(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-511714
(P2025-511714A)
(43)公表日　令和7年4月16日(2025.4.16)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C07K 16/28	*(2006.01)*	C07K	16/28	ZNA　4C076
C07K 16/46	*(2006.01)*	C07K	16/46	4C084
A61K 47/68	*(2017.01)*	A61K	47/68	4C085
A61P 21/00	*(2006.01)*	A61P	21/00	4H045
A61K 48/00	*(2006.01)*	A61K	48/00	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全100頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-559146(P2024-559146)
(86)(22)出願日　令和5年4月5日(2023.4.5)
(85)翻訳文提出日　令和6年11月28日(2024.11.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/017574
(87)国際公開番号　WO2023/196400
(87)国際公開日　令和5年10月12日(2023.10.12)
(31)優先権主張番号　63/327,725
(32)優先日　令和4年4月5日(2022.4.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　518345192
アビディティー バイオサイエンシーズ，インク．
アメリカ合衆国 ９２１２１ カリフォルニア州 サンディエゴ サイエンス・センター・ドライブ １０５７８ スイート １２５
(74)代理人　110003797
弁理士法人清原国際特許事務所
(72)発明者　ダリモント，ベアトリス ダイアナ
アメリカ合衆国 ９２１２１ カリフォルニア州 サンディエゴ サイエンス・センター・ドライブ １０５７８ スイート １２５
(72)発明者　エチャニス イリゴイエン，ウスエ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲート組成物、およびＤＭＤエクソン４４スキッピングを誘導する方法

(57)【要約】
本明細書には、不正確にスプライシングされたジストロフィンｍＲＮＡ転写物に変化を誘導してエクソン４４スキッピングを誘導する抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲートおよび医薬組成物が開示される。また本明細書には、不正確にスプライシングされたジストロフィンｍＲＮＡ転写物に変化を誘導してエクソン４４スキッピングを誘導する抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲートまたは医薬組成物を投与する工程を含む、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを含む筋ジストロフィーを処置するための方法も記載される。
【選択図】図８

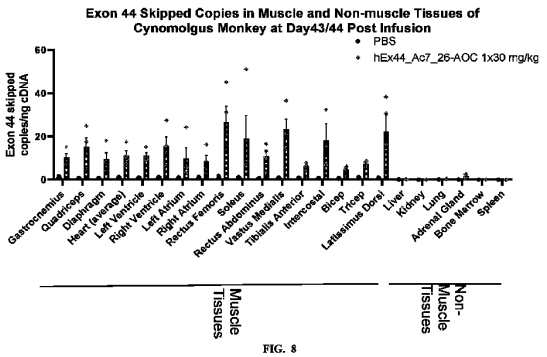


FIG. 8

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）分子にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含むＰＭＯコンジュゲートであって、前記ＰＭＯ分子が配列番号１００～１３３からなる群から選択される配列を含む、ＰＭＯコンジュゲート。
【請求項２】
前記ＰＭＯ分子が、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のアクセプタスプライス部位、ドナースプライス部位、またはエクソンスプライスエンハンサ要素にハイブリダイズし、前記ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導して、切断型ＤＭＤタンパク質をコードするｍＲＮＡ転写物を生成する、請求項１に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項３】
前記ＰＭＯ分子が、少なくとも約１０～約３０ヌクレオチド長を含む、請求項１または２に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項４】
前記ＰＭＯ分子が筋細胞中に送達される、請求項１～３のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項５】
前記ＰＭＯ分子が、ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物中のＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のエクソン４４アクセプタスプライス部位をハイブリダイズして、切断型ジストロフィンタンパク質をコードするｍＲＮＡ転写物を生成する、請求項１～４のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項６】
前記抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片が、ヒト化抗体もしくはその抗原結合断片、キメラ抗体もしくはその抗原結合断片、モノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片、一価Ｆａｂ’、二価Ｆａｂ２、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、またはラクダ科動物抗体もしくはその抗原結合断片を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項７】
前記ＰＭＯ分子が、リンカーを介して前記抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる、請求項１～６のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項８】
前記リンカーが切断可能リンカーである、請求項７に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項９】
前記リンカーが切断不能リンカーである、請求項７に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項１０】
前記リンカーが、ヘテロ二官能性リンカー、ホモ二官能性リンカー、マレイミド基、ジペプチド部分、安息香酸基またはその誘導体、C_1－C_6アルキル基、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項７に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項１１】
約１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、またはそれ以上のＰＭＯ分子対抗体比（ＤＡＲ）を有する、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項１２】
約１、２、３、４、５、６、７、８、またはそれ以上の平均ＤＡＲを有する、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項１３】

３．５～４．５の範囲の平均ＤＡＲを有する、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項１４】
７．５～８．５の範囲の平均ＤＡＲを有する、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項１５】
約４の平均ＤＡＲを有する、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項１６】
約８の平均ＤＡＲを有する、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項１７】
約４のＤＡＲを有する、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項１８】
約８のＤＡＲを有する、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項１９】
非経口投与用に製剤化される、請求項１～１７のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項２０】
切断型ジストロフィンタンパク質が筋ジストロフィーを調節する、請求項１～１９のいずれか一項に記載のＰＭＯコンジュゲート。
【請求項２１】
筋ジストロフィーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたはベッカー型筋ジストロフィーである、請求項１９に記載のＰＭＯ。
【請求項２２】
筋ジストロフィーの処置を必要とする対象において筋ジストロフィーを処置する方法であって、配列番号１００～１３３からなる群から選択される配列を含むホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）分子にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含むＰＭＯコンジュゲートを前記対象に投与する工程を含み、前記ＰＭＯ分子が、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のアクセプタスプライス部位、ドナースプライス部位、またはエクソンスプライスエンハンサ要素にハイブリダイズし、前記ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導して、切断型ジストロフィンタンパク質をコードするｍＲＮＡ転写物を生成する、方法。
【請求項２３】
前記ＰＭＯ分子が筋細胞中に送達される、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片が、ヒト化抗体もしくはその抗原結合断片、キメラ抗体もしくはその抗原結合断片、モノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片、一価Ｆａｂ’、二価Ｆａｂ２、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、またはラクダ科動物抗体もしくはその抗原結合断片を含む、請求項２２～２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
前記ＰＭＯ分子が、少なくとも約１０～約３０ヌクレオチド長を含む、請求項２２～２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記ＰＭＯ分子が、リンカーを介して前記抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる、請求項２２～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】

前記リンカーが切断可能リンカーである、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記リンカーが切断不能リンカーである、請求項２６に記載の方法。
【請求項２９】
前記リンカーが、ヘテロ二官能性リンカー、ホモ二官能性リンカー、マレイミド基、ジペプチド部分、安息香酸基またはその誘導体、C_1－C_6アルキル基、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項２６に記載の方法。
【請求項３０】
前記ＰＭＯコンジュゲートが、約１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、または８：１の平均のＰＭＯ分子対抗体比（ＤＡＲ）を有する、請求項２２～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
前記ＰＭＯコンジュゲートが３．５～４．５の範囲の平均ＤＡＲを有する、請求項２２～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３２】
前記ＰＭＯコンジュゲートが７．５～８．５の範囲の平均ＤＡＲを有する、請求項２２～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
前記ＰＭＯコンジュゲートが約４の平均ＤＡＲを有する、請求項２２～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
前記ＰＭＯコンジュゲートが約８の平均ＤＡＲを有する、請求項２２～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
前記ＰＭＯコンジュゲートが非経口投与される、請求項２２～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
前記切断型ジストロフィンタンパク質が筋ジストロフィーを調節する、請求項２２～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記筋ジストロフィーが、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたはベッカー型筋ジストロフィーである、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
ＤＭＤ遺伝子の標的化ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導する方法であって、
ａ）筋細胞をホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）－抗体コンジュゲートと接触させる工程であって、前記ＰＭＯ－抗体コンジュゲートが、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片、および前記ＤＭＤ遺伝子の前記標的化ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のアクセプタスプライス部位、ドナースプライス部位、またはエクソンスプライスエンハンサ要素を標的化するＰＭＯ分子を含み、前記ＰＭＯ分子が、前記標的化ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導し、前記ＰＭＯ－抗体コンジュゲートが前記筋細胞中に優先的に送達される、工程と、
ｂ）前記標的化ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物に前記ＰＭＯ分子をハイブリダイズして、前記標的化ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導する工程と、
ｃ）工程ｂ）で処理された前記標的化ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物から産生したｍＲＮＡ転写物を前記筋細胞中で翻訳して、切断型ジストロフィンタンパク質を生成する工程とを含む方法。
【請求項３９】
前記抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片が、ヒト化抗体もしくはその抗原結合断片、キメラ抗体もしくはその抗原結合断片、モノクローナル抗体もしくはそ

の抗原結合断片、一価Ｆａｂ’、二価Ｆａｂ２、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、またはラクダ科動物抗体もしくはその抗原結合断片を含む、請求項３８に記載の方法。

【請求項４０】

前記ＰＭＯ分子が、少なくとも約１０～約３０ヌクレオチド長を含む、請求項３８または３９に記載の方法。

【請求項４１】

前記ＰＭＯ分子が、配列番号１００～１３３からなる群から選択される配列に対して少なくとも９０％、９５％、９９％、または１００％の配列同一性を含む、請求項３８～４０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４２】

前記ＰＭＯ分子がエクソン４４のアクセプタ部位を標的化する、請求項３８～４１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４３】

前記ＰＭＯ分子が、リンカーを介して前記抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる、請求項３８～４２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４４】

前記リンカーが切断可能リンカーである、請求項４３に記載の方法。

【請求項４５】

前記リンカーが切断不能リンカーである、請求項４３に記載の方法。

【請求項４６】

前記リンカーが、ヘテロ二官能性リンカー、ホモ二官能性リンカー、マレイミド基、ジペプチド部分、安息香酸基またはその誘導体、C_1－C_6アルキル基、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項４３に記載の方法。

【請求項４７】

ＰＭＯコンジュゲートが、約１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、またはそれ以上の平均のＰＭＯ対抗体比（ＤＡＲ）を有する、請求項３８～４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４８】

ＰＭＯコンジュゲートが、約１、２、３、４、５、６、７、８、またはそれ以上のＤＡＲを有する、請求項３８～４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４９】

ＰＭＯコンジュゲートが３．５～４．５の範囲の平均ＤＡＲを有する、請求項３８～４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５０】

ＰＭＯコンジュゲートが７．５～８．５の範囲の平均ＤＡＲを有する、請求項３８～４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５１】

ＰＭＯコンジュゲートが約４の平均ＤＡＲを有する、請求項３８～４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５２】

ＰＭＯコンジュゲートが約８の平均ＤＡＲを有する、請求項３８～４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５３】

ｉｎ　ｖｉｖｏ方法である、請求項３８～５２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５４】

エクソン４４スキッピングの誘導を必要とするＤＭＤ対象においてエクソン４４スキッピングを誘導する方法であって、配列番号１００～１３３からなる群から選択される配列を含むホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）分子にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含むＰＭＯコンジュ

ゲートを前記ＤＭＤ対象に投与する工程を含み、前記ＰＭＯ分子が、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のエクソン４４アクセプタスプライス部位にハイブリダイズし、前記ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導して、切断型ジストロフィンタンパク質をコードするｍＲＮＡ転写物を生成する、方法。

【請求項５５】

ジストロフィンの修復を必要とするＤＭＤ対象においてジストロフィンを修復する方法であって、配列番号１００～１３３からなる群から選択される配列を含むホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）分子にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含むＰＭＯコンジュゲートを前記ＤＭＤ対象に投与する工程を含み、前記ＰＭＯ分子が、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のエクソン４４アクセプタスプライス部位にハイブリダイズし、前記ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導して、切断型ジストロフィンタンパク質をコードするｍＲＮＡ転写物を生成する、方法。

【請求項５６】

切断型ジストロフィンタンパク質の生成を必要とするＤＭＤ対象において切断型ジストロフィンタンパク質を生成する方法であって、配列番号１００～１３３からなる群から選択される配列を含むホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）分子にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含むＰＭＯコンジュゲートを前記ＤＭＤ対象に投与する工程を含み、前記ＰＭＯ分子が、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のエクソン４４アクセプタスプライス部位にハイブリダイズし、前記ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導して、切断型ジストロフィンタンパク質をコードするｍＲＮＡ転写物を生成する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

相互参照

本出願は、２０２２年４月５日出願の米国仮特許出願第６３／３２７，７２５号に基づく利益を主張し、当該仮特許出願はその全体を参照することによって本明細書に援用される。

【背景技術】

【０００２】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）は、主に男児に発症するまれなＸ連鎖性神経筋疾患であり、世界中で出生した男性約１：５０００～１０，０００人に影響が及んでいる。ＤＭＤ患者は世界中に約３００，０００人存在する。ＤＭＤは単一遺伝子疾患であり、進行性、重度、かつ不可逆性である。本疾患は、ジストロフィンタンパク質（４３０ｋＤａ）をコードする、ヒトゲノム（７９エクソン）中で最長の遺伝子であるＤＭＤ遺伝子の変異によって生じる。ロッドドメインと呼ばれるジストロフィンの中心ドメインは、ショックアブソーバとして機能するとともに動作中に筋細胞を損傷から保護する、２４個のスペクトリンリピートによって形成される。

【０００３】

ＤＭＤは、ジストロフィン遺伝子内の変異（変化）によって生じる。１つまたは複数のエクソンの欠失が、最も一般的な種類の変異である。ジストロフィン遺伝子には計７９個のエクソンが存在するため、起こり得る様々な欠失が多く存在する。しかし、欠失を有する可能性が高い遺伝子の特定の領域が存在しており、これらの領域は「ホットスポット」と呼ばれる。ＤＭＤ遺伝子に生じる大きな遺伝子欠失の多くとともに非無作為的に分布するＤＭＤ遺伝子の欠失は、遺伝子の特定のホットスポット領域に検出することができる。これらのホットスポットは２つの主要な領域内でクラスタ化され、欠失の約２０％は遺伝子の５’近位部分（エクソン１、３、４、５、８、１３、１９）に生じ、欠失の約８０％は中間遠位領域、すなわち４２～４５、４７、４８、５０～５３に生じる（Ｄｅｎ　Ｄｕｎｎｅｎらによる Ａｍ　Ｊ　Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅｔ．１９８９；４５（６）：８３５～８４

７頁）。変異したＤＭＤ遺伝子は、いずれの機能性ジストロフィンも産生することができず、機能性ジストロフィンが欠如すると、筋肉の損傷、修復、炎症変化、および麻痺による進行性の筋力低下が生じる。

【０００４】

ＤＭＤ治療に対する現在の研究には、幹細胞置換療法、アナログ上方調節（ａｎａｌｏｇ　ｕｐ－ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ）、遺伝子置換、およびエクソンスキッピングの技法が含まれる。エクソンスキッピング技法では、細胞がＲＮＡスプライシング中に特定のエクソンをスキップするのに役立つアンチセンスオリゴヌクレオチドと呼ばれる、ＤＮＡの構造類似体が使用される。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ジストロフィン遺伝子がタンパク質産生のためにＲＮＡに転写されるとき、ジストロフィン遺伝子の欠陥部分がスキップされるのを可能にして、ジストロフィンタンパク質の切断型であるがより機能的なバージョンが筋細胞によって産生されるのを可能にする。

【０００５】

エクソン４５、５１、または５３スキッピングに順応するＤＭＤ患者に既に承認されているアンチセンスオリゴヌクレオチドがいくつか存在する。エテプリルセンと名付けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ジストロフィンエクソン５１スキッピングに適した変異の処置用に米国で承認されている。ゴロディルセンと名付けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ジストロフィン転写物のエクソン５３をスキップすることにより利益を得ることが可能な症例の処置用に、２０１９年に米国で医療用途のために承認された。Ｃａｓｉｍｅｒｓｅｎと名付けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、エクソン４５スキッピングに適したＤＭＤ遺伝子変異が確認された患者に対する処置用に、２０２１年２月に米国で承認された。

【０００６】

エクソン４４に対しエクソンスキッピングを使用した研究が広く行われてきたにもかかわらず（米国特許第９，４４７，４１７号明細書、米国特許第８，４６１，３２５号明細書、および米国特許第８，３６１，９７９号明細書）、現在、エクソン４４スキッピングに適したＤＭＤ患者に対するＦＤＡ承認を受けたエクソンスキッピング療法は存在しない。ＤＭＤ患者集団の約６％はエクソン４４スキッピングに適しており、これらＤＭＤ患者の大多数はさらにＤＭＤ転写物のエクソン４５が欠失している場合もある。

【０００７】

抗体オリゴヌクレオチドコンジュゲート（ＡＯＣ）と呼ばれる新たなクラスの治療薬が、アンチセンスオリゴヌクレオチドの送達を改善する。これらＡＯＣは、アンチセンスオリゴヌクレオチドを標的として、筋細胞を含む特定の組織および細胞型に送達する。これらＡＯＣは、エクソン４４スキッピングに適した患者を含むＤＭＤ患者に対する画期的な治療候補のために開発されている。エクソン４４スキッピングに適したＤＭＤ患者に対する治療を提供する必要がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【特許文献１】米国特許第９，４４７，４１７号明細書

【特許文献２】米国特許第８，４６１，３２５号明細書

【特許文献３】米国特許第８，３６１，９７９号明細書

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Ｄｅｎ　ＤｕｎｎｅｎらによるＡｍ　Ｊ　Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅｔ．１９８９；４５（６）：８３５～８４７頁

【発明の概要】

【００１０】

本明細書中のある特定の態様では、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）分子にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原

結合断片を含むＰＭＯコンジュゲートであって、ＰＭＯ分子が配列番号１００～１３３からなる群から選択される配列を含む、ＰＭＯコンジュゲートが開示される。一部の態様では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のアクセプタスプライス部位、ドナースプライス部位、またはエクソンスプライスエンハンサ要素にハイブリダイズし、ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導して、切断型ＤＭＤタンパク質をコードするｍＲＮＡ転写物を生成する。一部の態様では、ＰＭＯ分子は、少なくとも約１０～約３０ヌクレオチド長を含む。一部の態様では、ＰＭＯ分子は筋細胞中に送達される。一部の態様では、ＰＭＯ分子は、ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物中でＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のエクソン４４アクセプタスプライス部位にハイブリダイズして、切断型ジストロフィンタンパク質をコードするｍＲＮＡ転写物を生成する。一部の態様では、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片は、ヒト化抗体もしくはその抗原結合断片、キメラ抗体もしくはその抗原結合断片、モノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片、一価Ｆａｂ’、二価Ｆａｂ２、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、またはラクダ科動物抗体もしくはその抗原結合断片を含む。一部の態様では、ＰＭＯ分子は、リンカーを介して抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の態様では、リンカーは、切断可能リンカーである。一部の態様では、リンカーは、切断不能リンカーである。一部の態様では、リンカーは、ヘテロ二官能性リンカー、ホモ二官能性リンカー、マレイミド基、ジペプチド部分、安息香酸基またはその誘導体、Ｃ１－Ｃ６アルキル基、およびそれらの組合せからなる群から選択される。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、約１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、またはそれ以上のＰＭＯ分子対抗体比（ＤＡＲ）を有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、約１、２、３、４、５、６、７、８、またはそれ以上の平均ＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、３．５～４．５の範囲の平均ＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、７．５～８．５の範囲の平均ＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、約４の平均ＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、約８の平均ＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、約４のＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、約８のＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、非経口投与用に製剤化される。一部の態様では、切断型ジストロフィンタンパク質は、筋ジストロフィーを調節する。一部の態様では、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたはベッカー型筋ジストロフィーである。

