1 9 タンパク質の減少を測定する。患者は、A S O 治療の投与後の E I E E 9 に関連する発作及び他の症状の軽減を測定するために、広範な定期的検査を受ける。

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2. アンチセンスオリゴヌクレオチドの阻害活性

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644. 100410273)	NM_020766.3' のブレ mRNA 内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
1	1778	E	59±1	56±14	ATCACCGTC CCGGCG	2
2	1778	E	43±5	26±8	AATCACCGT CCGGCG	3
3	1778	E	36±10	13±3	CAATCACCG TCCGGCG	4
4	1781	E	18±7	9±4	CGTTGGCAA TCACCGTCC CG	5
5	1854	E	35±8	17±4	TTGGACACC ACGCGAAAG GC	6
6	1856	E	60±8	27±14	AGTTGGACA CCACGCGAA AG	7
7	1857	E	58±19	28±13	GAGTTGGAC ACCACGCGA AA	8
8	1858	E	38±12	15±7	CGAGTTGGA CACCACGCG AA	9
9	1970	E	38±6	18±11	CCTCGAGCG AGATGATGC AC	10
10	1978	E	62±10	12±2	GGACATGAC CTCGAGCGA GA	11
11	2044	E	24±5	13±1	ACTGGGCGC ATTGTCGT	12
12	2045	E	19±1	10±4	ACTGGGCGC ATTGTCG	13
13	2107	E	29±11	14±3	GGATGCGCG TGCCAG	14
14	2118	E	136±19	32±9	TAAGCGCTG TCCAGCGGG AT	15
15	2124	E	72±14	16±2	GGATCGTAA GCGCTGTCC AG	16
16	2126	E	53±6	10±3	CTGGATCGT AAGCGCTGT CC	17
17	2127	E	91±26	12±3	TCTGGATCG TAAGCGCTG TC	18
18	2129	E	22±3	24±10	GGATCGTAA GCGCTG	19
19	2129	E	22±2	8±1	TGGATCGTA AGCGCTG	20
20	2130	E	44±19	21±2	TCTGGATCG TAAGCGCT	21
21	2130	E	73±25	11±2	GAGTCTGGA TCGTAAGCG CT	22

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644. 100410273)	NM_020766.3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
22	2131	E	31±1	19±11	TCTGGATCG TAAGCGC	23
23	2131	E	24±8	10±3	GTCTGGATC GTAAGCGC	24
24	2131	E	50±7	9±2	TGAGTCTGG ATCGTAAGC GC	25
25	2132	E	16±2	9±1	AGTCTGGAT CGTAAGCG	26
26	2159	E	99±21	11±3	GCTCGTAAG TCTGCACGC CA	27
27	2181	E	68±11	10±3	CCGAACAGC TCGTTGGGC GT	28
28	2182	E	212±24	40±13	GCCGAACAG CTCGTTGGG CG	29
29	2183	E	107±20	34±10	GGCCGAACA GCTCGTTGG GC	30
30	2266	E	91±18	75±19	ACTGCGTCT CGCGGT	31
31	2266	E	32±11	9±4	GTGCGACTG CGTCTCGCG GT	32
32	2275	E	52±9	13±5	GAAGCTGTA GTGCGACTG CG	33
33	2294	E	25±4	8±3	TAGCGCAGT GATTCCG	34
34	2294	E	38±15	11±5	CGTCTAGCG CAGTGATTC GG	35
35	2303	E	51±12	28±3	CGCCACCGT CTAGCGCA	36
36	2305	E	65±12	21±4	TCGCCACCG TCTAGCG	37
37	2305	E	19±7	8±1	GTCGCCACC GTCTAGCG	38
38	2306	E	24±5	12±3	GGTCGCCAC CGTCTAGC	39
39	2307	E	20±2	10±2	GTCGCCACC GTCTAG	40
40	2308	E	53±20	12±10	CGGCGGGTC GCCACCGTC TA	41
41	2375	E	46±14	12±4	CGCTAAACA CCGGGTTGT TG	42
42	2382	E	31±7	26±1	CTCGCTAAA CACCGG	43

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644, 100410273)	NM_020766.3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
43	2382	E	42±9	11±4	GTGGACTCG CTAAACACC GG	44
44	2383	E	102±39	26±13	GGTGGACTC GCTAAACAC CG	45
45	2441	E	37±12	11±3	CGTTGAGGC GGATGACGG GT	46
46	2507	E	27±11	9±2	GGTCGTTGA CGTAGCCAT AG	47
47	2508	E	24±9	11±0	CGGTCGTTG ACGTAGCCA TA	48
48	2509	E	13±3	7±0	GTCGTTGAC GTAGCCAT	49
49	2509	E	21±5	12±1	GCGGTCGTT GACGTAGCC AT	50
50	2510	E	17±5	12±2	GGTCGTTGA CGTAGCCA	51
51	2510	E	16±3	14±10	TGCGGTCGT TGACGTAGC CA	52
52	2511	E	19±2	8±3	GGTCGTTGA CGTAGCC	53
53	2511	E	18±10	11±5	CGGTCGTTG ACGTAGCC	54
54	2511	E	18±3	11±2	GTGCGGTCG TTGACGTAG CC	55
55	2512	E	19±6	10±1	CGGTCGTTG ACGTAGC	56
56	2512	E	22±8	12±2	CGTGCGGTC GTTGACGTA GC	57
57	2513	E	21±8	10±1	GCGTGCGGT CGTTGACGT AG	58
58	2514	E	21±8	11±2	GTGCGGTCG TTGACGTA	59
59	2514	E	19±3	8±2	CGCGTGCGG TCGTTGACG TA	60
60	2515	E	17±4	8±3	GTGCGGTCG TTGACGT	61
61	2515	E	23±10	13±4	CGTGCGGTC GTTGACGT	62
62	2516	E	43±4	17±3	CGTGCGGTC GTTGACG	63
63	2516	E	22±6	12±2	GCGTGCGGT CGTTGACG	64