【００１１】

また本明細書中のある特定の態様では、筋ジストロフィーの処置を必要とする対象において筋ジストロフィーを処置する方法であって、配列番号１００～１３３からなる群から選択される配列を含むホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）分子にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含むＰＭＯコンジュゲートを対象に投与する工程を含み、ＰＭＯ分子が、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のアクセプタスプライス部位、ドナースプライス部位、またはエクソンスプライスエンハンサ要素にハイブリダイズし、ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導して、切断型ジストロフィンタンパク質をコードするｍＲＮＡ転写物を生成する、方法も開示される。一部の態様では、ＰＭＯ分子は筋細胞中に送達される。一部の態様では、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片は、ヒト化抗体もしくはその抗原結合断片、キメラ抗体もしくはその抗原結合断片、モノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片、一価Ｆａｂ’、二価Ｆａｂ２、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、またはラクダ科動物抗体もしくはその抗原結合断片を含む。一部の態様では、ＰＭＯ分子は、少なくとも約１０～約３０ヌクレオチド長を含む。一部の態様では、ＰＭＯ分子は、リンカーを介して抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の態様では、リンカーは、切断可能リンカーである。一部の例では、リンカーは、切

断不能リンカーである。一部の態様では、リンカーは、ヘテロ二官能性リンカー、ホモ二官能性リンカー、マレイミド基、ジペプチド部分、安息香酸基またはその誘導体、Ｃ１－Ｃ６アルキル基、およびそれらの組合せからなる群から選択される。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、約１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、または８：１の平均のＰＭＯ分子対抗体比（ＤＡＲ）を有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、３．５～４．５の範囲の平均ＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、７．５～８．５の範囲の平均ＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、約４の平均ＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、約８の平均ＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、非経口投与される。一部の態様では、切断型ジストロフィンタンパク質は、筋ジストロフィーを調節する。一部の態様では、筋ジストロフィーは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたはベッカー型筋ジストロフィーである。

【００１２】

また本明細書中のある特定の態様では、ＤＭＤ遺伝子の標的化ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導する方法であって、（ａ）筋細胞をホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）－抗体コンジュゲートと接触させる工程であって、ＰＭＯ－抗体コンジュゲートが、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片、およびＤＭＤ遺伝子の標的化ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のアクセプタスプライス部位、ドナースプライス部位、またはエクソンスプライスエンハンサ要素を標的化するＰＭＯ分子を含み、ＰＭＯ分子が、標的化ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導し、ＰＭＯ－抗体コンジュゲートが筋細胞中に優先的に送達される、工程と、（ｂ）標的化ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にＰＭＯ分子をハイブリダイズして、標的化ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導する工程と、（ｃ）工程（ｂ）で処理された標的化ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物から産生したｍＲＮＡ転写物を筋細胞中で翻訳して、切断型ジストロフィンタンパク質を生成する工程とを含む方法も開示される。一部の態様では、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片は、ヒト化抗体もしくはその抗原結合断片、キメラ抗体もしくはその抗原結合断片、モノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片、一価Ｆａｂ’、二価Ｆａｂ２、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、またはラクダ科動物抗体もしくはその抗原結合断片を含む。一部の態様では、ＰＭＯ分子は、少なくとも約１０～約３０ヌクレオチド長を含む。一部の態様では、ＰＭＯ分子は、配列番号１００～１３３からなる群から選択される配列に対して少なくとも９０％、９５％、９９％、または１００％の配列同一性を含む。一部の態様では、ＰＭＯ分子は、エクソン４４のアクセプタ部位を標的化する。一部の態様では、ＰＭＯ分子は、リンカーを介して抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の態様では、リンカーは、切断可能リンカーである。一部の態様では、リンカーは、切断不能リンカーである。一部の態様では、リンカーは、ヘテロ二官能性リンカー、ホモ二官能性リンカー、マレイミド基、ジペプチド部分、安息香酸基またはその誘導体、Ｃ１－Ｃ６アルキル基、およびそれらの組合せからなる群から選択される。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、約１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、またはそれ以上の平均のＰＭＯ対抗体比（ＤＡＲ）を有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、約１、２、３、４、５、６、７、８、またはそれ以上のＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、３．５～４．５の範囲の平均ＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、７．５～８．５の範囲の平均ＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、約４の平均ＤＡＲを有する。一部の態様では、ＰＭＯコンジュゲートは、約８の平均ＤＡＲを有する。一部の態様では、本方法は、ｉｎｖｉｖｏ方法である。

【００１３】

また本明細書中のある特定の態様では、エクソン４４スキッピングの誘導を必要とするＤＭＤ対象においてエクソン４４スキッピングを誘導する方法であって、配列番号１００

～１３３からなる群から選択される配列を含むホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）分子にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含むＰＭＯコンジュゲートをＤＭＤ対象に投与する工程を含み、ＰＭＯ分子が、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のエクソン４４アクセプタスプライス部位にハイブリダイズし、ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導して、切断型ジストロフィンタンパク質をコードするｍＲＮＡ転写物を生成する、方法も開示される。

【００１４】

また本明細書中のある特定の態様では、ジストロフィンの修復を必要とするＤＭＤ対象においてジストロフィンを修復する方法であって、配列番号１００～１３３からなる群から選択される配列を含むホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）分子にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含むＰＭＯコンジュゲートをＤＭＤ対象に投与する工程を含み、ＰＭＯ分子が、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のエクソン４４アクセプタスプライス部位にハイブリダイズし、ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導して、切断型ジストロフィンタンパク質をコードするｍＲＮＡ転写物を生成する、方法も開示される。

【００１５】

また本明細書中のある特定の態様では、切断型ジストロフィンタンパク質の生成を必要とするＤＭＤ対象において切断型ジストロフィンタンパク質を生成する方法であって、配列番号１００～１３３からなる群から選択される配列を含むホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）分子にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含むＰＭＯコンジュゲートをＤＭＤ対象に投与する工程を含み、ＰＭＯ分子が、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物のエクソン４４アクセプタスプライス部位にハイブリダイズし、ｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物にエクソン４４スキッピングを誘導して、切断型ジストロフィンタンパク質をコードするｍＲＮＡ転写物を生成する、方法も開示される。

【図面の簡単な説明】

【００１６】

【図１】２５－ｍｅｒおよび３０－ｍｅｒのホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（ＰＭＯ）に応じたエクソン４４スキッピング活性の予測値をエクソン４４スキッピングの実験値と比較するプロットである。

【図２】ヒト不死化筋芽細胞における１２個の異なる３０ｍｅｒ　ＰＭＯの濃度上昇に応じたエクソン４４スキッピングの相対レベルに関する用量応答曲線のプロットである。

【図３】３種の異なるＰＭＯ：ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６、ｈＥｘ４４＿Ａｃ５＿２７、およびｈＥｘ４４＿Ａｃ４＿２８の濃度上昇に応じたエクソン４４スキッピングの相対レベルに関する用量応答曲線のプロットである。

【図４Ａ】筋管細胞中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたエクソン４４スキッピングの相対レベルに関する用量応答曲線のプロットを図示する。図４Ａは、健常な初代細胞および不死化細胞中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたエクソン４４スキッピングの相対レベルに関する用量応答曲線のプロットである。

【図４Ｂ】筋管細胞中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたエクソン４４スキッピングの相対レベルに関する用量応答曲線のプロットを図示する。図４Ｂは、ＤＭＤ患者に由来するＤＭＤ初代細胞中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたエクソン４４スキッピングの相対レベルに関する用量応答曲線のプロットである。

【図４Ｃ】筋管細胞中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたエクソン４４スキッピングの相対レベルに関する用量応答曲線のプロットを図示する。図４Ｃは、ＤＭＤ不死化細胞中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたエクソン４４スキッピングの相対レベルに関する用量応答曲線のプロットである。

【図５Ａ】ＤＭＤ患者由来の培養筋管中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたジストロフィンタンパク質のレベルを示す図である。図５Ａは、健常なヒト細胞、および

ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６を形質移入したＤＭＤ患者由来の培養筋管におけるジストロフィン陽性線維の免疫蛍光染色の写真を図示する。
【図５Ｂ】ＤＭＤ患者由来の培養筋管中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたジストロフィンタンパク質のレベルを示す図である。図５Ｂは、ＤＭＤ患者由来の培養筋管中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じた、免疫蛍光染色により定量化されたジストロフィンの相対レベルに関する用量応答曲線のプロットである。
【図５Ｃ】ＤＭＤ患者由来の培養筋管中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたジストロフィンタンパク質のレベルを示す図である。図５Ｃは、健常患者およびＤＭＤ患者由来の培養筋管中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたジストロフィンタンパク質のレベルを、Ｊｅｓｓ　ｃａｐｉｌｌａｒｙアッセイによって定量化する棒グラフである。
【図６Ａ】非ヒト霊長類筋管中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたエクソン４４スキッピングの相対レベルに関する用量応答のプロットである。図６Ａは、非ヒト霊長類筋管中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたエクソン４４スキッピングの相対レベルに関する用量応答曲線のプロットである。
【図６Ｂ】非ヒト霊長類筋管中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたエクソン４４スキッピングの相対レベルに関する用量応答のプロットである。図６Ｂは、非ヒト霊長類筋管中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたエクソン４４スキップコピーの数を定量化する棒グラフである。
【図６Ｃ】非ヒト霊長類筋管中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇に応じたエクソン４４スキッピングの相対レベルに関する用量応答のプロットである。図６Ｃは、非ヒト霊長類筋管中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６の濃度上昇の存在下におけるジストロフィンコピーの総数を定量化する棒グラフである。
【図７】ＥＬＩＳＡによるトランスフェリン受容体に対するＤＡＲ８　ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６　ＡＯＣまたは非修飾抗トランスフェリン受容体モノクローナル抗体の結合アッセイを図示するグラフである。
【図８】０日目に１５９．９ｍｇ／ｋｇの用量でｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣを単回注入されたカニクイザルから４３／４４日目に得た筋肉組織および非筋肉組織中のエクソン４４スキップコピーの数を図示する棒グラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１７】
本明細書中の一部の態様では、筋ジストロフィーの処置のための抗体－ポリ核酸コンジュゲート組成物が開示される。また本明細書中の一部の態様では、筋ジストロフィーの処置を必要とする対象において、不正確にスプライシングされたＤＭＤ　ｍＲＮＡ転写物によって生じる筋ジストロフィーを処置する方法であって、抗体－ポリ核酸コンジュゲートを対象に投与する工程を含み、抗体－ポリ核酸コンジュゲートが、不正確にスプライシングされたｐｒｅ－ｍＲＮＡジストロフィー転写物に変化を誘導することで、ＤＭＤ　ｍＲＮＡ転写物のエクソン４４スキッピングを誘導して、完全に処理されたＤＭＤ　ｍＲＮＡ転写物を生成し、完全に処理されたＤＭＤ　ｍＲＮＡ転写物が、機能的で切断型のジストロフィンタンパク質をコードし、それによって対象の疾患または障害を処置する、方法が開示される。本明細書で使用される場合、「ポリ核酸」という用語は、「オリゴヌクレオチド」という用語と互換的に使用される。
【００１８】
本明細書中の一部の態様では、筋ジストロフィーの処置のための抗体－アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）コンジュゲート組成物または抗体－ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（ＰＭＯ）コンジュゲート組成物が開示される。また本明細書には、筋ジストロフィーの処置を必要とする対象において、不正確にスプライシングされたＤＭＤ　ｍＲＮＡ転写物によって生じる筋ジストロフィーを処置する方法であって、抗体－ＡＳＯコンジュゲートまたは抗体－ＰＭＯコンジュゲートを対象に投与する工程を含み、ＡＳＯまたはＰＭＯが、不正確にスプライシングされたｐｒｅ－ｍＲＮＡジストロフィー転

写物に変化を誘導することで、ＤＭＤ　ｍＲＮＡ転写物のエクソン４４スキッピングを誘導して、完全に処理されたＤＭＤ　ｍＲＮＡ転写物を生成し、完全に処理されたＤＭＤ　ｍＲＮＡ転写物が、機能的で切断型のジストロフィンタンパク質をコードし、それによって対象の疾患または障害を処置する、方法が開示される。

【００１９】

一部の例では、抗体－ポリ核酸コンジュゲートが使用される１つの分野は、筋ジストロフィーを処置するための分野である。筋ジストロフィーは、筋肉に影響を及ぼすいくつかの疾患を包含する。デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、重度の筋ジストロフィー形態であり、ＤＭＤ遺伝子の変異によって生じる。一部の例では、ＤＭＤ遺伝子の変異は、翻訳リーディングフレームを破壊して、非機能的ジストロフィンタンパク質をもたらす。

【００２０】

本明細書中のある特定の態様では、翻訳リーディングフレームを修復するために使用される、不正確にスプライシングされたｍＲＮＡ転写物における挿入、欠失、重複、または変化を誘導してエクソンスキッピングまたはエクソン包含を誘導する核酸療法に関連する方法および組成物が記載される。また本明細書中の一部の態様では、不正確に処理されたｍＲＮＡ転写物を特徴とする疾患または障害を処置するための方法および組成物であって、エクソンの除去後、ｍＲＮＡが機能的タンパク質をコードすることができ、それによって疾患または障害を処置する、方法および組成物も記載される。本明細書中のさらなる態様では、筋ジストロフィーを処置するための医薬組成物およびキットも含まれる。

【００２１】

ＲＮＡ処理

ＲＮＡは、遺伝子発現および細胞生理学の調節において中心的な役割を有する。ＲＮＡの適切な処理が、機能的タンパク質の翻訳に重要である。ＲＮＡの不正確なスプライシングの結果などによりＲＮＡ処理が変化すると、疾患が生じるおそれがある。例えば、スプライス部位での変異は、早期終止コドンの露出、エクソンの喪失、またはイントロンの包含を引き起こす。一部の例では、ＲＮＡ処理の変化は、挿入、欠失、または重複をもたらす。一部の例では、ＲＮＡ処理の変化は、エクソンの挿入、欠失、または重複をもたらす。ＲＮＡ処理の変化は、場合によりイントロンの挿入、欠失、または重複をもたらす。

【００２２】

エクソンスキッピング

本明細書で使用される場合、「ｐｒｅ－ｍＲＮＡ」という用語は、エクソン（コード配列）およびイントロン（非コード配列）の両方で構成される転写産物を指す。エクソンスキッピングは、ＲＮＡスプライシングの形態である。場合により、エクソンスキッピングは、エクソンがｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物上でスキップされるか、または処理されたｍＲＮＡからスプライシングされる場合に生じる。エクソンスキッピングの結果、処理されたｍＲＮＡは、スキップされたエクソンを含有しない。一部の例では、エクソンスキッピングは、変化した転写物および／またはｍＲＮＡ産物の発現をもたらす。例えば、エクソン４４スキッピングは、エクソン４４がｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物中でスキップされるか、または処理されたＤＭＤ　ｍＲＮＡからスプライシングされる場合に生じる。エクソン４４スキッピングの結果、処理されたＤＭＤ　ｍＲＮＡは、スキップされたエクソン４４を含有しない。一部の例では、エクソン４４スキッピングは、切断型ジストロフィンタンパク質の発現をもたらす。一部の例では、エクソン４４スキッピングは、機能的ジストロフィンタンパク質の発現をもたらす。一部の例では、エクソン４４スキッピングは、切断型・機能的ジストロフィンタンパク質の発現をもたらす。

【００２３】

一部の例では、モルホリノまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）－抗体コンジュゲート（ＰＭＯ－ＡＯＣ）は、エクソンスキッピングを誘導するために使用される。一部の例では、モルホリノまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）－抗体コンジュゲートは、（例えば、細胞に、好ましくは筋細胞などに）エクソンスキッピングを誘導するためのＰＭＯを送達するために使用され

る。一部の例では、送達されたＰＭＯは、エクソンスキッピングを誘導するために使用される。例えばＰＭＯは、スプライス部位またはエクソンエンハンサに結合する。一部の例では、特定のｍＲＮＡまたはｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列にＰＭＯが結合すると、二本鎖領域が生成される。一部の例では、ＰＭＯは、エクソンの開始点および／または終了点においてアクセプタまたはドナースプライス部位に結合する。一部の例では、モルホリノまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）－抗体コンジュゲートは、エクソン４４スキッピングを誘導するために使用される。一部の例では、モルホリノまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）－抗体コンジュゲートは、エクソン４４スキッピングを誘導するためのＰＭＯを送達するために使用される。送達されたＰＭＯは、エクソン４４スキッピングを誘導するために使用される。例えば送達されたＰＭＯは、エクソン４４のスプライス部位またはエクソンエンハンサのうち少なくとも１つに結合する。一部の例では、特定のｍＲＮＡまたはｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列にＰＭＯが結合すると、二本鎖領域が生成される。一部の例では、ＰＭＯは、エクソン４４の開始点および／または終了点においてアクセプタまたはドナースプライス部位に結合する。一部の例では、ＰＭＯは、エクソン４４の開始点においてアクセプタスプライス部位に結合する。一部の例では、ＰＭＯは、エクソン４４の開始点においてドナースプライス部位に結合する。一部の例では、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＯＮ、ＡＳＯ）は、エクソンスキッピングを誘導するために使用される。本明細書で使用される場合、「ＡＯＮ」という用語は、「ＡＳＯ」という用語と互換的に使用され、ともにアンチセンスオリゴヌクレオチドを指す。一部の例では、ＡＯＮは、特定のｍＲＮＡまたはｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列に結合する短い核酸配列である。例えばＡＯＮは、スプライス部位またはエクソンエンハンサに結合する。一部の例では、特定のｍＲＮＡまたはｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列にＡＯＮが結合すると、二本鎖領域が生成される。一部の例では、二本鎖領域の形成は、スプライセオソームまたはスプライセオソームに関連するタンパク質が順当にエクソンに結合してエクソンをスキップさせる部位で生じる。一部の例では、エクソンのスキッピングは、転写リーディングフレームの修復をもたらし、少なくとも部分的に機能的なジストロフィンタンパク質の産生を可能にする。

【００２４】

適応症

一部の態様では、本明細書に記載のポリ核酸分子（オリゴヌクレオチド、例えば、ＰＭＯ、ＡＳＯなど）または当該ポリ核酸分子を含む医薬組成物は、欠損ｍＲＮＡを特徴とする疾患または障害の処置に使用される。一部の態様では、本明細書に記載のポリ核酸分子（オリゴヌクレオチド、例えば、ＰＭＯ、ＡＳＯなど）または当該ポリ核酸分子を含む医薬組成物は、不正確にスプライシングされたｍＲＮＡ転写物に挿入、欠失、重複、または変化を誘導してエクソンスキッピングまたはエクソン包含を誘導することによって疾患または障害を処置するために使用される。

【００２５】

大部分のヒトタンパク質コード遺伝子が代替的にスプライシングされる。一部の例では、変異は、不適切にスプライシングされたか、または部分的にスプライシングされたｍＲＮＡをもたらす。例えば変異は、タンパク質コード遺伝子中のスプライス部位、サイレンサもしくはエンハンサ配列、エクソン配列、またはイントロン配列のうち少なくとも１つに存在し得る。一部の例では、変異は遺伝子機能不全をもたらす。一部の例では、変異は、疾患または障害をもたらす。

【００２６】

不適切にスプライシングされたか、または部分的にスプライシングされたｍＲＮＡは、一部の例では神経筋疾患または障害を生じさせる。例示的な神経筋疾患としては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面肩甲骨上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、または筋緊張性ジストロフィーなどの筋ジストロフィーが挙げられる。一部の例では、筋ジストロフィーは遺伝性である。一部の例では、筋ジストロフィーは、自然突然変異によって生じる。ベッカー型筋ジストロフィーおよびデュ

シェンヌ型筋ジストロフィーは、タンパク質ジストロフィンをコードするＤＭＤ遺伝子中の変異を含むと示されている。

【００２７】

一部の例では、不適切にスプライシングされたか、または部分的にスプライシングされたｍＲＮＡは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを生じさせる。デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、重度の筋力低下をもたらし、機能的ジストロフィンの産生を消失させるＤＭＤ遺伝子中の変異によって生じる。一部の例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、ＤＭＤ遺伝子のエクソン４４における変異の結果である。一部の例では、複数のエクソンが変異／欠失する。例えばエクソン４４および４５の変異が、デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者に共通する。一部の例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、エクソン４４の変異の結果である。一部の例では、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、エクソン４４の変異およびエクソン４５の欠失の結果である。

【００２８】

一部の例では、本明細書に記載されるポリ核酸－抗体コンジュゲートまたは当該ポリ核酸－抗体コンジュゲートを含む医薬組成物は、筋ジストロフィーの処置に使用される。一部の例では、本明細書に記載されるポリ核酸－抗体コンジュゲートまたは当該ポリ核酸－抗体コンジュゲートを含む医薬組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、または筋緊張性ジストロフィーの処置に使用される。一部の例では、本明細書に記載されるポリ核酸－抗体コンジュゲートまたは当該ポリ核酸－抗体コンジュゲートを含む医薬組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの処置に使用される。一部の例では、本明細書に記載されるＰＭＯ－抗体コンジュゲートまたは当該ＰＭＯ－抗体コンジュゲートを含む医薬組成物は、筋ジストロフィーの処置においてエクソン４４スキッピングを誘導するために使用される。一部の例では、本明細書に記載されるＰＭＯ－抗体コンジュゲートまたは当該ＰＭＯ－抗体コンジュゲートを含む医薬組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたはベッカー型筋ジストロフィーの処置においてエクソン４４スキッピングを誘導するために使用される。一部の例では、本明細書に記載されるＰＭＯ－抗体コンジュゲートまたは当該ＰＭＯ－抗体コンジュゲートを含む医薬組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの処置においてエクソン４４スキッピングを誘導するために使用される。

【００２９】

抗体－ポリ核酸コンジュゲート

一部の態様では、抗体は、ポリ核酸分子にコンジュゲートされる。ポリ核酸分子は、ＡＳＯまたはＰＭＯであり得る。一部の例では、１つまたは複数のポリ核酸分子はＰＭＯである。抗体は、抗トランスフェリン受容体（抗ＣＤ７１）抗体またはその抗原結合断片であり得る。一部の態様では、抗体は、非特異的にポリ核酸分子にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、リシン残基を介してポリ核酸分子にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、システイン残基を介してポリ核酸分子にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、非部位特異的にリシン残基またはシステイン残基を介してポリ核酸分子にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、非部位特異的にリシン残基、例えば、抗体に存在するリシン残基を介してポリ核酸分子にコンジュゲートされる。場合により、抗体は、非部位特異的にシステイン残基、例えば、抗体に存在するシステイン残基を介してポリ核酸分子にコンジュゲートされる。

【００３０】

一部の態様では、抗体は、部位特異的にポリ核酸分子にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、リシン残基を介して、システイン残基を介して、５’末端において、３’末端において、非天然アミノ酸を介して、または酵素修飾残基もしくは酵素触媒型残基を介して、部位特異的にポリ核酸分子にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、リシン残基（例えば、部位特異的に抗体に存在するリシン残基）を介してポリ核酸分子にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、システイン残基（例えば、部位特異的に抗体に存在するシステイン残基）を介してポリ核酸分子にコンジュゲートされる。一部の例

では、抗体は、部位特異的に５’末端においてポリ核酸分子にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、部位特異的に３’末端においてポリ核酸分子にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、部位特異的に非天然アミノ酸を介してポリ核酸分子にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、部位特異的に酵素修飾残基または酵素触媒残基を介してポリ核酸分子にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、リンカーまたは１つもしくは複数のリンカーを介してポリ核酸分子にコンジュゲートされる。

【００３１】

一部の態様では、１つまたは複数のポリ核酸分子が抗体にコンジュゲートされる。１つまたは複数のポリ核酸分子は、ＡＳＯまたはＰＭＯであり得る。一部の例では、１つまたは複数のポリ核酸分子はＰＭＯである。抗体は、抗トランスフェリン受容体（抗ＣＤ７１）抗体またはその抗原結合断片であり得る。一部の例では、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６個、またはそれ以上のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約１個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約２個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約３個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約４個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約５個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約６個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約７個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約８個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約９個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約１０個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約１１個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約１２個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約１３個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約１４個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約１５個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、約１６個のポリ核酸分子が、１個の抗体にコンジュゲートされる。場合により、１つまたは複数のポリ核酸分子は同じものである。他の場合、１つまたは複数のポリ核酸分子は異なるものである。

【００３２】

一部の態様では、抗体にコンジュゲートされるポリ核酸分子の数は、一定の比を形成する。一部の例では、この比はＤＡＲ（薬物対抗体）比と称され、ここで言及される薬物はポリ核酸分子である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、またはそれ以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体ＡのＤＡＲ比は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、またはそれ以上である。一部の例では、ＤＡＲ比は、ＤＡＲ比の整数に加え、分数または小数も含む。例えばＤＡＲ比の分数または小数は、Ｘ．１、Ｘ．２、Ｘ．３、Ｘ．４、Ｘ．５、Ｘ．６、Ｘ．７、Ｘ．８、Ｘ．９（例えば、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９など）を含む。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約２以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約３以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約４以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約５以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約６以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約７以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約８以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約９以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１０以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１１以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１２以上である。

【００３３】

一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、または１６である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約２である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約３である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約４である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約５である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約６である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約７である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約８である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約９である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１０である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１１である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１２である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１３である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１４である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１５である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１６である。

【００３４】

一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、または１６である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、１である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、２である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、４である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、６である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、８である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、１２である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、１６である。

【００３５】

一部の態様では、組成物は、複数の抗体－ポリ核酸コンジュゲートを含む。一部の例では、抗体にコンジュゲートされるポリ核酸分子の数は、一定の比を形成する。一部の例では、この比はＤＡＲ（薬物対抗体）比と称され、ここで言及される薬物はポリ核酸分子である。一部の例では、組成物中の複数の抗体－ポリ核酸コンジュゲートは、同じＤＡＲ比を有する。一部の例では、組成物中の複数の抗体－ポリ核酸コンジュゲートは、異なるＤＡＲ比を有する。一部の例では、組成物中の抗体－ポリ核酸コンジュゲートのうち少なくとも２つは、互いに異なるＤＡＲ比を有する。一部の例では、ＤＡＲ比は、組成物中の複数の抗体－ポリ核酸コンジュゲートのＤＡＲ比の平均数である平均ＤＡＲ（薬物対抗体）比である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、またはそれ以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、およそ１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、またはそれ以上である。一部の例では、平均ＤＡＲ比は、ＤＡＲ比の整数に加え、分数または小数も含む。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約２以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約３以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約４以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約５以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約６以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約７以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約８以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約９以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１０以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１１以上である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１２以上である。

【００３６】

一部の例では、ポリ核酸分子対抗体Ａの平均ＤＡＲ比は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、または１６である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体

の平均ＤＡＲ比は、約２である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約３である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約４である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約５である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約６である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約７である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約８である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約９である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１０である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１１である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１２である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１３である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１４である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、約１５である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１６である。

【００３７】

一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、または１６である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、１である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、２である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、４である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、６である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、８である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、１２である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、１６である。

【００３８】

一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、１．５～２．５、２．５～３．５、３．５～４．５、４．５～５．５、５．５～６．５、６．５～７．５、７．５～８．５、８．５～９．５、９．５～１０．５、１０．５～１１．５、１１．５～１２．５、１２．５～１３．５、１３．５～１４．５、１４．５～１５．５、１５．５～１６．５、または１６．５～１７．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体Ａの平均ＤＡＲ比は、１．５～２．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、２．５～３．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、３．５～４．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、４．５～５．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、５．５～６．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、６．５～７．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、７．５～８．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、８．５～９．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、９．５～１０．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、１０．５～１１．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体Ａの平均ＤＡＲ比は、１１．５～１２．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、１２．５～１３．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、１３．５～１４．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、１４．５～１５．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体のＤＡＲ比は、１５．５～１６．５の範囲である。一部の例では、ポリ核酸分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、１６．５～１７．５の範囲である。

【００３９】

一部の例では、ポリ核酸分子および抗体を含むコンジュゲートは、ポリ核酸分子を含むが抗体を含まないコンジュゲートと比較して活性が改善されている。一部の例では、活性が改善すると、生物学的に関連する機能の向上、例えば、疾患状態の処置または予防における安定性、親和性、結合性、機能活性、および有効性の改善が生じる。場合により、疾患状態は、遺伝子の１つまたは複数のエクソンが変異した結果である。一部の例では、ポリ核酸分子および抗体を含むコンジュゲートは、ポリ核酸分子を含むが抗体を含まないコ

ンジュゲートと比較して、１つまたは複数の変異したエクソンのエクソンスキッピングを増加させる。一部の例では、エクソンスキッピングは、ポリ核酸分子および抗体Ａを含むコンジュゲートでは、ポリ核酸分子を含むが抗体を含まないコンジュゲートと比較して少なくともまたは約５％、１０％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９５％、またはそれ以上増加する。

【００４０】

ＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子

一部の態様では、ポリ核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）分子またはＰＭＯ分子である。一部の態様では、抗体－ポリ核酸コンジュゲートは、ＡＳＯ－抗体コンジュゲートである。一部の態様では、抗体－ポリ核酸コンジュゲートは、ＰＭＯ－抗体コンジュゲートである。一部の態様では、本明細書に記載のＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子は、エクソン４４スキッピングを誘導して、不正確にスプライシングされたｍＲＮＡ転写物に変化を誘導する。一部の例では、ＰＭＯ分子は、不正確にスプライシングされたｍＲＮＡ転写物を変化させることによって、ジストロフィンタンパク質の翻訳リーディングフレームを修復する。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ジストロフィンタンパク質の翻訳リーディングフレームを修復することによって、機能的・切断型ジストロフィンタンパク質をもたらす。

【００４１】

一部の態様では、ポリ核酸分子は、目的の部位に送達するために抗体にコンジュゲートされる。場合により、ＰＭＯ分子が抗体にコンジュゲートされる。場合により、ＰＭＯ分子は、目的の部位に送達するために抗体にコンジュゲートされる。

【００４２】

一部の態様では、ＰＭＯ分子は、筋細胞に送達するために抗体にコンジュゲートされる。場合により、エクソン４４をスキップするためのＰＭＯ分子が抗体にコンジュゲートされる。場合により、エクソン４４をスキップするためのＰＭＯ分子は、筋細胞に送達するために抗体にコンジュゲートされる。

【００４３】

一部の例では、抗体は、少なくとも１つのＰＭＯ分子にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、少なくとも１つのＰＭＯ分子にコンジュゲートされることでＰＭＯ－抗体コンジュゲートを形成する。一部の態様では、抗体は、ＰＭＯ分子の５’末端、ＰＭＯ分子の３’末端、ＰＭＯ分子上の内部部位、またはそれらのあらゆる組合せにコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、少なくとも２個のＰＭＯ分子にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、またはそれ以上のＰＭＯ分子にコンジュゲートされる。

【００４４】

一部の例では、ＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列を標的とし、それにハイブリダイズする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列のエクソン４４のスプライス部位を標的とし、それをハイブリダイズする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列のエクソン４４のシス調節要素を標的とし、それをハイブリダイズする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列のエクソンのトランス調節要素を標的とし、それをハイブリダイズする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列のエクソン４４のエクソンスプライスエンハンサまたはイントロンスプライスエンハンサを標的とする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列のエクソン４４のエクソンスプライスサイレンサまたはイントロンスプライスサイレンサを標的とし、それをハイブリダイズする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列のエクソン４４のアクセプタ部位を標的とし、それにハイブリダイズする。

【００４５】

一部の例では、ＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－

ｍＲＮＡ配列のイントロンまたはエクソンに見られる配列を標的とし、それをハイブリダイズする。例えばＰＭＯ分子は、エクソンのスプライシングを媒介するＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列のエクソン４４に見られる配列を標的とし、それにハイブリダイズする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列のエクソン認識配列を標的とする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列のエクソンの上流にある配列を標的とする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列のエクソンの下流にある配列を標的とする。

【００４６】

上述のように、ＰＭＯ分子は、神経筋疾患または障害をもたらす不正確に処理されたｍＲＮＡ転写物を標的とする。場合により、神経筋疾患または障害は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたはベッカー型筋ジストロフィーである。

【００４７】

一部の例では、ポリ核酸分子（例えば、ＰＭＯ分子、アンチセンスオリゴヌクレオチドなど）は、変異したエクソンに隣接する領域（配列）を標的化する。別の例では、エクソン４４に変異がある場合、ポリ核酸分子は、エクソン４４がスキップされるようにＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列のエクソン４４中の配列（例えば、エクソン４４内の領域）を標的化する。

【００４８】

場合により、本明細書に記載のポリ核酸分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列のエクソン４４のエクソン－イントロン接合部にある領域を標的化する。場合により、本明細書に記載のポリ核酸分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ配列のエクソン４４のエクソン－イントロン接合部にある領域を標的化する。

【００４９】

一部の例では、ＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４の５’イントロン－エクソン接合部または３’エクソン－イントロン接合部のいずれかにある標的領域にハイブリダイズする。

【００５０】

場合により、ポリ核酸分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４の５’イントロン－エクソン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。

【００５１】

場合により、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４の３’エクソン－イントロン接合部にある標的領域にハイブリダイズする。

【００５２】

一部の例では、本明細書に記載のＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４のスプライス部位を標的化する。場合により、本明細書に記載のＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４のスプライス部位を標的とする。本明細書で使用される場合、スプライス部位は、不正確にスプライシングされたｍＲＮＡ転写物に挿入、欠失、重複、または変化を誘導してエクソン４４スキッピングを誘導することが可能な標準スプライス部位、潜在的（ｃｒｙｐｔｉｃ）スプライス部位、または選択的スプライス部位を含む。

【００５３】

一部の例では、ＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子は、エクソン－イントロン接合部の近位にある標的領域にハイブリダイズする。一部の例では、本明細書に記載のＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４の少なくとも１０００ヌクレオチド（ｎｔ）、５００ｎｔ、４００ｎｔ、３００ｎｔ、２００ｎｔ、１００ｎｔ、８０ｎｔ、６０ｎｔ、５０ｎｔ、４０ｎｔ、３０ｎｔ、２０ｎｔ、１０ｎｔ、または５ｎｔ上流（または５’）にある領域を標的とする。一部の例では、本明細書に記載のＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４の少なくとも１０００ｎｔ、５００ｎｔ、４００ｎｔ、３００ｎｔ、２００ｎｔ、１００ｎｔ、８０ｎｔ、６０ｎｔ、５０ｎｔ、４０ｎｔ、３０ｎｔ、２０ｎｔ、１０ｎｔ、または５ｎｔ上流（または５’）にある

領域を標的とする。

【００５４】

一部の例では、ＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４の下流（または３’）にある標的領域にハイブリダイズする。一部の例では、ポリ核酸分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４の約５、１０、１５、２０、５０、１００、２００、３００、４００、または５００ｎｔ下流（または３’）にある標的領域にハイブリダイズする。

【００５５】

一部の例では、本明細書に記載のＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４内にある内部領域を標的化する。

【００５６】

一部の態様では、本明細書に記載のＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４を含む部分的にスプライシングされたｍＲＮＡ配列を標的とする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４の上流（または５’）にある標的領域にハイブリダイズする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４の約５、１０、１５、２０、５０、１００、２００、３００、４００、または５００ｂｐ上流（または５’）にある標的領域にハイブリダイズする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４の下流（または３’）にある標的領域にハイブリダイズする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４の約５、１０、１５、２０、５０、１００、２００、３００、４００、または５００ｂｐ下流（または３’）にある標的領域にハイブリダイズする。

【００５７】

一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソン４４内にある標的領域にハイブリダイズする。一部の例では、ＰＭＯ分子は、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡの５’イントロン－エクソン４４接合部または３’エクソン４４－イントロン接合部のいずれかにある標的領域にハイブリダイズする。

【００５８】

一部の態様では、ＰＭＯ分子は、配列番号１００～１３３から選択される配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【００５９】

一部の態様では、ＰＭＯ分子は、配列番号１００～１３３から選択される配列に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するコア配列を含む。

【００６０】

一部の態様では、ＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子は、配列番号１００～１３３から選択される配列の少なくとも１０、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０個、またはそれ以上の連続塩基を含む。場合により、ＰＭＯ分子は、配列番号１００～１３３から選択される配列由来の１、２、３、もしくは４個のミスマッチ、または１、２、３もしくは４個以下のミスマッチをさらに含む。

【００６１】

表１および表１０は、配列番号１００～１３３のＰＭＯ分子を列挙する。

【００６２】

【表１】

表 1

PMO (30-mer)	配列 (5'-3')	配列番号
hEx44_Ac0	CGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAAATCGC	100
hEx44_Ac1	CCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAAATCG	101
hEx44_Ac2	GCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAAATC	102
hEx44_Ac3	AGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAAAT	103
hEx44_Ac4	AAGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAAA	104
hEx44_Ac5	AAAGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAA	105
hEx44_Ac6	AAAAGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCA	106
hEx44_Ac7	AAAACGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTC	107
hEx44_Ac8	GAAAACGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGT	108
hEx44_Ac9	TGAAAACGCCGCCATTTCTCAACAGATCTG	109
hEx44_Ac10	ATGAAAACGCCGCCATTTCTCAACAGATCT	110
hEx44_Ac14	CATAATGAAAACGCCGCCATTTCTCAACAG	111