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644. 100410273)	NM_020766.3' のブレ mRNA 内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
64	2517	E	46±17	30±3	CGTGCGGTC GTTGAC	65
65	2517	E	20±6	13±3	CGCGTGCGG TCGTTGAC	66
66	2518	E	24±7	21±4	GCGTGCGGT CGTTGA	67
67	2518	E	19±2	10±2	CGCGTGCGG TCGTTGA	68
68	2540	E	40±17	17±2	TGTGCGGGT CGATCTGAA AG	69
69	2543	E	17±5	9±4	GTGCGGGTC GATCTGA	70
70	2577	E	27±5	13±2	TCGTAGTCTA AAGCGCCAG T	71
71	2578	E	21±8	11±2	TTCGTAGTCT AAAGCGCCA G	72
72	2579	E	16±4	7±2	CGTAGTCTA AAGCGCCA	73
73	2579	E	32±3	8±2	CTTCGTAGTC TAAAGCGCC A	74
74	2580	E	18±2	15±4	GTAGTCTAA AGCGCC	75
75	2580	E	21±7	14±3	TCGTAGTCTA AAGCGCC	76
76	2580	E	33±11	13±6	TCTTCGTAGT CTAAAGCGC C	77
77	2581	E	22±5	17±9	CGTAGTCTA AAGCGC	78
78	2581	E	26±5	15±4	TCGTAGTCTA AAGCGC	79
79	2581	E	28±8	16±2	TTCGTAGTCT AAAGCGC	80
80	2581	E	30±13	15±6	CTCTTCGTAG TCTAAAGCG C	81
81	2582	E	38±16	11±2	CTTCGTAGTC TAAAGCG	82
82	2587	E	29±9	10±1	GTGCCCCTC TTCGTAGTCT A	83
83	2696	E	39±8	24±4	ACCGGCGGA TTGTCA	84
84	2696	E	62±10	34±7	GACCGGCGG ATTGTCA	85
85	2696	E	82±25	39±14	TGACCGGCG GATTGTCA	86
86	2700	E	37±7	10±3	TTGATGACC GGCGGATT	87

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644, 100410273)	NM_020766.3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
87	2700	E	27±9	10±1	AGGTTGATG ACCGGCGGA TT	88
88	2701	E	24±5	17±6	TGATGACCG GCGGAT	89
89	2701	E	37±4	11±1	TTGATGACC GGCGGAT	90
90	2767	E	57±15	125±17	CAAGGCGAT CACGTAGCC CG	91
91	2772	E	62±16	22±6	CGCACCAAG GCGATCACG TA	92
92	2773	E	50±12	20±6	CCGCACCAA GGCGATCAC GT	93
93	2790	E	45±9	26±6	TCGCGATCA GACACCCG	94
94	2790	E	34±5	11±4	GAGTCGCGA TCAGACACC CG	95
95	2911	E	19±4	11±4	TTGGTCGTG CTGCTCGCG GT	96
96	2912	E	17±3	9±2	ATTGGTCGT GCTGCTCGC GG	97
97	2915	E	10±3	10±1	ATTGGTCGT GCTGCTCG	98
98	2921	E	39±8	11±2	TGAGGTTGT ATTGGTCGT GC	99
99	2941	E	63±3	19±8	TCGCGTGCC TGAATTG	100
100	2941	E	30±8	10±3	GTCGCGTGC CTGAATTG	101
101	2941	E	74±20	16±2	GCCGTCGCG TGCCTGAATT G	102
102	2942	E	63±11	33±10	TCGCGTGCC TGAATT	103
103	2942	E	77±5	15±2	CGCCGTCGC GTGCCTGAA TT	104
104	2943	E	47±12	14±5	CCGTCGCGT GCCTGAAT	105
105	2943	E	82±16	19±2	CCGCCGTCG CGTGCCTGA AT	106
106	2944	E	15±2	8±2	GCCGTCGCG TGCCTGAA	107
107	2945	E	17±0	6±1	GCCGTCGCG TGCCTGA	108

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644.. 100410273)	NM_020766.3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
108	2945	E	15±3	8±1	CGCCGTCGC GTGCCTGA	109
109	2947	E	64±27	21±5	CGCCGTCGC GTGCCT	110
110	3068	E	56±5	8±1	CGCCAGGCG TGTTGTTT	111
111	3069	E	43±15	8±1	GCGCCAGGC GTGTTGTT	112
112	3070	E	40±5	15±4	GCGCCAGGC GTGTTGT	113
113	3101	E	53±7	37±4	GGTCGGGGT CGCGAGCAG AC	114
114	3107	E	64±17	28±6	GACCCAGGT CGGGGTCGC GA	115
115	3142	E	37±11	10±1	CGACGGCAC GATCTGGTA GG	116
116	3149	E	60±13	14±5	GCACCTGCG ACGGCACGA TC	117
117	3150	E	51±5	29±3	CTGCGACGG CACGAT	118
118	3150	E	29±10	14±3	CCTGCGACG GCACGAT	119
119	3150	E	36±7	13±4	ACCTGCGAC GGCACGAT	120
120	3150	E	75±9	14±1	CGCACCTGC GACGGCACG AT	121
121	3151	E	17±4	14±3	CCTGCGACG GCACGA	122
122	3151	E	41±7	11±2	ACCTGCGAC GGCACGA	123
123	3157	E	88±5	16±4	CATGTCCCG CACCTGCGA CG	124
124	3212	E	34±12	19±3	CGCGTAGAT GTCGCCT	125
125	3213	E	62±12	31±9	GCGCGTAGA TGTCGCC	126
126	3215	E	36±13	13±4	ATCGCAGCG CGTAGATGT CG	127
127	3216	E	63±9	15±5	GATCGCAGC GCGTAGATG TC	128
128	3217	E	26±7	10±2	TCGCAGCGC GTAGATGT	129
129	3217	E	37±23	12±3	GGATCGCAG CGCGTAGAT GT	130