【００６３】

【表２】

表 10

PMO 名	標的部位	PMO 長	PMO 分子 (5'-3')	配列番号
hEx_44_Ac2_25	Ac2	25	CATTTCTCAACAGATCTGTCAAATC	112
hEx_44_Ac4_25	Ac4	25	GCCATTTCTCAACAGATCTGTCAAA	113
hEx_44_Ac5_25	Ac5	25	CGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAA	114
hEx_44_Ac7_25	Ac7	25	GCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTC	115
hEx_44_Ac4_26	Ac4	26	CGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAAA	116
hEx_44_Ac5_26	Ac5	26	CCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAA	117
hEx_44_Ac7_26	Ac7	26	CGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTC	118
hEx_44_Ac8_26	Ac8	26	ACGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGT	119
hEx_44_Ac4_27	Ac4	27	CCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAAA	120
hEx_44_Ac5_27	Ac5	27	GCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAA	121
hEx_44_Ac6_27	Ac6	27	CGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCA	122
hEx_44_Ac7_27	Ac7	27	ACGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTC	123
hEx_44_Ac2_28	Ac2	28	CGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAAATC	124
hEx_44_Ac3_28	Ac3	28	CCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAAAT	125
hEx_44_Ac4_28	Ac4	28	GCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAAA	126
hEx_44_Ac5_28	Ac5	28	CGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCAA	127
hEx_44_Ac6_28	Ac6	28	ACGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTCA	128
hEx_44_Ac7_28	Ac7	28	AACGCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTC	129
hEx_44_Ac24_28	Ac24	28	CTTTATATCATAATGAAAACGCCGCCAT	130
hEx_44_Ac25_28	Ac25	28	TCTTTATATCATAATGAAAACGCCGCCA	131
hEx_44_Ac26_28	Ac26	28	ATCTTTATATCATAATGAAAACGCCGCC	132
hEx_44_Ac-コア_25	Ac4/Ac5/Ac7	25	GCCGCCATTTCTCAACAGATCTGTC	133

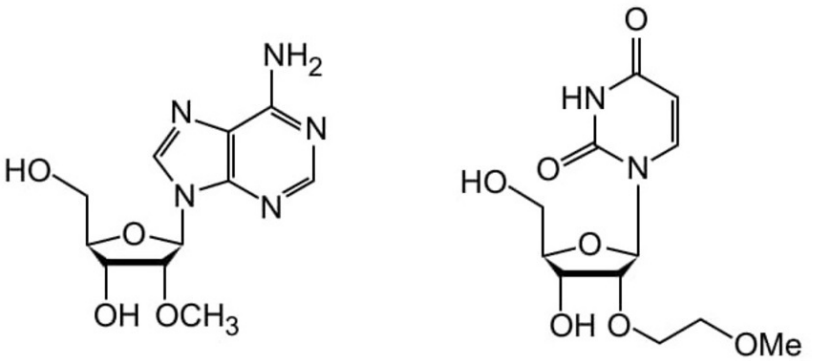
【００６４】

一部の態様では、ポリ核酸分子は、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）分子またはホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド（ＰＭＯ）分子である。

【００６５】

一部の態様では、ＰＭＯ分子は、少なくとも約１０～約５０ヌクレオチド長である。一部の例では、ＰＭＯ分子は、約１０～約３０、約１５～約３０、約１８～約３０、約１８～約２５、約１８～約２４、約１９～約２３、約１９～約３０、約１９～約２５、約１９～約２４、約１９～約２３、約２０～約３０、約２０～約２５、約２０～約２４、約２０～約２３、または約２０～約２２ヌクレオチド長である。

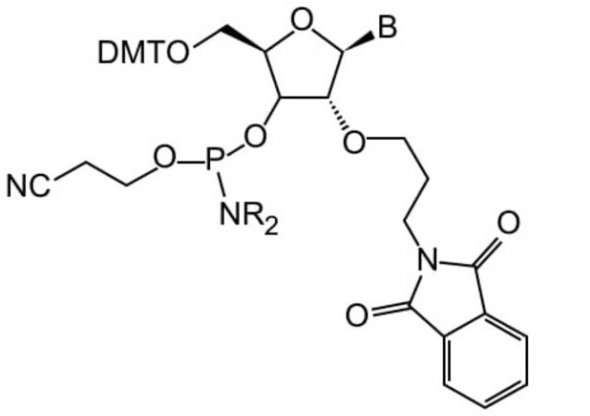
【００６６】
一部の態様では、ポリ核酸分子は、天然、合成、または人工のヌクレオチド類似体または塩基を含む。場合により、ポリ核酸分子－抗体コンジュゲート（例えば、ＰＭＯ－抗体コンジュゲートまたはＡＳＯ－抗体コンジュゲート）のＡＳＯ分子またはＰＭＯ分子は、ＤＮＡ、ＲＮＡおよび／またはヌクレオチド類似体の組合せを含む。一部の例では、合成または人工のヌクレオチド類似体または塩基は、リボース部分、ホスフェート部分、ヌクレオシド部分、またはそれらの組合せのうち１つまたは複数において修飾を含む。
【００６７】
一部の態様では、ヌクレオチド類似体または人工ヌクレオチド塩基は、リボース部分の２’ヒドロキシル基に修飾を有する核酸を含む。一部の例では、修飾は、Ｈ、ＯＲ、Ｒ、ハロ、ＳＨ、ＳＲ、ＮＨ２、ＮＨＲ、ＮＲ２、またはＣＮを含み、Ｒはアルキル部分である。例示的なアルキル部分としては、ハロゲン、硫黄、チオール、チオエーテル、チオエステル、アミン（一級、二級、または三級）、アミド、エーテル、エステル、アルコール、および酸素が挙げられるが、これらに限定されない。一部の例では、アルキル部分は、修飾をさらに含む。一部の例では、修飾は、アゾ基、ケト基、アルデヒド基、カルボキシル基、ニトロ基、ニトロソ基、ニトリル基、複素環（例えば、イミダゾール、ヒドラジノ、もしくはヒドロキシルアミノ）基、イソシアネートもしくはシアネート基、または硫黄含有基（例えば、スルホキシド、スルホン、スルフィド、もしくはジスルフィド）を含む。一部の例では、アルキル部分は、ヘテロ置換をさらに含む。一部の例では、複素環基の炭素は、窒素、酸素、または硫黄によって置換される。一部の例では、複素環置換には、モルホリノ、イミダゾール、およびピロリジノが挙げられるが、これらに限定されない。
【００６８】
一部の例では、２’ヒドロキシル基における修飾は、２’－Ｏ－メチル修飾または２’－Ｏ－メトキシエチル（２’－Ｏ－ＭＯＥ）修飾である。場合により、２’－Ｏ－メチル修飾は、メチル基をリボース部分の２’ヒドロキシル基に付加するのに対し、２’Ｏ－メトキシエチル修飾は、メトキシエチル基をリボース部分の２’ヒドロキシル基に付加する。アデノシン分子の２’－Ｏ－メチル修飾およびウリジンの２’Ｏ－メトキシエチル修飾の例示的な化学構造を、以下に示す。
【００６９】
【化１】



2'-O-メチル-アデノシン　　2'-O-メトキシエチルウリジン

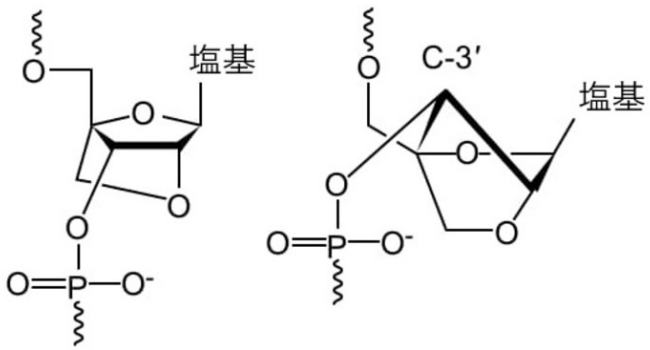
【００７０】
一部の例では、２’ヒドロキシル基における修飾は、プロピルリンカーを含む伸長アミン基がアミン基を２’酸素に結合させる２’－Ｏ－アミノプロピル修飾である。一部の例では、この修飾は、糖ごとにアミン基から１個の正電荷を導入することによってオリゴヌクレオチド分子のホスフェート由来の負電荷全体を中和し、それにより双性イオン特性に起因する細胞取込み特性を改善する。２’－Ｏ－アミノプロピルヌクレオシドホスホラミダイトの例示的な化学構造を、以下に示す。

【００７１】
【化２】



2'-O-アミノプロピルヌクレオシドホスホラミダイト

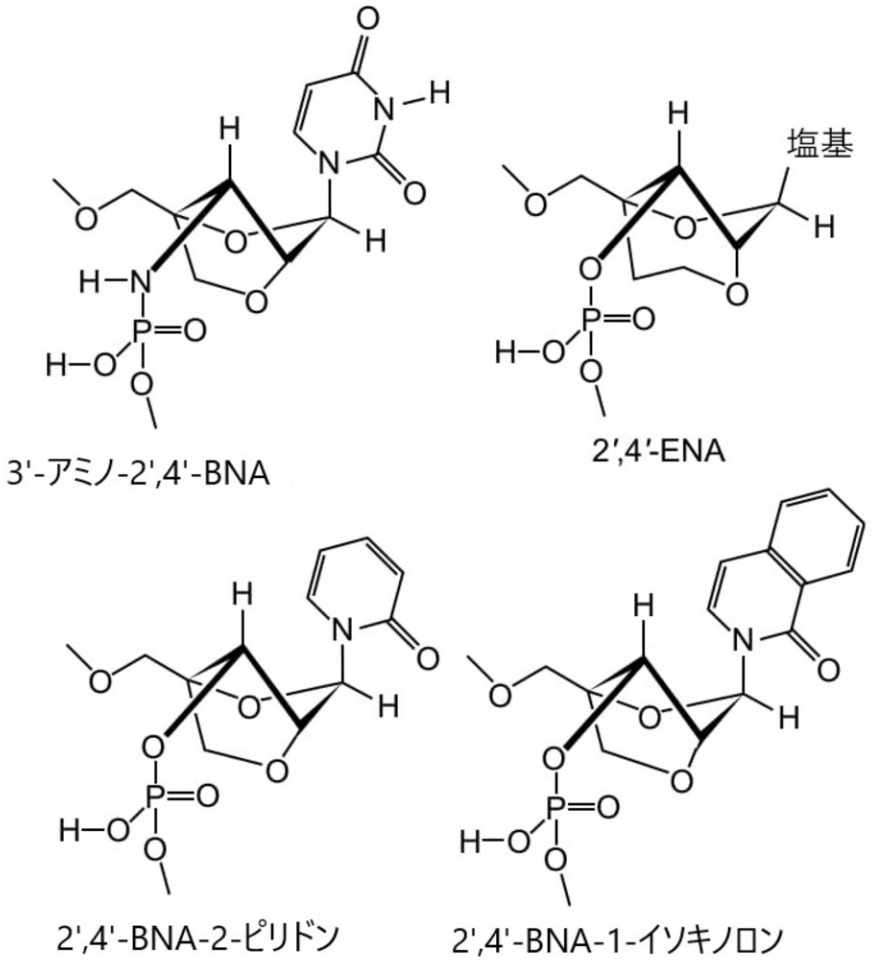
【００７２】
一部の例では、２’ヒドロキシル基での修飾は、ロックまたは架橋されたリボース修飾（例えば、ロックド核酸またはＬＮＡ）であり、その中で、２’炭素において結合された酸素分子は、メチレン基によって４’炭素に連結され、こうして２’－Ｃ，４’－Ｃ－オキシ－メチレン連結二環式リボヌクレオチドモノマーを形成する。ＬＮＡの化学構造の例示的な表現を、以下に示す。左側に示す表現は、ＬＮＡモノマーの化学的結合性を強調する。右側に示す表現は、ＬＮＡモノマーのフラノース環のロックされた３’－エンド（３Ｅ）立体配座を強調する。
【００７３】
【化３】



LNA（ロックド核酸）

【００７４】
一部の例では、２’ヒドロキシル基における修飾は、例えば２’－４’－エチレン架橋核酸などのエチレン核酸（ＥＮＡ）を含み、糖立体配座をＣ３’－エンド糖パッカリング立体配座にロックする。ＥＮＡは、さらにＬＮＡを含む修飾核酸の架橋核酸クラスの一部である。ＥＮＡおよび架橋核酸の例示的な化学構造を、以下に示す。
【００７５】

【化４】



【００７６】

一部の態様では、２’ヒドロキシル基におけるさらなる修飾には、２’－デオキシ、２’－デオキシ－２’－フルオロ、２’－Ｏ－アミノプロピル（２’－Ｏ－ＡＰ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＯＥ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノプロピル（２’－Ｏ－ＤＭＡＰ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチルオキシエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＥＯＥ）、または２’－Ｏ－Ｎ－メチルアセトアミド（２’－Ｏ－ＮＭＡ）が挙げられる。

【００７７】

一部の態様では、ヌクレオチド類似体は、修飾塩基、例えば、限定されないが、５－プロピニルウリジン、５－プロピニルシチジン、６－メチルアデニン、６－メチルグアニン、Ｎ，Ｎ，－ジメチルアデニン、２－プロピルアデニン、２プロピルグアニン、２－アミノアデニン、１－メチルイノシン、３－メチルウリジン、５－メチルシチジン、５－メチルウリジンおよび５位に修飾を有する他のヌクレオチド、５－（２－アミノ）プロピルウリジン、５－ハロシチジン、５－ハロウリジン、４－アセチルシチジン、１－メチルアデノシン、２－メチルアデノシン、３－メチルシチジン、６－メチルウリジン、２－メチルグアノシン、７－メチルグアノシン、２，２－ジメチルグアノシン、５－メチルアミノエチルウリジン、５－メチルオキシウリジン、ジアザヌクレオチド、例えば７－デアザ－アデノシン、６－アゾウリジン、６－アゾシチジン、６－アゾチミジン、５－メチル－２－チオウリジン、他のチオ塩基、例えば２－チオウリジンおよび４－チオウリジンおよび２－チオシチジン、ジヒドロウリジン、プソイドウリジン、クエイオシン、アーケオシン、ナフチルおよび置換ナフチル基、あらゆるＯ－およびＮ－アルキル化プリンおよびピリミジン、例えばＮ６－メチルアデノシン、５－メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン５－オキシ酢酸、ピリジン－４－オン、ピリジン－２－オン、フェニルおよび修飾フェニ

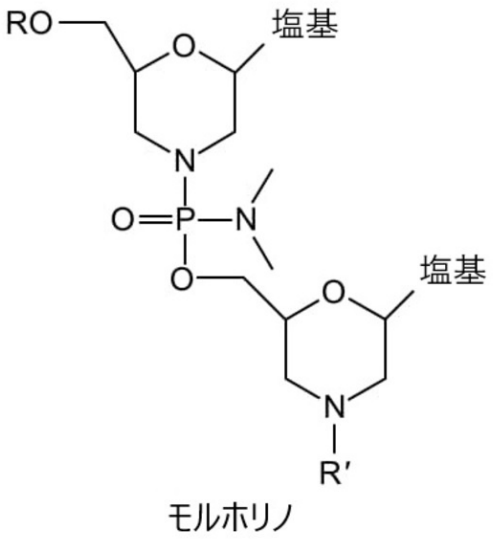
ル基、例えばアミノフェノールまたは２，４，６－トリメトキシベンゼン、Ｇ－クランプヌクレオチドとして作用する修飾シトシン、８－置換アデニンおよびグアニン、５－置換ウラシルおよびチミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシアルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルアミノアルキルヌクレオチド、ならびにアルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドを含む。修飾ヌクレオチドはまた、糖部分に対して修飾されたヌクレオチドのほか、リボシルではない糖またはその類似体を有するヌクレオチドを含む。例えば糖部分は、場合によりマンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、４’－チオリボース、および他の糖、複素環、または炭素環であるか、またはそれらをベースとする。ヌクレオチドという用語は、当該技術分野においてユニバーサル塩基として知られるものも含む。例として、ユニバーサル塩基には、３－ニトロピロール、５－ニトロインドール、またはネブラリンが挙げられるが、これらに限定されない。

【００７８】

一部の態様では、ヌクレオチド類似体は、モルホリノ、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、２’－フルオロＮ３－Ｐ５’－ホスホラミダイト、１’，５’－アンヒドロヘキシトール核酸（ＨＮＡ）、またはそれらの組合せをさらに含む。モルホリノまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（ＰＭＯ）は、その構造が通常の糖およびリン酸構造から逸脱することによって天然の核酸構造を模倣する合成分子を含む。一部の例では、５員のリボース環は、４個の炭素、１個の窒素、および１個の酸素を含有する６員のモルホリノ環で置換される。場合により、リボースモノマーは、ホスフェート基の代わりにホスホロジアミデート基によって連結される。そのような場合、骨格の変化により、すべての正電荷および負電荷が除去され、荷電オリゴヌクレオチドにより使用されるものなどの細胞送達剤の補助なしにモルホリノ中性分子が細胞膜を通過することが可能となる。

【００７９】

【化５】

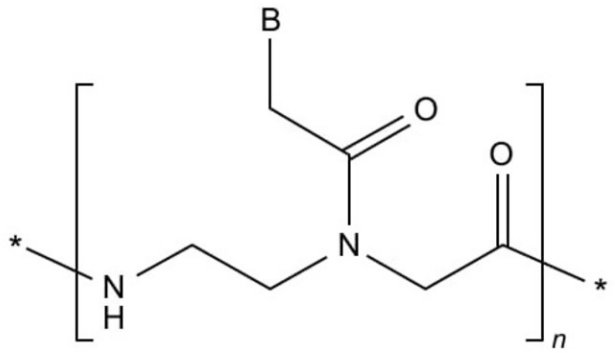


【００８０】

一部の態様では、ペプチド核酸（ＰＮＡ）は、糖環またはリン酸結合を含有せず、塩基は、オリゴグリシン様分子によって付着されて適宜間隔を空けられ、そうして骨格電荷を排除する。

【００８１】

【化６】



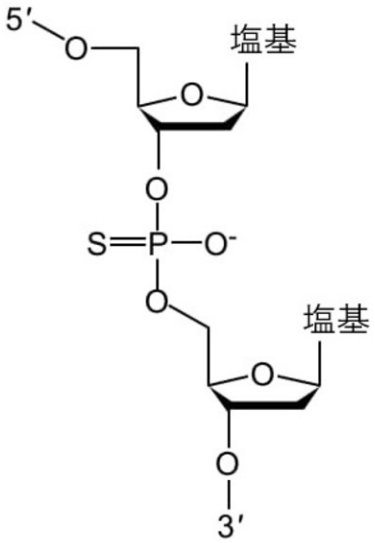
PNA

【００８２】

一部の態様では、１つまたは複数の修飾は、任意選択でヌクレオチド間結合に生じる。一部の例では、修飾ヌクレオチド間結合には、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、５’－アルキレンホスホネート、５’－メチルホスホネート、３’－アルキレンホスホネート、ボロントリフルオリデート、３’－５’結合または２’－５’結合を有するボラノホスフェートエステルおよびセレノホスフェート、ホスホトリエステル、チオノアルキルホスホトリエステル、ホスホン酸水素結合、アルキルホスホネート、アルキルホスホノチオエート、アリールホスホノチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスフィネート、ホスホラミデート、３’－アルキルホスホラミデート、アミノアルキルホスホラミデート、チオノホスホラミデート、ホスホロピペラジデート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニリデート、ケトン、スルホン、スルホンアミド、カーボネート、カルバメート、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、チオアミデート、リボアセチル基との結合、アミノエチルグリシン、シリルまたはシロキサン結合、例えば飽和もしくは不飽和であり、かつ／または置換され、かつ／またはヘテロ原子を含有する１～１０個の炭素のヘテロ原子の有無を問わないアルキルまたはシクロアルキル結合、モルホリノ構造との結合、アミド、塩基が骨格のアザ窒素に直接または間接的に付着しているポリアミド、およびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。ホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＰＳ　ＡＳＯ）は、ホスホロチオエート結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。例示的なＰＳ　ＡＳＯを以下に示す。

【００８３】

【化７】

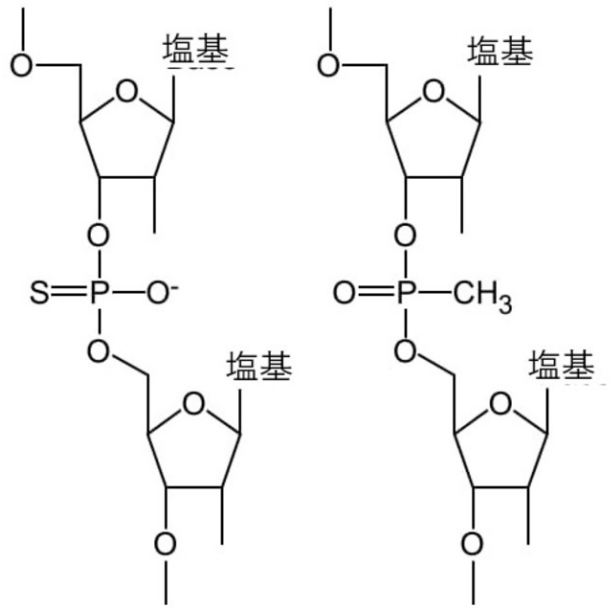


【００８４】

一部の例では、修飾は、メチルホスホネート修飾またはチオールホスホネート修飾などのメチル修飾またはチオール修飾である。例示的なチオールホスホネートヌクレオチド（左）およびメチルホスホネートヌクレオチド（右）を、以下に示す。

【００８５】

【化８】

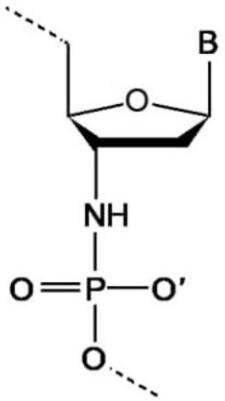


【００８６】

一部の例では、修飾ヌクレオチドには、次のように示される２’－フルオロＮ３－Ｐ５’－ホスホラミダイトが挙げられるが、これに限定されない。

【００８７】

【化９】



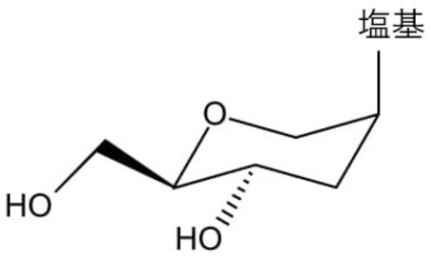
N3'-P5'ホスホロアミデート

【００８８】

一部の例では、修飾ヌクレオチドには、次のように示されるヘキシトール核酸（すなわち１’，５’－アンヒドロヘキシトール核酸（ＨＮＡ））が挙げられるが、これに限定されない。

【００８９】

【化１０】



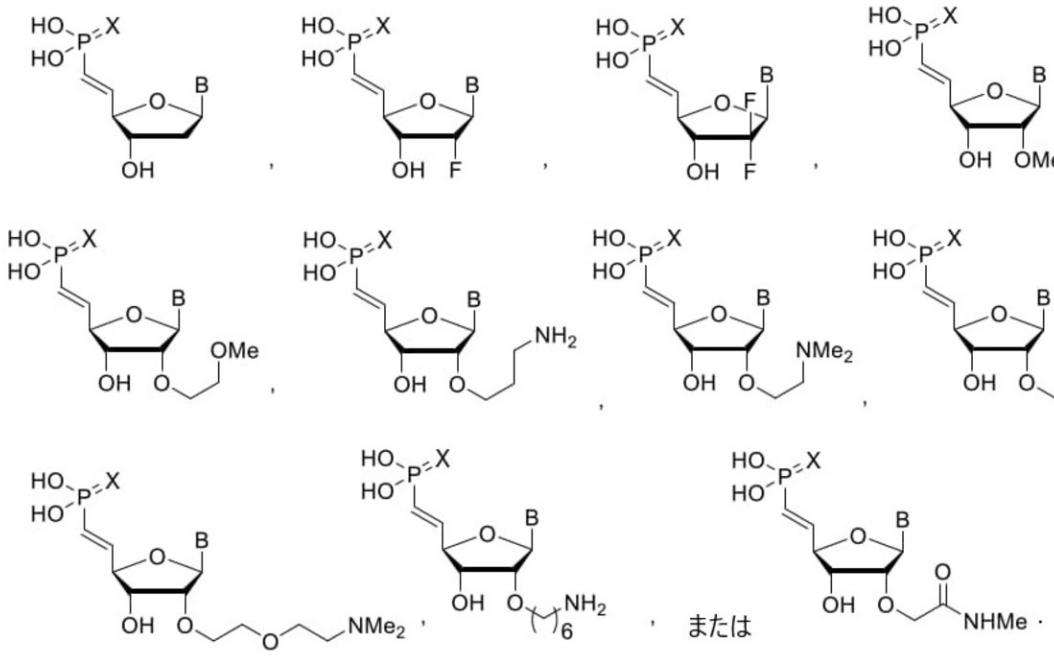
HNA

【００９０】

一部の態様では、上記のヌクレオチド類似体または人工ヌクレオチド塩基は、リボース部分の５’ヒドロキシル基に修飾を有する５’－ビニルホスホネート修飾ヌクレオチドを含む。一部の態様では、５’－ビニルホスホネート修飾ヌクレオチドは、以下に提供されるヌクレオチドから選択され、式中、ＸはＯまたはＳであり、Ｂは複素環塩基部分である。

【００９１】

【化１１】



【００９２】

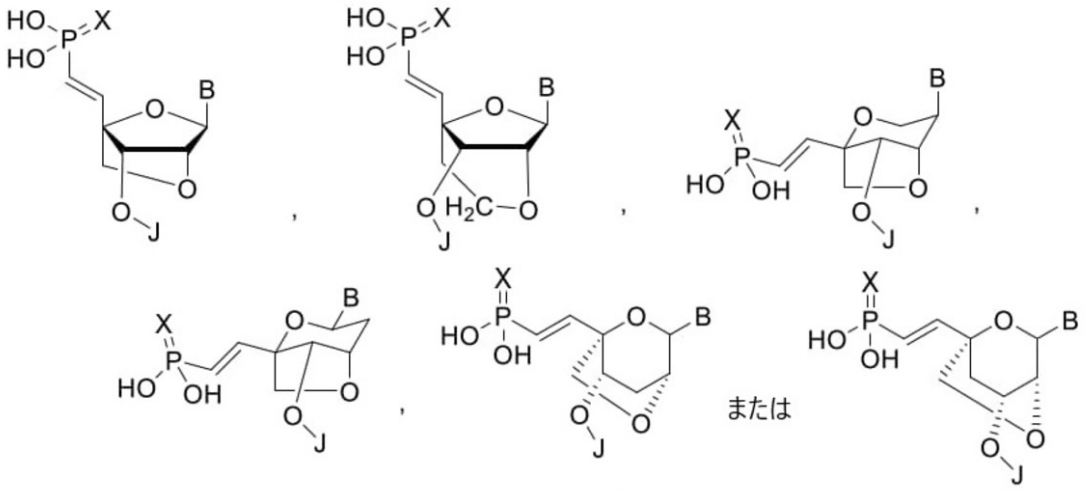
一部の例では、２’ヒドロキシル基における修飾は、プロピルリンカーを含む伸長アミン基がアミン基を２’酸素に結合させる２’－Ｏ－アミノプロピル修飾である。一部の例では、この修飾は、糖ごとにアミン基から１個の正電荷を導入することによってオリゴヌクレオチド分子のホスフェート由来の負電荷全体を中和し、それにより双性イオン特性に起因する細胞取込み特性を改善する。

【００９３】

一部の例では、５’－ビニルホスホネート修飾ヌクレオチドは、２’ヒドロキシル基におけるロックまたは架橋されたリボース修飾（例えば、ロックド核酸またはＬＮＡ）でさらに修飾され、その中で、２’炭素において結合された酸素分子は、メチレン基によって４’炭素に連結され、こうして２’－Ｃ，４’－Ｃ－オキシ－メチレン連結二環式リボヌクレオチドモノマーを形成する。５’－ビニルホスホネート修飾ＬＮＡの化学構造の例示的な表現を以下に示し、式中、ＸはＯまたはＳであり、Ｂは複素環塩基部分であり、Ｊは、ポリヌクレオチドの隣接ヌクレオチドに連結するヌクレオチド間連結基である。

【００９４】

【化１２】



LNA (ロックド核酸)

【００９５】

一部の態様では、２’ヒドロキシル基におけるさらなる修飾には、２’－デオキシ、２’－デオキシ－２’－フルオロ、２’－Ｏ－アミノプロピル（２’－Ｏ－ＡＰ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＯＥ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノプロピル（２’－Ｏ－ＤＭＡＰ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチルオキシエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＥＯＥ）、または２’－Ｏ－Ｎ－メチルアセトアミド（２’－Ｏ－ＮＭＡ）が挙げられる。

【００９６】

一部の態様では、ヌクレオチド類似体は、修飾塩基、例えば、限定されないが、５－プロピニルウリジン、５－プロピニルシチジン、６－メチルアデニン、６－メチルグアニン、Ｎ，Ｎ，－ジメチルアデニン、２－プロピルアデニン、２－プロピルグアニン、２－アミノアデニン、１－メチルイノシン、３－メチルウリジン、５－メチルシチジン、５－メチルウリジンおよび５位に修飾を有する他のヌクレオチド、５－（２－アミノ）プロピルウリジン、５－ハロシチジン、５－ハロウリジン、４－アセチルシチジン、１－メチルアデノシン、２－メチルアデノシン、３－メチルシチジン、６－メチルウリジン、２－メチルグアノシン、７－メチルグアノシン、２，２－ジメチルグアノシン、５－メチルアミノエチルウリジン、５－メチルオキシウリジン、ジアザヌクレオチド（７－デアザ－アデノシン、６－アゾウリジン、６－アゾシチジン、または６－アゾチミジンなど）、５－メチル－２－チオウリジン、他のチオ塩基（２－チオウリジン、４－チオウリジン、および２－チオシチジンなど）、ジヒドロウリジン、プソイドウリジン、クエイオシン、アーケオシン、ナフチルおよび置換ナフチル基、あらゆるＯ－およびＮ－アルキル化プリンおよびピリミジン（Ｎ６－メチルアデノシン、５－メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン５－オキシ酢酸、ピリジン－４－オン、またはピリジン－２－オンなど）、フェニルおよび修飾フェニル基、例えばアミノフェノールまたは２，４，６－トリメトキシベンゼン、Ｇ－クランプヌクレオチドとして作用する修飾シトシン、８－置換アデニンおよびグアニン、５－置換ウラシルおよびチミン、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシアルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルアミノアルキルヌクレオチド、ならびにアルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドを含む。５’－ビニルホスホネート修飾ヌクレオチドはまた、糖部分に対して修飾されたヌクレオチドのほか、リボシルではない糖またはその類似体を有する５’－ビニルホスホネート修飾ヌクレオチドを含み得る。例えば糖部分は、場合によりマンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、４’－チオリボース、および他の糖、複素環、または炭素環であるか、またはそれらをベースとする。ヌクレオチドという用語は、当該技術分野においてユニバーサル塩基として知られるも

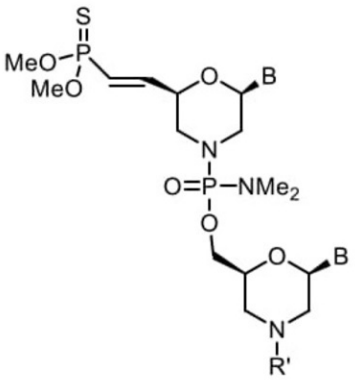
のも含む。例として、ユニバーサル塩基には、３－ニトロピロール、５－ニトロインドール、またはネブラリンが挙げられるが、これらに限定されない。

【００９７】

一部の態様では、５’－ビニルホスホネート修飾ヌクレオチド類似体は、モルホリノ、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、２’－フルオロＮ３－Ｐ５’－ホスホラミダイト、または１’，５’－アンヒドロヘキシトール核酸（ＨＮＡ）をさらに含む。モルホリノまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（ＰＭＯ）は、その構造が天然の核酸構造を模倣するが通常の糖およびリン酸構造から逸脱する合成分子を含む。一部の例では、５員のリボース環は、４個の炭素、１個の窒素、および１個の酸素を含有する６員のモルホリノ環で置換される。場合により、リボースモノマーは、ホスフェート基の代わりにホスホロジアミデート基によって連結される。そのような場合、骨格の変化により、すべての正電荷および負電荷が除去され、荷電オリゴヌクレオチドにより使用されるものなどの細胞送達剤の補助なしにモルホリノ中性分子が細胞膜を通過可能となる。５’－ビニルホスホネート修飾モルホリノオリゴヌクレオチドの非限定的な例を以下に示し、式中、Ｂは複素環塩基部分である。

【００９８】

【化１３】



【００９９】

一部の態様では、上記の５’－ビニルホスホネート修飾モルホリノまたはＰＭＯは、正電荷またはカチオン電荷を含むＰＭＯである。一部の例では、ＰＭＯはＰＭＯｐｌｕｓ（Ｓａｒｅｐｔａ）である。ＰＭＯｐｌｕｓは、任意数の（１－ピペラジノ）ホスフィニリデンオキシ、（１－（４－（オメガ－グアニジノ－アルカノイル））－ピペラジノ）ホスフィニリデノキシ結合（例えば、国際公開第２００８／０３６１２７号に記載されるものなど）を含む、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーを指す。場合により、ＰＭＯは、米国特許第７，９４３，７６２号明細書に記載のＰＭＯである。

【０１００】

一部の態様では、上記のモルホリノまたはＰＭＯは、ＰＭＯ－Ｘ（Ｓａｒｅｐｔａ）である。場合により、ＰＭＯ－Ｘは、少なくとも１つの結合、または開示される末端修飾、例えば国際公開第２０１１／１５０４０８号および米国特許出願公開第２０１２／００６５１６９号明細書に開示されるもののうち少なくとも１つを含む、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーを指す。

【０１０１】

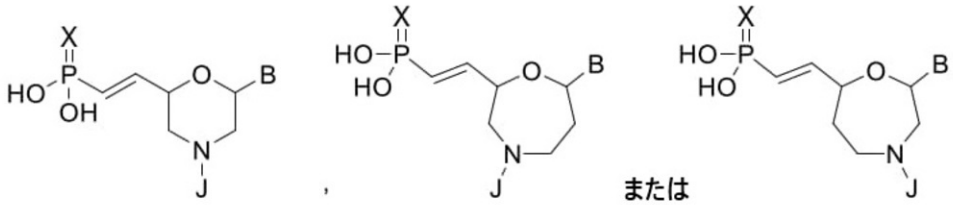
一部の態様では、上記のモルホリノまたはＰＭＯは、米国特許出願公開第２０１４／０２９６３２１号明細書の表５に記載されるＰＭＯである。

【０１０２】

５’－ビニルホスホネート修飾核酸の化学構造の例示的な表現を以下に示し、式中、ＸはＯまたはＳであり、Ｂは複素環塩基部分であり、Ｊはヌクレオチド間結合である。

【０１０３】

【化１４】



【０１０４】

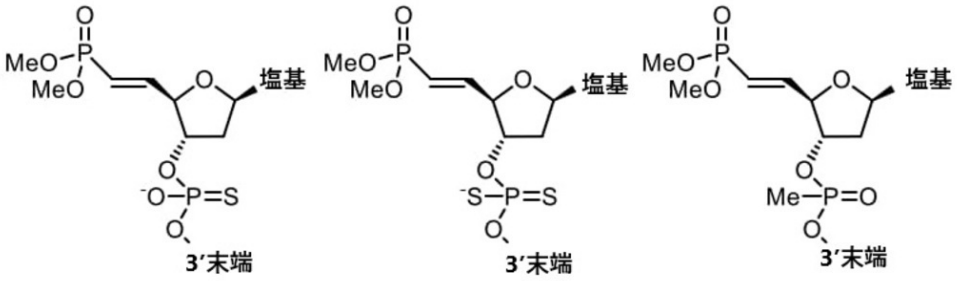
一部の態様では、５’－ビニルホスホネート修飾オリゴヌクレオチドの１つまたは複数の修飾は、任意選択でヌクレオチド間結合に生じる。一部の例では、修飾ヌクレオチド間結合には、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、５’－アルキレンホスホネート、５’－メチルホスホネート、３’－アルキレンホスホネート、ボロントリフルオリデート、３’－５’結合または２’－５’結合を有するボラノホスフェートエステルおよびセレノホスフェート、ホスホトリエステル、チオノアルキルホスホトリエステル、ホスホン酸水素結合、アルキルホスホネート、アルキルホスホノチオエート、アリールホスホノチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスフィネート、ホスホラミデート、３’－アルキルホスホラミデート、アミノアルキルホスホラミデート、チオノホスホラミデート、ホスホロピペラジデート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニリデート、ケトン、スルホン、スルホンアミド、カーボネート、カルバメート、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、チオアミデート、リボアセチル基との結合、アミノエチルグリシン、シリルまたはシロキサン結合、例えば飽和もしくは不飽和であり、かつ／または置換され、かつ／またはヘテロ原子を含有する１～１０個の炭素のヘテロ原子の有無を問わないアルキルまたはシクロアルキル結合、モルホリノ構造との結合、アミド、あるいは塩基が骨格のアザ窒素に直接または間接的に付着しているポリアミド、およびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０５】

一部の例では、修飾は、メチルホスホネート修飾またはチオールホスホネート修飾などのメチル修飾またはチオール修飾である。例示的なチオールホスホネートヌクレオチド（左）、ホスホロジチオエート（中央）、およびメチルホスホネートヌクレオチド（右）を、以下に示す。