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644. 100410273)	NM_020766.3' のpre-mRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
130	3218	E	35±8	17±4	ATCGCAGCG CGTAGATG	131
131	3219	E	60±14	30±7	ATCGCAGCG CGTAGAT	132
132	3219	E	43±8	18±2	GATCGCAGC GCGTAGAT	133
133	3220	E	57±9	37±7	ATCGCAGCG CGTAGA	134
134	3220	E	35±9	34±8	GATCGCAGC GCGTAGA	135
135	3224	E	27±10	8±2	GGTTAAAGG ATCGCAGCG CG	136
136	3225	E	37±13	8±4	TGGTTAAAG GATCGCAGC GC	137
137	3226	E	36±14	10±4	GTGGTTAAA GGATCGCAG CG	138
138	3252	E	107±10	19±9	AATTCGAAC GCCTTGGT	139
139	3253	E	27±11	15±5	ATTCGAACG CCTTGG	140
140	3253	E	56±12	19±5	AATTCGAAC GCCTTGG	141
141	3255	E	28±3	19±9	GAATTCGAA CGCCTT	142
142	3257	E	20±3	19±4	TTGAATTCGA ACGCC	143
143	3305	E	20±3	10±2	CGTAGCGTT GCTTTGC	144
144	3305	E	23±1	12±5	CCGTAGCGT TGCTTTGC	145
145	3306	E	29±9	23±10	CGTAGCGTT GCTTTG	146
146	3306	E	39±13	22±3	CCGTAGCGT TGCTTTG	147
147	3335	E	20±10	11±3	GTCGTTGAC GTCGAGG	148
148	3377	E	73±14	24±9	CGGCAGTGC CGTTAATCA GA	149
149	3378	E	55±16	13±6	TCGGCAGTG CCGTTAATC AG	150
150	3456	E	102±12	17±11	TTTTCGCCCT CATCGTAGT C	151
151	3457	E	54±9	34±7	TCGCCCTCA TCGTAGT	152
152	3458	E	39±11	14±4	TTCGCCCTC ATCGTAG	153

10

20

30

40

50

【表 2 - 8】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023. 11内の位 置、領域:相補体 (100291644. 100410273)	NM_020766. 3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0. 2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
153	3469	E	43±6	14±2	GGTGACTCG GCCATTTTCG C	154
154	3475	E	36±8	14±1	GTCGTAGGT GACTCGGCC AT	155
155	3502	E	30±7	18±9	AAAGAAGCC GCGGTCGCC CT	156
156	3504	E	28±10	11±3	TCAAAGAAG CCGCGGTCG CC	157
157	3505	E	89±25	9±2	AAAGAAGCC GCGGTCGC	158
158	3505	E	28±8	14±3	TTCAAAGAA GCCGCGGTC GC	159
159	3506	E	38±13	21±8	TTTCAAAGAA GCCGCGGTC G	160
160	3507	E	37±5	20±9	ATTTCAAAGA AGCCGCGGT C	161
161	3508	E	29±3	19±5	TTCAAAGAA GCCGCGGT	162
162	3509	E	29±1	16±3	TTCAAAGAA GCCGCGG	163
163	3509	E	27±4	23±6	CTATTTCAA GAAGCCGCG G	164
164	3510	E	34±9	16±5	ATTTCAAAGA AGCCGCG	165
165	3606	E	61±19	13±1	GTCTTGCCG TGGTCGTGA GC	166
166	3607	E	64±7	18±4	TGTCTTGCC GTGGTCGTG AG	167
167	3608	E	53±8	20±5	ATGTCTTGCC GTGGTCGTG A	168
168	3610	E	17±2	32±7	TGTCTTGCC GTGGTCGT	169
169	3761	E	33±6	15±2	TTGCCACGA AGATCATA	170
170	3775	E	32±4	9±1	CGCTTGCA TTGATTG	171
171	3803	E	25±2	11±2	AGTTGTAGG TCCGGATC	172
172	3804	E	37±11	10±2	AGTTGTAGG TCCGGAT	173
173	5902	I	112±24	30±13	ACCCTAGTA CTAAGTTG AT	174

10

20

30

40

50

【表 2 - 9】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644, 100410273)	NM_020766.3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
174	6199	I	80±15	12±4	GATCATCTC GCAAGTCTC AT	175
175	6203	I	30±7	15±3	GATCATCTC GCAAGTC	176
176	6584	I	64±33	40±14	AGGAATTTAA AGGTTAGTG C	177
177	6620	I	108±21	40±17	CCGAGGAGA CAAGTGATG GT	178
178	6691	I	75±8	20±5	CTTGCTCCTC GCTAATGGG A	179
179	7523	E	28±4	8±3	CTGACAACG TTCATCTTGT C	180
180	7609	E	12±3	6±2	AAGTGCTCT CAGAGCGGC GG	181
181	7610	E	18±2	9±4	AAAGTGCTC TCAGAGCGG CG	182
182	7639	E	16±3	5±2	TGCGGGTAT TCTGGTTCTC C	183
183	8495	I	58±19	42±6	CGTTGTTAGA GACGA	184
184	8495	I	69±19	62±3	TTCGTTGTTA GAGACGA	185
185	9724	I	33±10	6±1	GAGCTATTG GTGATCCAC AA	186
186	11453	I	81±9	8±3	GAGTGGACT CGTCTATAAT C	187
187	11456	I	37±12	9±2	AGTGGACTC GTCTATA	188
188	11457	I	46±17	55±30	GAGTGGACT CGTCTAT	189
189	11458	I	30±8	24±8	TGAGTGGAC TCGTCTA	190
190	11460	I	14±1	7±2	GTCTGAGTG GACTCGTC	191
191	17511	I	22±3	5±1	AGCCATATG CCTCTGTTC GT	192
192	17512	I	32±12	10±5	TAGCCATAT GCCTCTGTT CG	193
193	18902	I	41±12	10±3	GCCTTTATG GCAGAACTC GC	194

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 0】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644. 100410273)	NM_020766.3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
194	19092	I	43±4	16±10	ACTTAAAAG GAGATCTCG GT	195
195	19985	I	36±5	12±1	GAGCCTAAC TACTAAACA GT	196
196	23931	I	15±1	8±2	TCGTGTGCTT AGTAGGGCT C	197
197	23933	I	14±4	13±4	CATCGTGTG CTTAGTAGG GC	198
198	23935	I	20±2	17±2	AGCATCGTG TGCTTAGTAG G	199
199	24118	I	45±4	16±3	CCCTCATCG GCACTGGTA AA	200
200	24120	I	31±9	16±6	CTCCCTCAT CGGCACTGG TA	201
201	28847	I	35±7	11±4	GCCGTTGAA GATAGC	202
202	31641	I	26±4	14±2	ACGTGCTAG CCAGTATAA CC	203
203	31651	I	57±14	33±9	GTATTAACGT GCTAGC	204
204	31860	I	33±12	11±5	ACCTGTTTCT CAATAC	205
205	32315	I	38±4	17±3	CGTTGGTGA TTAACCAGA CT	206
206	32396	I	21±7	9±5	GGTTCGATG TGATTGG	207
207	32396	I	27±5	15±3	ATAGGGTTC GATGTGATT GG	208
208	35911	I	37±5	16±9	AGGTCGCAC TAAACAATTT A	209
209	36014	I	41±10	14±2	CTTGCCAAG AATAGCTTA GC	210
210	38436	I	51±21	23±11	AAGGTCCTT CATGGACGA GA	211
211	39063	I	62±31	22±10	TCGTGGTCC TTCCTACTAG A	212
212	40213	I	98±35	33±14	CGACCACCA GATAGGCAA GC	213

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 1】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644. 100410273)	NM_020766.3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
213	40814	I	78±19	22±6	GGCCTTATA CCTAAGAAC GA	214
214	40815	I	120±30	47±9	TGGCCTTATA CCTAAGAAC G	215
215	42131	I	47±13	29±3	CCGAAGGGG TAGCTA	216
216	43211	I	143±43	61±10	TGGAATCGA TGAGAAGGG TA	217
217	43743	I	61±15	22±5	CCCGTGTTG GAGTCATAC CT	218
218	43902	I	133±31	99±25	GACAAGTAT TGCTCCCTG GT	219
219	44763	I	85±18	40±17	GCCTACAGT AGCTTTATTG C	220
220	44892	I	80±23	40±18	AATGGAAGC CCAATTGGC TC	221
221	46416	I	52±8	48±16	TAGGTAGAA TGTGCGTGC GT	222
222	46417	I	39±15	15±5	GGTAGAATG TGCGTGCG	223
223	48364	I	44±5	31±12	CTGCTTAAA CACGACAGG TT	224
224	48370	I	42±3	22±7	GCCTGCTTA AACACGA	225
225	53050	I	25±2	20±8	ACTTGACG CAGGCTACT GG	226
226	53051	I	46±5	24±10	TACTTGACG CAGGCTACT G	227
227	53052	I	45±12	34±14	ATACTTGAC GCAGGCTAC T	228
228	53053	I	62±10	17±6	TTGTACGCA GGCTAC	229
229	53053	I	58±3	63±13	TATACTTGTA CGCAGGCTA C	230
230	53054	I	28±15	7±2	CTTGACGC AGGCTA	231
231	54334	I	31±4	21±11	CGTGCCCTA GTCTCTAGA AG	232

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 2】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644, 100410273)	NM_020766.3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
232	54338	I	42±4	20±6	GAATCGTGC CCTAGTCTCT A	233
233	54341	I	40±3	19±6	ACTGAATCG TGCCCTAGT CT	234
234	54496	I	24±3	18±3	GATTCTAGTA AGACGTTTG G	235
235	54506	I	84±25	58±18	GATATAGGA GGATTCTAGT A	236
236	54840	I	36±11	17±12	TAGGATCGT CACCAACCT TC	237
237	54843	I	17±10	6±2	TAGGATCGT CACCAACC	238
238	54843	I	65±30	17±10	ACATAGGAT CGTCACCAA CC	239
239	54850	I	54±18	20±3	TAACATAGG ATCGTC	240
240	54850	I	34±4	25±13	TTAACATAG GATCGTC	241
241	56292	I	74±20	49±16	TAATCCGTCT CAGGTC	242
242	56292	I	32±12	16±2	GTAATCCGT CTCAGGTC	243
243	56293	I	60±16	19±5	GTAATCCGT CTCAGGT	244
244	56376	I	78±25	47±10	TAGCGCTAG TCAATGTGG CA	245
245	56377	I	44±21	41±15	GTAGCGCTA GTCAATGTG GC	246
246	56378	I	46±18	42±15	AGTAGCGCT AGTCAATGT GG	247
247	56379	I	61±25	34±7	TAGTAGCGC TAGTCAATGT G	248
248	56380	I	41±15	17±4	GTAGCGCTA GTCAATGT	249
249	56380	I	97±19	37±9	TTAGTAGCG CTAGTCAAT GT	250
250	56382	I	32±8	11±5	GTAGCGCTA GTCAAT	251
251	56382	I	75±10	23±17	AGTAGCGCT AGTCAAT	252
252	56383	I	47±19	21±9	AGTAGCGCT AGTCAA	253