【０１０６】

【化１５】

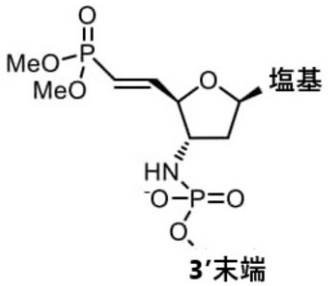


【０１０７】

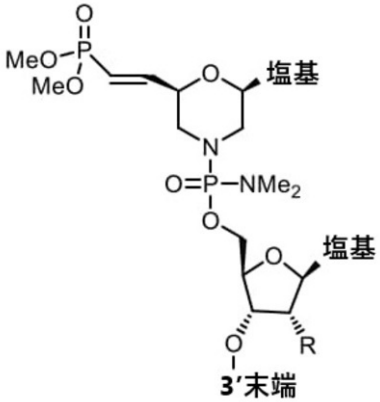
一部の例では、５’－ビニルホスホネート修飾ヌクレオチドには、次のように示されるホスホラミダイトが挙げられるが、これに限定されない。

【０１０８】

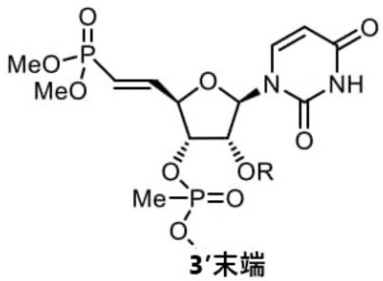
【化１６】



【０１０９】
一部の例では、修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホロジアミデート結合である。モルホリノ系とのホスホロジアミデート結合の非限定的な例を以下に示す。
【０１１０】
【化１７】

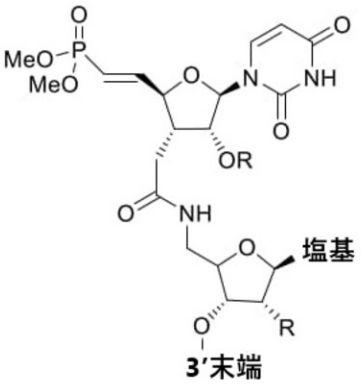


【０１１１】
一部の例では、修飾ヌクレオチド間結合は、メチルホスホネート結合である。メチルホスホネート結合の非限定的な例を以下に示す。
【０１１２】
【化１８】



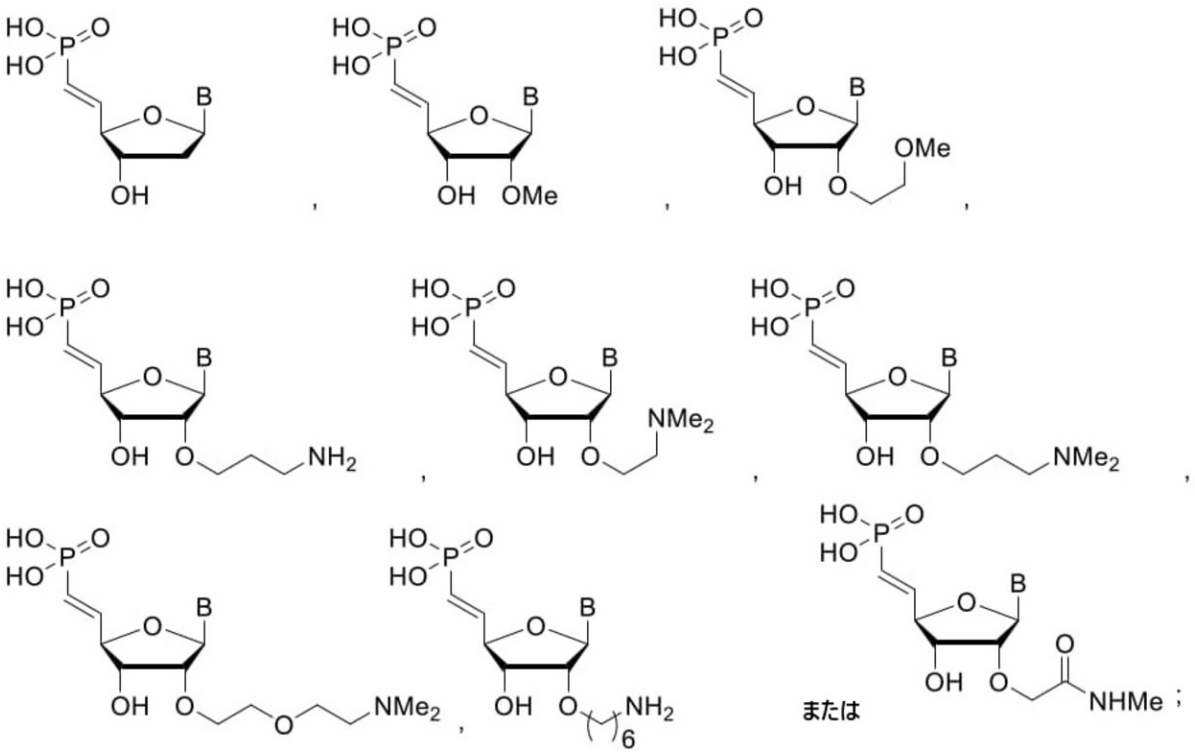
【０１１３】
一部の例では、修飾ヌクレオチド間結合は、アミド結合である。アミド結合の非限定的な例を以下に示す。
【０１１４】

【化１９】



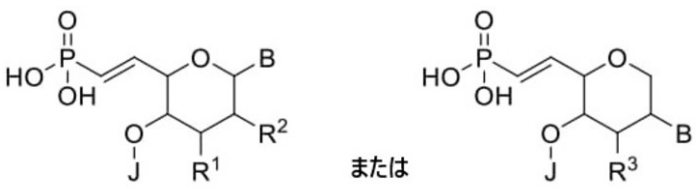
【０１１５】
一部の例では、５’－ビニルホスホネート修飾ヌクレオチドには、次のように示される修飾核酸が挙げられるが、これに限定されない。

【０１１６】
【化２０】

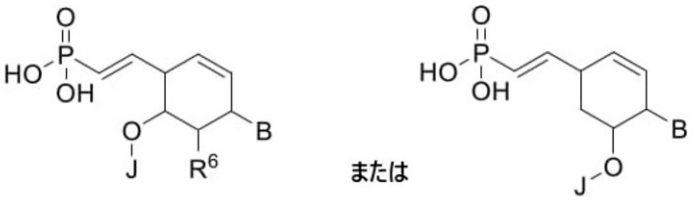


【０１１７】
式中、Ｂは複素環塩基部分である。

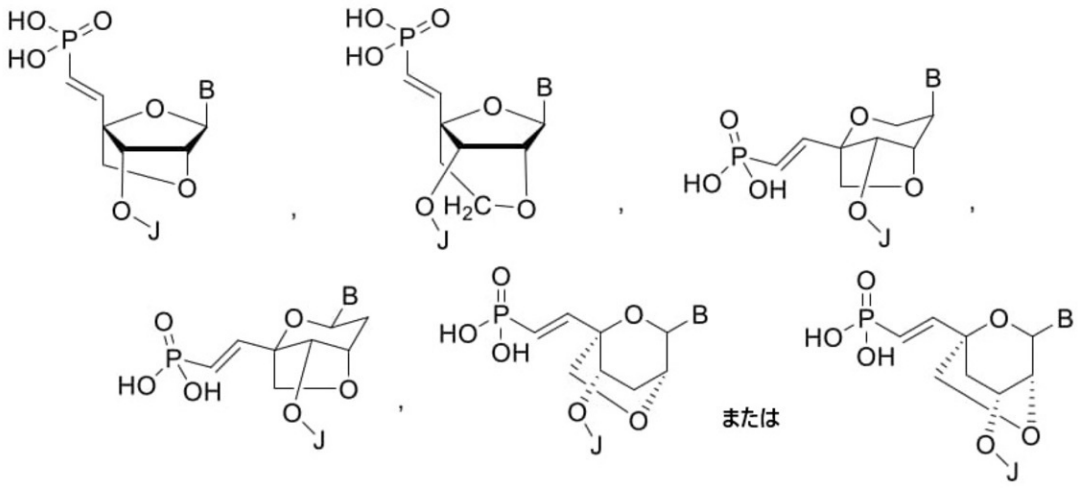
【０１１８】
【化２１】



【０１１９】
式中、Ｂは複素環塩基部分であり、
【０１２０】
Ｒ４、およびＲ５は、独立して水素、ハロゲン、アルキル、またはアルコキシから選択され、
【０１２１】
Ｊは、ポリヌクレオチドの隣接ヌクレオチドに連結するヌクレオチド間連結基である。
【０１２２】
【化２２】

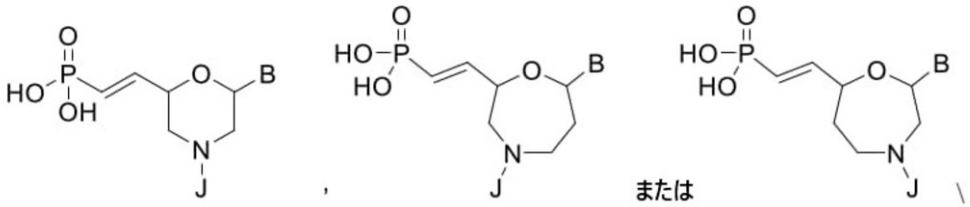


【０１２３】
式中、Ｂは複素環塩基部分であり、
【０１２４】
Ｒ６は、水素、ハロゲン、アルキル、またはアルコキシから選択され、
【０１２５】
Ｊは、ポリヌクレオチドの隣接ヌクレオチドに連結するヌクレオチド間連結基である。
【０１２６】
【化２３】



【０１２７】
式中、Ｂは複素環塩基部分であり、
【０１２８】
Ｊは、ポリヌクレオチドの隣接ヌクレオチドに連結するヌクレオチド間連結基である。
【０１２９】

【化２４】



【０１３０】

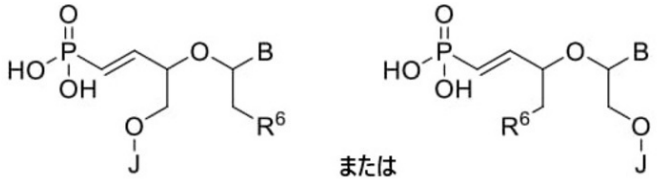
式中、Ｂは複素環塩基部分であり、

【０１３１】

Ｊは、ポリヌクレオチドの隣接ヌクレオチドに連結するヌクレオチド間連結基である。

【０１３２】

【化２５】



【０１３３】

式中、Ｂは複素環塩基部分であり、

【０１３４】

Ｒ６は、水素、ハロゲン、アルキル、またはアルコキシから選択され、

【０１３５】

Ｊは、ポリヌクレオチドの隣接ヌクレオチドに連結するヌクレオチド間連結基である。

【０１３６】

一部の態様では、ＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子は、複数のホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーまたは複数のペプチド核酸修飾された非天然ヌクレオチドを含み、かつ任意選択で少なくとも１個の反転した脱塩基部分を含む。一部の例では、ＰＭＯ分子は、少なくとも６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれ以上のホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー修飾された非天然ヌクレオチドを含む。一部の例では、ＰＭＯ分子は、１００％ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー修飾された非天然ヌクレオチドを含む。

【０１３７】

一部の例では、ＰＭＯ－抗体コンジュゲートのＰＭＯ分子は、約５％～約１００％の修飾、約１０％～約１００％の修飾、約２０％～約１００％の修飾、約３０％～約１００％の修飾、約４０％～約１００％の修飾、約５０％～約１００％の修飾、約６０％～約１００％の修飾、約７０％～約１００％の修飾、約８０％～約１００％の修飾、および約９０％～約１００％の修飾のうち少なくとも１つを含む。

【０１３８】

場合により、本明細書に記載の人工ヌクレオチド類似体の１つまたは複数は、天然ポリ核酸分子と比較して、ＲＮａｓｅ　Ｈなどのリボヌクレアーゼ、ＤＮａｓｅなどのデオキシリボヌクレアーゼ、または５’－３’エキソヌクレアーゼや３’－５’エキソヌクレアーゼなどのエキソヌクレアーゼといったヌクレアーゼに対して耐性を示す。一部の例では、２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－メトキシエチル（２’－Ｏ－ＭＯＥ）、２’－Ｏ－アミノプロピル、２’－デオキシ、２’－デオキシ－２’－フルオロ、２’－Ｏ－アミノプロピル（２’－Ｏ－ＡＰ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＯＥ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノプロピル（２’－Ｏ－ＤＭＡＰ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチルオキシエチル

（２’－Ｏ－ＤＭＡＥＯＥ）、または２’－Ｏ－Ｎ－メチルアセトアミド（２’－Ｏ－ＮＭＡ）修飾、ＬＮＡ、ＥＮＡ、ＰＮＡ、ＨＮＡ、モルホリノ、メチルホスホネートヌクレオチド、チオールホスホネートヌクレオチド、２’－フルオロＮ３－Ｐ５’－ホスホラミダイト、またはそれらの組合せを含む、人工ヌクレオチド類似体は、ＲＮａｓｅ　Ｈなどのリボヌクレアーゼ、ＤＮａｓｅなどのデオキシリボヌクレアーゼ、または５’－３’エキソヌクレアーゼや３’－５’エキソヌクレアーゼなどのエキソヌクレアーゼといったヌクレアーゼに対して耐性を示す。一部の例では、２’－Ｏ－メチル修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、２’Ｏ－メトキシエチル（２’－Ｏ－ＭＯＥ）修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、２’－Ｏ－アミノプロピル修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、２’－デオキシ修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、２’－デオキシ－２’－フルオロ修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、２’－Ｏ－アミノプロピル（２’－Ｏ－ＡＰ）修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＯＥ）修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、２’－Ｏ－ジメチルアミノプロピル（２’－Ｏ－ＤＭＡＰ）修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチルオキシエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＥＯＥ）修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、２’－Ｏ－メチルアセトアミド（２’－Ｏ－ＮＭＡ）修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、ＬＮＡ修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、ＥＮＡ修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、ＨＮＡ修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、モルホリノがヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、ＰＮＡ修飾ポリ核酸分子が、ヌクレアーゼに対し耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、メチルホスホネートヌクレオチド修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、チオールホスホネートヌクレオチド修飾ポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、２’－フルオロＮ３－Ｐ５’－ホスホラミダイトを含むポリ核酸分子がヌクレアーゼ耐性を示す（例えば、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＤＮａｓｅ、５’－３’エキソヌクレアーゼ、または３’－５’エキソヌクレアーゼ耐性）。一部の例では、本明細書に記載の５’コンジュゲートは、５’－３’エキソヌクレアーゼ切断（ｅｘｏｎｕｃｌｅｏｌ

ｙｔｉｃ　ｃｌｅａｖａｇｅ）を阻害する。一部の例では、本明細書に記載の３’コンジュゲートは、３’－５’エキソヌクレアーゼ切断（ｅｘｏｎｕｃｌｅｏｌｙｔｉｃ　ｃｌｅａｖａｇｅ）を阻害する。

【０１３９】

ポリ核酸分子合成

一部の態様では、本明細書に記載のポリ核酸分子は、当該技術分野で公知の手順を用いる化学合成および／または酵素ライゲーション反応を用いて構築される。例えばポリ核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド、または、分子の生物学的安定性を増加させるか、もしくはポリ核酸分子と標的核酸との間に形成される二本鎖の物理的安定性を増加させるように設計された様々な修飾ヌクレオチドを使用して化学的に合成される。例示的な方法には、米国特許５，１４２，０４７号明細書、同第５，１８５，４４４号明細書、同第５，８８９，１３６号明細書、同第６，００８，４００号明細書、および同第６，１１１，０８６号明細書、国際公開第２００９０９９４２号、または欧州特許出願公開第１５７９０１５号明細書に記載のものが挙げられる。さらなる例示的な方法には、Ｇｒｉｆｆｅｙらによる「２’－Ｏ－ａｍｉｎｏｐｒｏｐｙｌ　ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ：ａｚｗｉｔｔｅｒｉｏｎｉｃ　ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｔｈａｔ　ｅｎｈａｎｃｅｓ　ｔｈｅ　ｅｘｏｎｕｃｌｅａｓｅ　ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ　ａｎｄ　ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ａｃｔｉｖｉｔｙ　ｏｆ　ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ」，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３９（２６）：５１００～５１０９頁（１９９７））；Ｏｂｉｋａらによる「Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ｏｆ　２’－Ｏ，４’－Ｃ－ｍｅｔｈｙｌｅｎｅｕｒｉｄｉｎｅ　ａｎｄ　－ｃｙｔｉｄｉｎｅ．Ｎｏｖｅｌ　ｂｉｃｙｃｌｉｃ　ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ　ｈａｖｉｎｇ　ａ　ｆｉｘｅｄ　Ｃ３，－ｅｎｄｏ　ｓｕｇａｒ　ｐｕｃｋｅｒｉｎｇ」．Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　３８（５０）：８７３５頁（１９９７）；Ｋｏｉｚｕｍｉ，Ｍ．による「ＥＮＡ　ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ　ａｓ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ」．Ｃｕｒｒｅｎｔ　ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉｎ　ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　８（２）：１４４～１４９頁（２００６）；およびＡｂｒａｍｏｖａらによる「Ｎｏｖｅｌ　ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　ａｎａｌｏｇｕｅｓ　ｂａｓｅｄ　ｏｎ　ｍｏｒｐｈｏｌｉｎｏ　ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ　ｓｕｂｕｎｉｔｓ－ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ：ｎｅｗ　ｃｈｅｍｉｃａｌ　ｐｏｓｓｉｂｉｌｉｔｉｅｓ」，Ｉｎｄｉａｎ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　４８Ｂ：１７２１～１７２６（２００９）に記載されるものが挙げられる。代替的に、ポリ核酸分子は、ポリ核酸分子がアンチセンス配向（すなわち、挿入されたポリ核酸分子から転写されるＲＮＡは、目的の標的ポリ核酸分子に対してアンチセンス配向にある）でサブクローニングされた発現ベクターを用いて生物学的に産生される。

【０１４０】

一部の態様では、ポリ核酸分子はタンデム合成法によって合成され、この場合、両方の鎖は、切断可能リンカーによって分離された単一の連続したオリゴヌクレオチド断片または鎖として合成され、その後に切断されることで、二本鎖をハイブリダイズしその精製を可能にする別個の断片または鎖を提供する。