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 3】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644. 100410273)	NM_020766.3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
253	56383	I	71±11	29±9	TAGTAGCGC TAGTCAA	254
254	56383	I	29±3	22±4	TTAGTAGCG CTAGTCAA	255
255	56384	I	62±11	29±4	TTAGTAGCG CTAGTCA	256
256	56385	I	74±7	40±13	TTAGTAGCG CTAGTC	257
257	56385	I	73±19	41±15	ATTAGTAGC GCTAGTC	258
258	56385	I	71±20	52±32	AATTAGTAG CGCTAGTC	259
259	56385	I	52±9	21±10	TGCAATTAGT AGCGCTAGT C	260
260	56386	I	45±15	52±8	ATTAGTAGC GCTAGT	261
261	56386	I	68±7	34±1	AATTAGTAG CGCTAGT	262
262	56386	I	56±8	25±9	CAATTAGTA GCGCTAGT	263
263	56386	I	66±24	43±21	ATGCAATTA GTAGCGCTA GT	264
264	56387	I	40±5	24±7	CAATTAGTA GCGCTAG	265
265	56387	I	43±6	18±2	GCAATTAGT AGCGCTAG	266
266	56388	I	47±7	42±8	CAATTAGTA GCGCTA	267
267	56390	I	51±14	34±8	TGCAATTAGT AGCGC	268
268	57336	I	74±6	35±5	ACCCGGAAT TGATTAAGC AC	269
269	59591	E	47±4	11±1	CGGCTATTC ACGTAGTTG GA	270
270	59592	E	53±12	11±3	TCGGCTATTC ACGTAGTTG G	271
271	59594	E	68±10	15±1	GCTCGGCTA TTCACGTAGT T	272
272	59595	E	55±9	14±5	CGGCTATTC ACGTAGT	273
273	59596	E	79±7	51±6	CGGCTATTC ACGTAG	274
274	59596	E	52±13	21±4	TCGGCTATTC ACGTAG	275
275	59596	E	60±8	17±3	GGGCTCGGC TATTCACGTA G	276

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 4】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644. 100410273)	NM_020766.3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
276	59597	E	115±43	85±37	TCGGCTATTC ACGTA	277
277	59598	E	66±6	29±9	CTCGGCTATT CACGT	278
278	59599	E	62±6	23±6	GCTCGGCTA TTCACG	279
279	59599	E	49±3	20±4	GGGCTCGGC TATTCACG	280
280	59606	E	31±6	19±11	TTGATTAAAT GGGCTCGGC T	281
281	59608	E	23±4	12±1	TGATTAAATG GGCTCGG	282
282	60855	I	57±3	20±4	CTGATAATAC AAGGGCTAC C	283
283	62557	I	97±26	73±8	CCGAAAAGA AGGGTCCAA GA	284
284	64064	I	70±2	28±1	GCATGACGA ATGAACATC AC	285
285	66561	I	38±5	18±8	TGAATCCATT CCCTAGTCG G	286
286	68152	I	103±23	108±20	CGACCGTGA CAGATCTGA TT	287
287	68153	I	103±28	92±7	ACGACCGTG ACAGATCTG AT	288
288	68155	I	41±7	63±6	CGACCGTGA CAGATCTG	289
289	68156	I	80±12	43±3	ACGACCGTG ACAGATCT	290
290	68157	I	68±20	75±14	TACGACCGT GACAGATC	291
291	68157	I	82±23	81±4	ATTTACGAC CGTGACAGA TC	292
292	68158	I	67±7	101±31	ACGACCGTG ACAGAT	293
293	68158	I	57±8	58±7	TACGACCGT GACAGAT	294
294	68158	I	76±32	76±8	TTACGACCG TGACAGAT	295
295	68159	I	60±9	78±13	TACGACCGT GACAGA	296
296	68160	I	72±30	32±18	TTACGACCG TGACAG	297
297	68160	I	57±9	58±7	TTTACGACC GTGACAG	298

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 5】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644. 100410273)	NM_020766.3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
298	68162	I	64±13	63±10	AATTTACGAC CGTGAC	299
299	68162	I	65±15	66±17	TAATTTACGA CCGTGAC	300
300	68163	I	57±11	31±4	AATTTACGAC CGTGA	301
301	68163	I	70±17	57±13	TAATTTACGA CCGTGA	302
302	68163	I	47±11	72±15	ATAATTTACG ACCGTGA	303
303	68164	I	80±9	58±16	TAATTTACGA CCGTG	304
304	68164	I	63±13	44±12	ATAATTTACG ACCGTG	305
305	68164	I	55±6	62±6	GATAATTTAC GACCGTG	306
306	68165	I	39±3	30±10	ATAATTTACG ACCGT	307
307	68165	I	91±23	52±9	TGATAATTTA CGACCGT	308
308	68166	I	56±9	39±10	GATAATTTAC GACCG	309
309	68166	I	70±13	35±2	TGATAATTTA CGACCG	310
310	68274	E	35±14	11±5	TCCGCTGGA CATCATGCT CA	311
311	68276	E	46±11	11±6	GCTCCGCTG GACATCATG CT	312
312	68277	E	62±19	34±2	GGCTCCGCT GGACATCAT GC	313
313	68279	E	42±9	17±4	GCTCCGCTG GACATCAT	314
314	68280	E	26±6	12±1	GGCTCCGCT GGACATCA	315
315	68284	E	53±17	17±7	CAATACAGG CTCCGCTGG AC	316
316	68285	E	30±8	12±3	ACAATACAG GCTCCGCTG GA	317
317	68288	E	74±12	22±4	CAATACAGG CTCCGCT	318
318	72766	I	26±4	12±1	CGTATTAATT CATGGGCAC T	319
319	73373	I	21±6	12±6	GCATGATCC CTATAAACCC CC	320
320	74211	I	56±26	18±9	GATCTAATCA ACCGCTTTGT	321