【０１４１】

例えば、糖修飾、塩基修飾、およびリン酸修飾を組み込むためのさらなる修飾方法として、Ｅｃｋｓｔｅｉｎらによる国際公開第９２／０７０６５号；ＰｅｒｒａｕｌｔらによるＮａｔｕｒｅ，１９９０，３４４，５６５～５６８頁；ＰｉｅｋｅｎらによるＳｃｉｅｎｃｅ，１９９１，２５３，３１４～３１７頁；ＵｓｍａｎおよびＣｅｄｅｒｇｒｅｎによるＴｒｅｎｄｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．，１９９２，１７，３３４～３３９頁；Ｕｓｍａｎによる国際公開９３／１５１８７；Ｓｐｒｏａｔによる米国特許第５，３３４，７１１号明細書、Ｂｅｉｇｅｌｍａｎらによる１９９５，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７０，２５７０２；Ｂｅｉｇｅｌｍａｎらによる国際公開第９７／２６２７０号；Ｂｅｉｇｅｌｍａｎらによる米国特許第５，７１６，８２４号明細書；Ｕｓｍａｎらによる米国特許第５，６２７，０５３号明細書；Ｗｏｏｌｆらによる国際公開第９８／１３５

２６号；Ｔｈｏｍｐｓｏｎらによる１９９８年４月２０日出願の米国仮特許出願第６０／０８２，４０４号明細書；Ｋａｒｐｅｉｓｋｙらによる１９９８，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，３９，１１３１；ＥａｒｎｓｈａｗおよびＧａｉｔによる１９９８，Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ），４８，３９～５５頁；ＶｅｒｍａおよびＥｃｋｓｔｅｉｎによる１９９８，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，６７，９９～１３４頁；ならびにＢｕｒｌｉｎａらによる１９９７，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，５，１９９９－２０１０が挙げられる。かかる刊行物は、触媒作用を調節することなく、糖修飾、塩基修飾、および／またはリン酸修飾などの核酸分子への組込み位置を決定するための一般的な方法および戦略を記載している。

【０１４２】

一部の例では、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、および／または５’－メチルホスホネート結合を用いたポリ核酸分子のヌクレオチド間結合の化学修飾によって安定性は改善するが、過度の修飾は毒性または活性の低下を引き起こすことがある。それゆえ、核酸分子を設計する場合、これらのヌクレオチド間結合の量は、場合により最小限に抑えられる。そのような場合、これらの結合の濃度の低下は、これら分子の毒性を低下させ、有効性を増加させ、かつ特異性を高める。

【０１４３】

抗体

一部の態様では、抗体またはその抗原結合断片は、ヒト化抗体もしくはその抗原結合断片、マウス抗体もしくはその抗原結合断片、キメラ抗体もしくはその抗原結合断片、モノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片、一価Ｆａｂ’、二価Ｆａｂ２、Ｆ（ａｂ）’３断片、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ビス－ｓｃＦｖ、（ｓｃＦｖ）２、ダイアボディ、ミニボディを含む。ナノボディ、トリアボディ、テトラボディ、ジスルフィド安定化Ｆｖタンパク質（ｄｓＦｖ）、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、Ｉｇ ＮＡＲ、ラクダ科動物抗体もしくはその抗原結合断片、二特異性抗体もしくはその抗原結合断片、またはそれらの化学修飾誘導体を含む。

【０１４４】

一部の例では、抗体は、抗トランスフェリン受容体（抗ＣＤ７１）抗体またはその抗原結合断片である。場合により、抗トランスフェリン受容体抗体は、ヒト化抗体またはその抗原結合断片である。他の場合、抗トランスフェリン受容体抗体は、キメラ抗体またはその抗原結合断片である。さらなる場合、抗トランスフェリン受容体抗体は、一価、二価、もしくは多価の抗体またはその抗原結合断片である。一部の態様では、例示的な抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片には、Ｒ＆Ｄ ＳｙｓｔｅｍｓのＭＡＢ５７４６、Ｂｉｏ－Ｒａｄ ＬａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓのＡＨＰ８５８、Ｂｅｔｈｙｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．のＡ８０－１２８Ａ、およびＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａのＴ２０２７が挙げられる。一部の態様では、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片には、米国特許第１０，９１３，８００号明細書または米国特許第１１，０２８，１７９号明細書に開示される抗体が挙げられる。

【０１４５】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、可変重鎖（ＶＨ）領域および可変軽鎖（ＶＬ）領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、ＥＩＮＰＩＸ１ＧＲＳＮＹＡＸ２ＫＦＱＧ（配列番号１２）の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列であって、Ｘ１がＮまたはＱから選択され、Ｘ２がＱまたはＥから選択される、ＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含む。

【０１４６】

一部の態様では、抗トランスフェリン抗体（ａｎｔｉ－ｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎｇ ａｎｔｉｂｏｄｙ）のＶＨ領域は、表２から選択されるＨＣＤＲ１配列、ＨＣＤＲ２配列、およびＨＣＤＲ３配列を含む。

【０１４７】

【表３】

表 2

名称	HCDR1	配列番号	HCDR2	配列番号	HCDR3	配列番号
13E4_VH1	YTFTNYWMH	17	EINPINGRSNYAQKFQG	18	GTRAMHY	19
13E4_VH2*	YTFTNYWMH	17	EINPINGRSNYAEKFQG	20	GTRAMHY	19
13E4_VH3	YTFTNYWMH	17	EINPIQGRSNYAEKFQG	21	GTRAMHY	19

*13E4_VH2 は、同じ HCDR1、HCDR2、および HCDR3 配列を抗トランスフェリン受容体抗体 13E4_VH4 と共有する

【０１４８】
一部の態様では、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１８、２０、または２１の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含む。一部の例では、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１８の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含む。一部の例では、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２０の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含む。一部の例では、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２１の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含む。
【０１４９】
一部の態様では、抗トランスフェリン受容体抗体のＶＬ領域は、ＲＴＳＥＮＩＹＸ３ＮＬＡ（配列番号１３）の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、ＡＸ４ＴＮＬＡＸ５（配列番号１４）の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、ＱＨＦＷＧＴＰＬＴＸ６（配列番号１５）の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ３はＮまたはＳから選択され、Ｘ４はＡまたはＧから選択され、Ｘ５はＤまたはＥから選択され、Ｘ６は存在するかまたは存在せず、存在する場合はＦである。
【０１５０】
一部の態様では、抗トランスフェリン受容体抗体のＶＬ領域は、表３から選択されるＬＣＤＲ１配列、ＬＣＤＲ２配列、およびＬＣＤＲ３配列を含む。
【０１５１】
【表４】

表 3

名称	LCDR1	配列番号	LCDR2	配列番号	LCDR3	配列番号
13E4_VL1*	RTSENIYNNLA	22	AATNLAD	23	QHFWGTPLT	24
13E4_VL3	RTSENIYNNLA	22	AATNLAE	25	QHFWGTPLTF	26
13E4_VL4	RTSENIYSNLA	27	AGTNLAD	28	QHFWGTPLTF	26

*13E4_VL1 は、同じ LCDR1、LCDR2、および LCDR3 配列を抗トランスフェリン受容体抗体 13E4_VL2 と共有する

【０１５２】
一部の例では、ＶＬ領域は、配列番号１３の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３、２５、または２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４または２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列と

を含み、Ｘ３はＮまたはＳから選択される。
【０１５３】
一部の例では、ＶＬ領域は、配列番号２２または２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号１４の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４または２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ４はＡまたはＧから選択され、Ｘ５はＤまたはＥから選択される。
【０１５４】
一部の例では、ＶＬ領域は、配列番号２２または２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３、２５、または２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号１５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ６は存在するかまたは存在せず、存在する場合はＦである。
【０１５５】
一部の例では、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、ＡＡＴＮＬＡＸ５（配列番号１６）の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号１５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ５はＤまたはＥから選択され、Ｘ６は存在するかまたは存在せず、存在する場合はＦである。
【０１５６】
一部の例では、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。
【０１５７】
一部の例では、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。
【０１５８】
一部の例では、ＶＬ領域は、配列番号２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。
【０１５９】
一部の態様では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１２の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列であって、Ｘ１がＮまたはＱから選択され、Ｘ２がＱまたはＥから選択される、ＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号１３の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号１４の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号１５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ３はＮまたはＳから選択され、Ｘ４はＡまたはＧから選択され、Ｘ５はＤまたはＥから選択され、Ｘ６は存在するかまたは存在せず、存在する場合はＦである。
【０１６０】
一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１２の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列であって、Ｘ１がＮまたはＱから選択され、Ｘ２がＱまたはＥから選択される、ＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号１３の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３、２５、または２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４または２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ３はＮまたはＳから選択される。
【０１６１】
一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、Ｖ

Ｈ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１２の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列であって、Ｘ１がＮまたはＱから選択され、Ｘ２がＱまたはＥから選択される、ＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２または２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号１４の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４または２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ４はＡまたはＧから選択され、Ｘ５はＤまたはＥから選択される。

【０１６２】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１２の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列であって、Ｘ１がＮまたはＱから選択され、Ｘ２がＱまたはＥから選択される、ＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２または２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３、２５、または２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号１５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ６は存在するかまたは存在せず、存在する場合はＦである。

【０１６３】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１２の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列であって、Ｘ１がＮまたはＱから選択され、Ｘ２がＱまたはＥから選択される、ＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号１６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号１５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ５はＤまたはＥから選択され、Ｘ６は存在するかまたは存在せず、存在する場合はＦである。

【０１６４】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１２の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列であって、Ｘ１がＮまたはＱから選択され、Ｘ２がＱまたはＥから選択される、ＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。

【０１６５】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１２の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列であって、Ｘ１がＮまたはＱから選択され、Ｘ２がＱまたはＥから選択される、ＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。

【０１６６】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１２の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列であって、Ｘ１がＮまたはＱから

選択され、Ｘ２がＱまたはＥから選択される、ＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。

【０１６７】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１８の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号１３の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３、２５、または２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４または２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ３はＮまたはＳから選択される。

【０１６８】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１８の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２または２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号１４の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４または２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ４はＡまたはＧから選択され、Ｘ５はＤまたはＥから選択される。

【０１６９】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１８の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２または２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３、２５、または２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号１５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ６は存在するかまたは存在せず、存在する場合はＦである。

【０１７０】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１８の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号１６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号１５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ５はＤまたはＥから選択され、Ｘ６は存在するかまたは存在せず、存在する場合はＦである。

【０１７１】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１８の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。

【０１７２】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、Ｖ

Ｈ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１８の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２１の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。

【０１７３】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号１８の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。

【０１７４】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２０の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号１３の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３、２５、または２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４または２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ３はＮまたはＳから選択される。

【０１７５】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２０の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２または２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号１４の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４または２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ４はＡまたはＧから選択され、Ｘ５はＤまたはＥから選択される。

【０１７６】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２０の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２または２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３、２５、または２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号１５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ６は存在するかまたは存在せず、存在する場合はＦである。

【０１７７】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２０の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号１６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号１５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ５はＤまたはＥから選択され、Ｘ６は存在するかまたは存在せず、存在する場合はＦである。

【０１７８】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２０の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。

【０１７９】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２０の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。

【０１８０】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２０の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。

【０１８１】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２１の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号１３の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３、２５、または２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４または２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ３はＮまたはＳから選択される。

【０１８２】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２１の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２または２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号１４の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４または２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ４はＡまたはＧから選択され、Ｘ５はＤまたはＥから選択される。

【０１８３】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２１の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２または２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３、２５、または２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号１５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ６は存在するかまたは存在せず、存在する場合はＦである。

【０１８４】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２１の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号１６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号１５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含み、Ｘ５はＤまたはＥから選択され、Ｘ６は存在するかまたは存在せず、存在する場合はＦである。

【０１８５】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２１の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２３の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２４の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。

【０１８６】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２１の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２２の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２５の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。

【０１８７】

一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列と、配列番号２１の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列と、配列番号１９の配列を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列とを含み、ＶＬ領域は、配列番号２７の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列と、配列番号２８の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列と、配列番号２６の配列を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列とを含む。

【０１８８】

一部の態様では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域の配列は、配列番号２９～３３から選択される配列に対して約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、ＶＬ領域の配列は、配列番号３４～３８から選択される配列に対して約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。一部の態様では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域の配列は、配列番号２９～３３の配列から選択される配列に対して少なくとも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％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、ＶＬ領域の配列は、配列番号３４～３８の配列から選択される配列に対して少なくとも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％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる。一部の態様では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＶＨ領域およびＶＬ領域を含み、ＶＨ領域の配列は、配列番号２９～３３の配列から選択される配列を含むかまたはそれからなり、ＶＬ領域の配列は、配列番号３４～３８の配列から選択される配列

を含むかまたはそれからなる。

【０１８９】

一部の態様では、ＶＨ領域は、配列番号２９～３３（表４）から選択される配列を含むかまたはそれからなり、ＶＬ領域は、配列番号３４～３８（表５）から選択される配列を含むかまたはそれからなる。表４および表５中の下線領域は、それぞれのＣＤＲ１配列、ＣＤＲ２配列、またはＣＤＲ３配列を示す。

【０１９０】

【表５】

表4

名称	VH配列	配列番号
13E4_VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSS	29
13E4_VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSS	30
13E4_VH3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSLRSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSS	31
13E4_VH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSLRSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSS	32
13E4_VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPINGRSNYGERFKTKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAMHYWGQGTSVTVSS	33

【０１９１】

【表６】

表5

名称	VL配列	配列番号
13E4_VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYNNLAWYQQKPGKSPKLL IYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGT PLTFGGGTKVEIK	34
13E4_VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYNNLAWYQQKPGKAPKLL IYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGT PLTFGGGTKVEIK	35
13E4_VL3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYNNLAWYQQKPGKAPKLL IYAATNLAEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGT PLTFGGGTKVEIK	36
13E4_VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLL IYAGTNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFANYYCQHFWGT PLTFGGGTKVEIK	37
13E4_VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRTSENIYNNLAWYQQKQGKSPQLL VYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGNYYCQHFWG TPLTFGAGTKLELK	38

【０１９２】

一部の態様では、抗トランスフェリン受容体抗体は、表６に例示されるＶＨ領域およびＶＬ領域を含む。

【０１９３】

【表７】

表6

	13E4_VH1 (配列番号29)	13E4_VH2 (配列番号30)	13E4_VH3 (配列番号31)	13E4_VH4 (配列番号32)
13E4_VL1 (配列番号34)	配列番号29 ＋配列番号34	配列番号30 ＋配列番号34	配列番号31 ＋配列番号34	配列番号32 ＋配列番号34
13E4_VL2 (配列番号35)	配列番号29 ＋配列番号35	配列番号30 ＋配列番号35	配列番号31 ＋配列番号35	配列番号32 ＋配列番号35
13E4_VL3 (配列番号36)	配列番号29 ＋配列番号36	配列番号30 ＋配列番号36	配列番号31 ＋配列番号36	配列番号32 ＋配列番号36
13E4_VL4 (配列番号37)	配列番号29 ＋配列番号37	配列番号30 ＋配列番号37	配列番号31 ＋配列番号37	配列番号32 ＋配列番号37

【０１９４】

一部の態様では、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、ＩｇＧフレームワーク、ＩｇＡフレームワーク、ＩｇＥフレームワーク、またはＩｇＭフレームワークを含む。一部の例では、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＩｇＧフレームワーク（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４）を含む。場合により、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＩｇＧ１フレームワークを含む。場合により、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＩｇＧ２（例えば、ＩｇＧ２ａまたはＩｇＧ２ｂ）フレームワークを含む。場合により、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＩｇＧ２ａフレームワークを含む。場合により、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＩｇＧ２ｂフレームワークを含む。場合に

より、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＩｇＧ３フレームワークを含む。場合により、抗トランスフェリン受容体抗体は、ＩｇＧ４フレームワークを含む。

【０１９５】

場合により、抗トランスフェリン受容体抗体は、フレームワーク領域、例えば、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、ヒンジ領域、またはそれらの組合せに１つまたは複数の変異を含む。一部の例では、１つまたは複数の変異は、抗体を安定させる、および／または半減期を延ばすためのものである。一部の例では、１つまたは複数の変異は、Ｆｃ受容体相互作用を調節し、ＦｃγＲ、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）などのＦｃエフェクタ機能を低減または排除するためのものである。さらなる例では、１つまたは複数の変異は、グリコシル化を調節するためのものである。

【０１９６】

一部の態様では、１つまたは複数の変異は、Ｆｃ領域に位置する。一部の例では、Ｆｃ領域は、残基位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、またはそれらの組合せに変異を含む。一部の例では、変異は、Ｌ２３４およびＬ２３５を含む。一部の例では、変異は、Ｌ２３４ＡおよびＬ２３５Ａを含む。場合により、残基位置は、ＩｇＧ１に関する。

【０１９７】

一部の例では、Ｆｃ領域は、残基位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、Ｄ２６５、Ｎ２１、Ｋ４６、Ｌ５２、もしくはＰ５３、またはそれらの組合せに変異を含む。一部の例では、変異は、残基位置Ｋ４６、Ｌ５２、またはＰ５３における変異と組み合わせてＬ２３４およびＬ２３５を含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３４、Ｌ２３５、およびＫ４６に変異を含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３４、Ｌ２３５、およびＬ５２に変異を含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３４、Ｌ２３５、およびＰ５３に変異を含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｄ２６５およびＮ２１に変異を含む。場合により、残基位置は、ＩｇＧ１に関する。

【０１９８】

一部の例では、Ｆｃ領域は、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｄ２６５Ａ、Ｎ２１Ｇ、Ｋ４６Ｇ、Ｌ５２Ｒ、もしくはＰ５３Ｇ、またはそれらの組合せを含む。一部の例では、Ｆｃ領域は、Ｋ４６Ｇ、Ｌ５２Ｒ、またはＰ５３Ｇと組み合わせてＬ２３４ＡおよびＬ２３５Ａを含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、およびＫ４６Ｇを含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、およびＬ５２Ｒを含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、およびＰ５３Ｇを含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｄ２６５ＡおよびＮ２１Ｇを含む。場合により、残基位置は、ＩｇＧ１に関する。

【０１９９】

一部の例では、Ｆｃ領域は、残基位置Ｌ２３５、Ｌ２３６、Ｄ２６５、Ｎ２１、Ｋ４６、Ｌ５２、もしくはＰ５３に変異、または変異の組合せを含む。一部の例では、Ｆｃ領域は、Ｌ２３５およびＬ２３６に変異を含む。一部の例では、Ｆｃ領域は、残基位置Ｋ４６、Ｌ５２、またはＰ５３における変異と組み合わせて、Ｌ２３５およびＬ２３６に変異を含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３５、Ｌ２３６、およびＫ４６に変異を含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３５、Ｌ２３６、およびＬ５２に変異を含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３５、Ｌ２３６、およびＰ５３に変異を含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｄ２６５およびＮ２１に変異を含む。場合により、残基位置は、ＩｇＧ２ｂに関する。

【０２００】

一部の態様では、Ｆｃ領域は、Ｌ２３５Ａ、Ｌ２３６Ａ、Ｄ２６５Ａ、Ｎ２１Ｇ、Ｋ４６Ｇ、Ｌ５２Ｒ、もしくはＰ５３Ｇ、またはそれらの組合せを含む。一部の例では、Ｆｃ領域は、Ｌ２３５ＡおよびＬ２３６Ａを含む。一部の例では、Ｆｃ領域は、Ｋ４６Ｇ、Ｌ５２Ｒ、またはＰ５３Ｇと組み合わせてＬ２３５ＡおよびＬ２３６Ａを含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３５Ａ、Ｌ２３６Ａ、およびＫ４６Ｇを含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３５Ａ、Ｌ２３６Ａ、およびＬ５２Ｒを含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３５Ａ、Ｌ２３６Ａ、およびＰ５３Ｇを含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｄ２６５Ａおよび