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 6】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023.11内の位 置、領域:相補体 (100291644.. 100410273)	NM_020766.3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0.2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
321	74212	I	27±14	13±6	GGATCTAAT CAACCGCTT TG	322
322	74214	I	28±11	20±6	GGGGATCTA ATCAACCGC TT	323
323	74216	I	50±13	33±12	GGATCTAAT CAACCGC	324
324	74928	I	32±9	28±21	GCCTCTAAA CCAGCAAGG TA	325
325	76740	I	22±15	8±1	CGATCCTAT GTAGTCTA	326
326	76741	I	23±2	10±6	CGATCCTAT GTAGTCT	327
327	76741	I	14±8	9±1	CCGATCCTA TG TAGTCT	328
328	76741	I	18±7	8±1	TCACCGATC CTATGTAGTC T	329
329	76742	I	19±6	10±1	CGATCCTAT GTAGTC	330
330	76742	I	18±2	12±5	CCGATCCTA TG TAGTC	331
331	76742	I	12±5	8±0	ACCGATCCT ATGTAGTC	332
332	76742	I	20±8	9±2	TTCACCGAT CCTATGTAGT C	333
333	76743	I	17±2	14±2	CCGATCCTA TG TAGT	334
334	76743	I	22±8	11±9	ACCGATCCT ATGTAGT	335
335	76743	I	32±13	16±5	CTTCACCGA TCCTATGTAG T	336
336	76744	I	22±4	14±4	ACCGATCCT ATGTAG	337
337	76744	I	33±17	15±3	TCACCGATC CTATGTAG	338
338	76745	I	35±4	13±3	TCACCGATC CTATGTA	339
339	81342	I	19±2	14±7	CTCTAATTAG CGTCAC	340
340	81582	I	71±26	52±15	TACTTCAGTA CCACCGGAA T	341
341	90521	I	57±10	43±6	CTAGTAGTC CTGAACTAAT G	342
342	90553	I	20±7	15±4	GGATTTGGT AGTTCCATC AC	343

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 7】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023. 11内の位 置、領域:相補体 (100291644. 100410273)	NM_020766. 3' のプレmRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0. 2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
343	91819	I	46±17	27±11	GCTAGCCTT ATCATTGAC C	344
344	91825	I	20±5	10±3	GTCCAAGCT AGCCTTATC AT	345
345	96127	I	62±18	27±14	TAACGATTTT ACGGAGACA A	346
346	96128	I	26±4	13±10	CGATTTTACG GAGACA	347
347	96128	I	17±6	10±1	ACGATTTTAC GGAGACA	348
348	96128	I	39±9	20±11	GTAACGATTT TACGGAGAC A	349
349	96129	I	14±2	8±2	CGATTTTACG GAGAC	350
350	96129	I	28±4	12±10	ACGATTTTAC GGAGAC	351
351	96129	I	26±6	11±1	AACGATTTTA CGGAGAC	352
352	96129	I	34±3	16±5	AGTAACGAT TTTACGGAG AC	353
353	96130	I	41±10	11±2	AACGATTTTA CGGAGA	354
354	96131	I	26±3	13±2	AACGATTTTA CGGAG	355
355	96131	I	31±16	11±3	GTAACGATTT TACGGAG	356
356	96132	I	50±15	19±7	GTAACGATTT TACGGA	357
357	96133	I	34±7	26±7	GTAACGATTT TACGG	358
358	96133	I	71±14	36±12	AGTAACGAT TTTACGG	359
359	96133	I	34±5	15±3	CATGAGTAA CGATTTTACG G	360
360	96134	I	55±14	20±6	GAGTAACGA TTTTACG	361
361	96134	I	34±18	13±2	TGAGTAACG ATTTTACG	362
362	96134	I	54±10	21±4	TCATGAGTA ACGATTTTAC G	363
363	96890	I	24±7	17±11	TCCGTTCAA GCCTGCATG AT	364
364	97386	I	75±6	40±8	TGCACGTAG GAGTAGC	365
365	97386	I	69±10	46±6	TTGCACGTA GGAGTAGC	366

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 8】

(表 2 の続き)

ASO 番号	遺伝子NC_000 023. 11内の位 置、領域:相補体 (100291644. 100410273)	NM_020766. 3' のブレ mRNA内のエ クソン(E)又はイント ロン(I)における標的 部位の局在化	ASOトランスフェクト細胞における PCDH19の発現		ASO配列5' - 3'	配列 番号
			0. 2nM ASO PCDH19/ GAPDH2 (%平均±SD)	2nM ASO PCDH19/ GAPDH (%平均±SD)		
366	97390	I	32±6	15±4	CGAGCCTTT GCACGTAGG AG	367
367	97391	I	56±8	43±6	TCGAGCCTTT GCACGTAGG A	368
368	97393	I	62±25	33±7	ACTCGAGCC TTTGCACGTA G	369
369	113516	E	88±6	39±4	AATAGACAG CGCGATGAT GT	370
370	113518	E	85±22	37±8	TCAATAGAC AGCGCGATG AT	371
371	113519	E	57±3	28±9	TAGACAGCG CGATGA	372
372	113519	E	52±5	33±16	ATAGACAGC GCGATGA	373
373	113520	E	58±5	27±7	ATAGACAGC GCGATG	374
374	113520	E	57±11	31±6	AATAGACAG CGCGATG	375
375	113520	E	88±13	35±7	CTTCAATAGA CAGCGCGAT G	376
376	113521	E	61±6	25±8	AATAGACAG CGCGAT	377
377	113521	E	63±17	35±12	CAATAGACA GCGCGAT	378
378	113521	E	59±7	33±15	TCAATAGAC AGCGCGAT	379
379	113521	E	56±19	25±3	GCTTCAATA GACAGCGCG AT	380
380	113523	E	42±2	16±4	TCAATAGAC AGCGCG	381
381	113582	E	45±8	17±5	GGTTGCGAA AGTCCGTTT GG	382
382	113970	E	85±17	20±3	CGATATCCTT CAGACGCTT C	383
383	113973	E	59±18	17±6	GAACGATAT CCTTCAGAC GC	384
384	113974	E	91±13	50±18	GATATCCTTC AGACG	385

¹ 特異性がヒト／非ヒト霊長類／イヌであるASO番号13、109～112、138～140、155～164、169～172、176、179～182、209、224、280、281、310～317、324、341、及び384を除いて、ASOの特異性はヒト／非ヒト霊長類である。

10

20

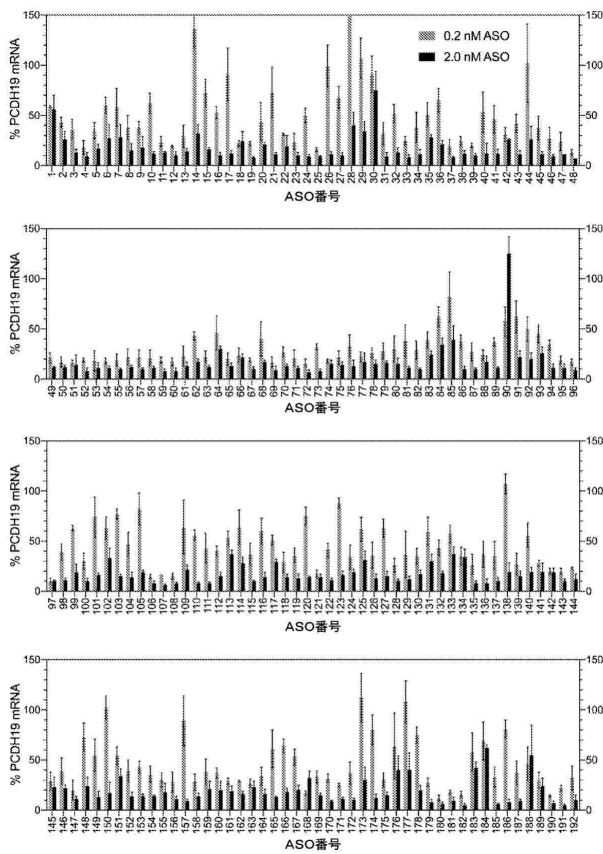
30

40

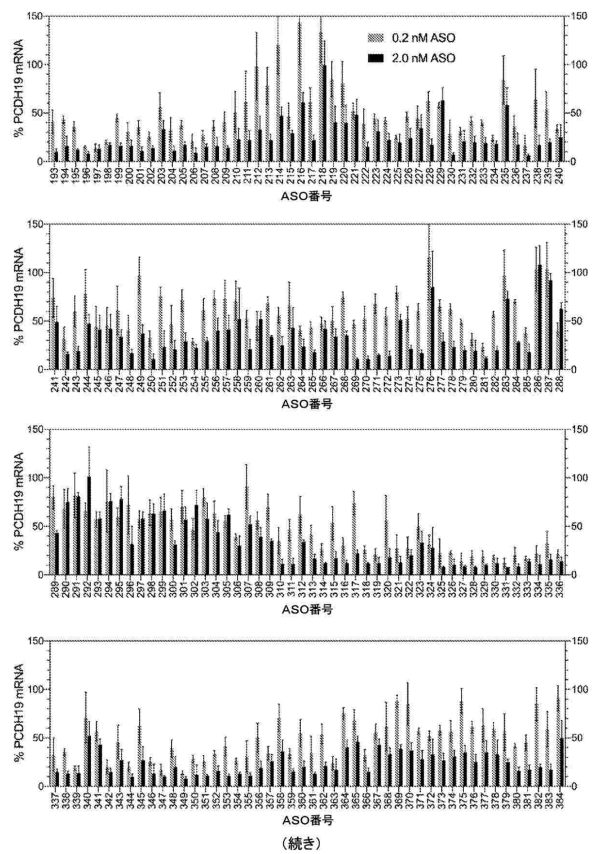
50

【図面】

【図 1 - 1】



【図 1 - 2】



10

20

【配列表】

2024535432000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2022/051153														
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61P 25/08 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)																
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																
B. FIELDS SEARCHED																
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)																
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS, EMBASE, CAPLUS, MEDLINE, and PATENW (all English language databases available to EPOQUE) were searched for keywords antisense, morpholino, oligonucleotide, PCDH19, protocadherin, and like terms.																
Inventor's name searched for on Google Scholar, Google Patents, PudMed, and internal IP Australia databases. GenomeQuest searched for SEQ ID NOs: 1-385.																
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.														
	Documents are listed in the continuation of Box C															
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex																
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"D" document cited by the applicant in the international application</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:		"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"D" document cited by the applicant in the international application	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:																
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention															
"D" document cited by the applicant in the international application	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone															
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art															
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family															
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																
Date of the actual completion of the international search 31 October 2022		Date of mailing of the international search report 31 October 2022														
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au		Authorised officer Spencer Richardson AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 2322														

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2022/051153
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2022/051153
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/086591 A1 (MEDVET SCIENCE PTY LTD) 16 July 2009 SEQ ID NO: 3; page 21, lines 21-31	1-2, 6-13, 15-16
X	EP 2361988 B1 (Sapporo Medical University, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) 13 April 2016 SEQ ID NO: 65; example 22, abstract	1-2, 6-13, 15-16
X	US 20140094382 A1 (Alan B. Frey; Edwin J. Vazquez-Cintron; Ngozi R. Monu; Jeremy C. Burns) 03 April 2014 SEQ ID NO: 23; page 21, table 1	1-2, 6-16
X	WO 2020/191171 A1 (THE BROAD INSTITUTE, INC.; PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE; MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 24 September 2020 SEQ ID NOs: 978671, 197464, 216343, 988264, 227235, 241840, 1113645; abstract	1-2, 6-16
A	Insieme per la Ricerca PCDH19 – ONLUS [retrieved from internet on 7 October 2022] <URL: https://www.pcdh19research.org/en/research/ > Relevant section published on or before 17 April 2021, per Wayback Machine Section headed "August 2020"	1-24
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2022/051153	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2009/086591 A1	16 July 2009	WO 2009086591 A1	16 Jul 2009
		CA 2711497 A1	16 Jul 2009
		JP 2011509080 A	24 Mar 2011
		JP 5624892 B2	12 Nov 2014
		US 2011126302 A1	26 May 2011
		US 9873723 B2	23 Jan 2018
		US 2018215803 A1	02 Aug 2018
EP 2361988 B1	13 April 2016	EP 2361988 A1	31 Aug 2011
		EP 2361988 B1	13 Apr 2016
		CN 102203290 A	28 Sep 2011
		CN 102203290 B	06 May 2015
		CN 102369281 A	07 Mar 2012
		CN 102369281 B	08 Jan 2014
		CN 104971341 A	14 Oct 2015
		CN 104971341 B	13 Dec 2019
		EP 3118326 A2	18 Jan 2017
		EP 3118326 B1	29 Apr 2020
		HK 1163752 A1	14 Sep 2012
		HK 1212245 A1	10 Jun 2016
		JP WO2010050190 A1	29 Mar 2012
		JP 5960946 B2	02 Aug 2016
		JP 2016127820 A	14 Jul 2016
		JP 6276742 B2	07 Feb 2018
		JP WO2010107116 A1	20 Sep 2012
		KR 20110134482 A	14 Dec 2011
		US 2011262358 A1	27 Oct 2011
		US 8541544 B2	24 Sep 2013
		US 2014044686 A1	13 Feb 2014
		US 9399760 B2	26 Jul 2016
		US 2016367628 A1	22 Dec 2016
		US 10080776 B2	25 Sep 2018
		US 2019054141 A1	21 Feb 2019
		US 11382952 B2	12 Jul 2022
		WO 2010050190 A1	06 May 2010
		WO 2010050268 A1	06 May 2010

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2022/051153	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		WO 2010107116 A1	23 Sep 2010
US 20140094382 A1	03 April 2014	US 2014094382 A1	03 Apr 2014
		US 9562892 B2	07 Feb 2017
WO 2020/191171 A1	24 September 2020	WO 2020191171 A1	24 Sep 2020
		AU 2020240109 A1	30 Sep 2021
		AU 2020242032 A1	07 Oct 2021
		CA 3129988 A1	24 Sep 2020
		CA 3130488 A1	24 Sep 2020
		CN 113891936 A	04 Jan 2022
		CN 113891937 A	04 Jan 2022
		CN 114127285 A	01 Mar 2022
		CN 114729365 A	08 Jul 2022
		EA 202192547 A1	01 Feb 2022
		EP 3942040 A1	26 Jan 2022
		EP 3942041 A1	26 Jan 2022
		EP 3942042 A1	26 Jan 2022
		EP 3942043 A2	26 Jan 2022
		GB 2601617 A	08 Jun 2022
		GB 2601618 A	08 Jun 2022
		GB 2601619 A	08 Jun 2022
		IL 286324 A	31 Oct 2021
		IL 286335 A	31 Oct 2021
		JP 2022526908 A	27 May 2022
		JP 2022527740 A	06 Jun 2022
		JP 2022531539 A	07 Jul 2022
		JP 2022532470 A	15 Jul 2022
		KR 20210142210 A	24 Nov 2021
		KR 20210143230 A	26 Nov 2021
		SG 11202109679V A	28 Oct 2021
		SG 11202109882V A	28 Oct 2021
		US 11447770 B1	20 Sep 2022
		WO 2020191153 A2	24 Sep 2020
		WO 2020191233 A1	24 Sep 2020
		WO 2020191234 A1	24 Sep 2020
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)			

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/AU2022/051153	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		WO 2020191239 A1	24 Sep 2020
		WO 2020191241 A1	24 Sep 2020
		WO 2020191242 A1	24 Sep 2020
		WO 2020191243 A1	24 Sep 2020
		WO 2020191245 A1	24 Sep 2020
		WO 2020191246 A1	24 Sep 2020
		WO 2020191248 A1	24 Sep 2020
		WO 2020191249 A1	24 Sep 2020
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	
A 6 1 K 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 9/00	
A 6 1 K 9/127(2006.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/18 (2006.01)	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/20 (2006.01)	A 6 1 P 25/20	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	

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

弁理士 池田 達則

(74)代理人 100166165

弁理士 津田 英直

(72)発明者 スティーブン ペトロロー

オーストラリア国, ビクトリア 3 0 1 0 , ザ ユニバーシティ オブ メルボルン, ロイヤル パレ
ード 3 0 , ケネス マイヤー ビルディング, レベル 5 , シー／オーザ フローリー インステ
ィテュート オブ ニューロサイエンス アンド メンタル ヘルス

F ターム (参考) 4C076 AA19 AA95 AA99 CC01 CC41 EE59 FF68
4C084 AA13 MA11 MA24 NA14 ZA01 ZA02 ZA05 ZA06 ZA18 ZB32
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA11 MA24 NA14 ZA01
ZA02 ZA05 ZA06 ZA18 ZB32