Ｎ２１Ｇを含む。場合により、残基位置は、ＩｇＧ２ｂに関する。
【０２０１】
一部の態様では、Ｆｃ領域は、残基位置Ｌ２３３、Ｌ２３４、Ｄ２６４、Ｎ２０、Ｋ４５、Ｌ５１、またはＰ５２に変異を含み、残基は、配列番号３９の２３３位、２３４位、２６４位、２０位、４５位、５１位、および５２位に対応する。一部の例では、Ｆｃ領域は、Ｌ２３３およびＬ２３４に変異を含む。一部の例では、Ｆｃ領域は、残基位置Ｋ４５、Ｌ５１、またはＰ５２における変異と組み合わせて、Ｌ２３３およびＬ２３４に変異を含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３３、Ｌ２３４、およびＫ４５に変異を含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３３、Ｌ２３４、およびＬ５１に変異を含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３３、Ｌ２３４、およびＫ４５に変異を含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３３、Ｌ２３４、およびＰ５２に変異を含む。一部の例では、Ｆｃ領域は、Ｄ２６４およびＮ２０に変異を含む。場合により、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４フレームワークにおける残基Ｌ２３３、Ｌ２３４、Ｄ２６４、Ｎ２０、Ｋ４５、Ｌ５１、またはＰ５２と等価な位置が企図される。場合により、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、またはＩｇＧ４フレームワークにおける配列番号３９の残基Ｌ２３３、Ｌ２３４、Ｄ２６４、Ｎ２０、Ｋ４５、Ｌ５１、またはＰ５２に対応する残基に対する変異も企図される。
【０２０２】
一部の態様では、Ｆｃ領域は、Ｌ２３３Ａ、Ｌ２３４Ａ、Ｄ２６４Ａ、Ｎ２０Ｇ、Ｋ４５Ｇ、Ｌ５１Ｒ、またはＰ５２Ｇを含み、残基は配列番号３９の２３３位、２３４位、２６４位、２０位、４５位、５１位、および５２位に対応する。一部の例では、Ｆｃ領域は、Ｌ２３３ＡおよびＬ２３４Ａを含む。一部の例では、Ｆｃ領域は、Ｋ４５Ｇ、Ｌ５１Ｒ、またはＰ５２Ｇと組み合わせてＬ２３３ＡおよびＬ２３４Ａを含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３３Ａ、Ｌ２３４Ａ、およびＫ４５Ｇを含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３３Ａ、Ｌ２３４Ａ、およびＬ５１Ｒを含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３３Ａ、Ｌ２３４Ａ、およびＫ４５Ｇを含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｌ２３３Ａ、Ｌ２３４Ａ、およびＰ５２Ｇを含む。場合により、Ｆｃ領域は、Ｄ２６４ＡおよびＮ２０Ｇを含む。
【０２０３】
一部の態様では、ヒトＩｇＧ定常領域は、例えば、Ｎａｔｓｕｍｅらによる２００８ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ，６８（１０）：３８６３～７２頁；Ｉｄｕｓｏｇｉｅらによる２００１ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ，１６６（４）：２５７１～５頁；Ｍｏｏｒｅらによる２０１０ ｍＡｂｓ，２（２）：１８１～１８９頁；Ｌａｚａｒらによる２００６ ＰＮＡＳ，１０３（１１）：４００５～４０１０頁；Ｓｈｉｅｌｄｓらによる２００１ ＪＢＣ，２７６（９）：６５９１～６６０４頁；Ｓｔａｖｅｎｈａｇｅｎらによる２００７ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ，６７（１８）：８８８２～８８９０頁；Ｓｔａｖｅｎｈａｇｅｎらによる２００８ Ａｄｖａｎ．Ｅｎｚｙｍｅ Ｒｅｇｕｌ．，４８：１５２～１６４頁；Ａｌｅｇｒｅらによる１９９２ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ，１４８：３４６１～３４６８頁；Ｒｅｖｉｅｗｅｄ ｉｎ Ｋａｎｅｋｏ ａｎｄ Ｎｉｗａ，２０１１ Ｂｉｏｄｒｕｇｓ，２５（１）：１～１１頁に記載されるアミノ酸修飾を用いて、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を変化させるように修飾される。
【０２０４】
一部の態様では、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、重鎖（ＨＣ）および軽鎖（ＬＣ）を含む完全長抗体である。場合により、重鎖（ＨＣ）は、表７から選択される配列を含む。場合により、軽鎖（ＬＣ）は、表８から選択される配列を含む。下線領域はそれぞれのＣＤＲを示す。
【０２０５】

【表８－１】

表7

名称	HC配列	配列番号
13E4_VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	39
13E4_VH1_a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	40
13E4_VH1_b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKC**G**VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	41
13E4_VH1_c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKA**R**PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	42
13E4_VH1_d	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**G**APIEKTISKAKGQPREPQVYT	43

【０２０６】

【表８－２】

	LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG	
13E4_VH1_e	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV **A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**G**STYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG	44
13E4_VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSRLR SDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	45
13E4_VH2_a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSRLR SDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	46
13E4_VH2_b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSRLR SDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKC**G**VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	47
13E4_VH2_c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSRLR SDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV	48

【０２０７】

【表８－３】

	LHQDWLNGKEYKCKVSNKA**R**PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	
13E4_VH2_d	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSRLR SDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**G**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	49
13E4_VH2_e	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSRLR SDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A** VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**G**STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	50
13E4_VH3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSL RSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	51
13E4_VH3_a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSL RSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	52
13E4_VH3_b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSL RSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV	53

【０２０８】

【表８－４】

	LHQDWLNGKEYKC**G**VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	
13E4_VH3_c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSL RSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKA**R**PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	54
13E4_VH3_d	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSL RSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**G**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	55
13E4_VH3_e	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSL RSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A** VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**G**STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	56
13E4_VH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSL RSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	57
13E4_VH4_a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSL RSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD	58

【０２０９】

【表８－５】

	VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	
13E4_VH4_b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSL RSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKC**G**VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	59
13E4_VH4_c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSL RSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKA**R**PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	60
13E4_VH4_d	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSL RSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**G**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	61
13E4_VH4_e	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPG QGLEWMGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMELSSL RSEDTATYYCARGTRAMHYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A** VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**G**STYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	62

【０２１０】

【表９】

表8

名称	LC配列	配列番号
13E4_VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYNNLAWYQQKPGKSPK LLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHF WGTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	63
13E4_VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYNNLAWYQQKPGKAPK LLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHF WGTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	64
13E4_VL3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYNNLAWYQQKPGKAPK LLIYAATNLAEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHF WGTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	65
13E4_VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKAPK LLIYAGTNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFANYYCQH FWGTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	66

【０２１１】

一部の態様では、本明細書に記載の抗トランスフェリン受容体抗体は、参照の抗トランスフェリン受容体抗体と比較して血清半減期が改善されている。一部の例では、改善された血清半減期は、参照の抗トランスフェリン受容体抗体よりも少なくとも３０分、１時間、１．５時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１２時間、１８時間、２４時間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、１４日間、３０日間、またはそれ以上長い。

【０２１２】

一部の態様では、抗体またはその抗原結合断片は、当該技術分野で公知の従来技法を使用して、例えば、アミノ酸の欠失、挿入、置換、付加の使用によって、ならびに／または組換えおよび／もしくは当該技術分野で公知の他のあらゆる修飾（例えば、グリコシル化およびリン酸化などの翻訳後修飾および化学的修飾）を単独または組合せで使用することによってさらに修飾される。一部の例では、修飾は、Ｆｃ受容体との相互作用を調節するための修飾をさらに含む。一部の例では、１つまたは複数の修飾は、例えば、ＦｃドメインとＦｃＲｎ受容体との相互作用に関与するアミノ酸残基を開示する国際公開第９７／３４６３１号に記載される修飾を含む。抗体またはその結合断片のアミノ酸配列の基礎をなす核酸配列にそのような修飾を導入するための方法は、当業者に周知である。

【０２１３】

一部の例では、抗体またはその抗原結合断片は、その誘導体をさらに包含し、かつ、少なくとも１つのＣＤＲを含有するポリペプチド配列を含む。

【０２１４】

一部の例では、「単鎖」という用語は、本明細書で使用する場合、二特異性単鎖構築物の第１および第２のドメインが、好ましくは単一の核酸分子によってコード可能な共線状アミノ酸配列の形態で共有結合されていることを意味する。

【０２１５】
一部の例では、二特異性の単鎖抗体構築物は、２つの抗体由来結合ドメインを含む構築物に関する。このような実施形態では、二重特異性の単鎖抗体構築物は、ｂｉ－ｓｃＦｖまたはダイアボディに対してタンデムである。一部の例では、ｓｃＦｖは、リンカーペプチドによって接続されたＶＨおよびＶＬドメインを含む。一部の例では、リンカーは、第１および第２のドメインのそれぞれが、互いに独立してそれらの異なる結合特異性を確実に保持できるようにするのに十分な長さおよび配列を持つ。
【０２１６】
一部の態様では、結合または相互作用は、本明細書で使用される場合、少なくとも２つの抗原相互作用部位が互いに結合／相互作用することを定義する。一部の例では、抗原相互作用部位は、特異的な抗原または特異的な抗原群との特異的な相互作用の能力を示す、ポリペプチドのモチーフを定義する。場合により、結合／相互作用はまた、特異的な認識を定義すると理解される。そのような場合、特異的な認識は、抗体またはその結合断片が、標的分子のそれぞれの少なくとも２つのアミノ酸と特異的に相互作用かつ／または結合することができるかどうかを指す。例えば、特異的な認識は、抗体分子の特異性、または抗体分子が標的分子の特異的領域を判別する能力に関する。さらなる例では、抗原相互作用部位とその特異的抗原との特異的な相互作用は、例えば、抗原の立体構造の変化の誘導、抗原のオリゴマー化などに起因して、シグナルの開始をもたらす。さらなる態様では、結合は、「キーロック原理（ｋｅｙ－ｌｏｃｋ－ｐｒｉｎｃｉｐｌｅ）」の特異性によって例証される。このため、一部の例では、抗原相互作用部位および抗原のアミノ酸配列における特定のモチーフは、それらの一次構造、二次構造、または三次構造の結果として、ならびにこれら構造の二次修飾の結果として、互いに結合する。そのような場合、抗原相互作用部位とその特異的抗原との特異的な相互作用は、同様に抗原に対する部位の単純な結合をもたらす。
【０２１７】
一部の例では、特異的な相互作用は、抗体またはその結合断片の交差反応性の低下、またはオフターゲット効果の低下をさらに指す。例えば、目的のポリペプチド／タンパク質に結合するが、他のポリペプチドのいずれにも結合または本質的に結合しない、抗体またはその抗原結合断片は、目的のポリペプチド／タンパク質に特異的であると考慮される。抗原相互作用部位と特異的抗原との特異的な相互作用の例には、その受容体に対するリガンドの特異性、例えば、抗原決定基（エピトープ）と抗体の抗原結合部位との相互作用が含まれる。
【０２１８】
このため、一部の例では、ポリ核酸分子コンジュゲートは、配列番号１００～１３３から選択される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなるポリ核酸分子（例えば、ＰＭＯ分子）と、ポリ核酸分子コンジュゲートがＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡのエクソンスキッピングを誘導するようにポリ核酸にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片とを含む。
【０２１９】
ある特定の態様では、ポリ核酸分子コンジュゲートは、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物の標的領域の配列にハイブリダイズするポリ核酸分子（例えば、ＰＭＯ分子）にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含み、ポリ核酸分子は、配列番号１００～１３３から選択される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなるセンス鎖を有し、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片は、可変重鎖（ＶＨ）領域および可変軽鎖（ＶＬ）領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列、配列番号２０を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列、および配列番号１９を

含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列を含み、ＶＬ領域は、配列番号２２を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列、配列番号２３を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列、および配列番号２４を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列を含み、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片およびポリ核酸分子は、４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－アミデート（ＳＭＣＣ）を含むリンカーを介してコンジュゲートされる。

【０２２０】

ある特定の態様では、ポリ核酸分子コンジュゲートは、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物の標的領域の配列にハイブリダイズするポリ核酸分子（例えば、ＰＭＯ分子）にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含み、ポリ核酸分子は、配列番号１００～１３３から選択される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片は、可変重鎖（ＶＨ）領域および可変軽鎖（ＶＬ）領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号３０に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、ＶＬ領域は、配列番号３４に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片およびポリ核酸分子は、マレイミドリンカーを介してコンジュゲートされる。

【０２２１】

ある特定の態様では、ポリ核酸分子コンジュゲートは、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物の標的領域の配列にハイブリダイズするポリ核酸分子（例えば、ＰＭＯ分子）にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含み、ポリ核酸分子は、配列番号１００～１３３から選択される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、ポリ核酸分子は、５’末端に少なくとも３、４、５、または６つの連続する２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチド、および少なくとも２つ、少なくとも３つの２’－Ｆ修飾ヌクレオチドを含み、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片は、可変重鎖（ＶＨ）領域および可変軽鎖（ＶＬ）領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号３０に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、ＶＬ領域は、配列番号３４に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片およびポリ核酸分子は、マレイミドリンカーを介してコンジュゲートされる。

【０２２２】

ある特定の態様では、ポリ核酸分子コンジュゲートは、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物の標的領域の配列にハイブリダイズするポリ核酸分子（例えば、ＰＭＯ分子）にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含み、ポリ核酸分子は、配列番号１００～１３３から選択される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、ポリ核酸分子は、ポリ核酸分子の３’末端に少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、または少なくとも５つの連続する２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチド、および少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つの２’－Ｆ修飾ヌクレオチドを含み、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片は、可変重鎖（ＶＨ）領域および可変軽鎖（ＶＬ）領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列、配列番号２０を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列、および配列番号１９を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列を含み、ＶＬ領域は、配列番号２２を含むかま

たはそれからなるＬＣＤＲ１配列、配列番号２３を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列、および配列番号２４を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列を含み、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片およびポリ核酸分子は、マレイミドリンカーを介してコンジュゲートされる。

【０２２３】

ある特定の態様では、ポリ核酸分子コンジュゲートは、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物の標的領域の配列にハイブリダイズするポリ核酸分子（例えば、ＰＭＯ分子）にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含み、ポリ核酸分子は、配列番号１００～１３３から選択される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、ポリ核酸分子は、ポリ核酸分子の５’末端および／または３’末端に１つまたは複数の２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含み、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片は、可変重鎖（ＶＨ）領域および可変軽鎖（ＶＬ）領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号１７を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ１配列、配列番号１８を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ２配列、および配列番号１９を含むかまたはそれからなるＨＣＤＲ３配列を含み、ＶＬ領域は、配列番号２２を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ１配列、配列番号３を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ２配列、および配列番号２４を含むかまたはそれからなるＬＣＤＲ３配列を含み、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片およびポリ核酸分子は、マレイミドリンカーを介してコンジュゲートされる。

【０２２４】

ある特定の態様では、ポリ核酸分子コンジュゲートは、ＤＭＤ遺伝子のｐｒｅ－ｍＲＮＡ転写物の標的配列にハイブリダイズするポリ核酸分子（例えば、ＰＭＯ分子）にコンジュゲートされた抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片を含み、ポリ核酸分子は、配列番号１００～１３３から選択される配列に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片は、可変重鎖（ＶＨ）領域および可変軽鎖（ＶＬ）領域を含み、ＶＨ領域は、配列番号２９～３３のうち１つに対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、ＶＬ領域は、配列番号３４～３８に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列を含むかまたはそれからなり、抗トランスフェリン受容体抗体またはその抗原結合断片およびポリ核酸分子は、６－アミノ－１－ヘキサノールリンカーを介してコンジュゲートされる。一部の例では、ポリ核酸分子は、少なくとも１つまたは複数の２’－修飾ヌクレオチドを含む。一部の例では、ポリ核酸分子は、３’末端に少なくとも５つの連続する２’－Ｏ－メチル修飾ヌクレオチドを含む。一部の例では、ポリ核酸分子は、少なくとも３つまたは少なくとも４つの２’－Ｆ修飾ヌクレオチドを含み、少なくとも３つまたは少なくとも４つの２’－Ｆ修飾ヌクレオチドのうちいずれか２つは、連続していない。

【０２２５】

一部の態様では、抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に開示されるＰＭＯ分子のうちいずれかに非特異的にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体またはその抗原結合断片は、非部位特異的に、リシン残基またはシステイン残基を介して本明細書に開示されるＰＭＯ分子のうちいずれかにコンジュゲートされる。一部の例では、抗体またはその抗原結合断片は、非部位特異的に、リシン残基を介して本明細書に開示されるＰＭＯ分子のうちいずれかにコンジュゲートされる。場合により、抗体またはその抗原結合断片は、非部位特異的に、システイン残基を介して本明細書に開示されるＰＭＯ分子のうちいずれかにコンジュゲートされる。

【０２２６】

一部の態様では、抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に開示されるＰＭＯ分子のうちいずれかに部位特異的にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体またはその抗原結合断片は、リシン残基を介して、システイン残基を介して、５’末端において、３’末端において、非天然アミノ酸を介して、または酵素修飾残基もしくは酵素触媒型残基を介して、部位特異的に本明細書に開示されるＰＭＯ分子のうちいずれかにコンジュゲートされる。一部の例では、抗体またはその抗原結合断片は、部位特異的に、リシン残基を介して本明細書に開示されるＰＭＯ分子のうちいずれかにコンジュゲートされる。一部の例では、抗体またはその抗原結合断片は、部位特異的に、システイン残基を介して本明細書に開示されるＰＭＯ分子のうちいずれかにコンジュゲートされる。一部の例では、抗体またはその抗原結合断片は、部位特異的に、５’末端において本明細書に開示されるＰＭＯ分子のうちいずれかにコンジュゲートされる。一部の例では、抗体またはその抗原結合断片は、部位特異的に、３’末端において本明細書に開示されるＰＭＯ分子のうちいずれかにコンジュゲートされる。一部の例では、抗体またはその抗原結合断片は、部位特異的に、非天然アミノ酸を介して本明細書に開示されるＰＭＯ分子のうちいずれかにコンジュゲートされる。一部の例では、抗体またはその抗原結合断片は、部位特異的に、酵素修飾残基または酵素触媒型残基を介して本明細書に開示されるＰＭＯ分子のうちいずれかにコンジュゲートされる。

【０２２７】

一部の態様では、１つまたは複数のＰＭＯ分子は、本明細書に開示される抗体またはその抗原結合断片のいずれかにコンジュゲートされる。一部の例では、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６個、またはそれ以上のＰＭＯ分子が、抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約１個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約２個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約３個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約４個のＰＭＯ分子が、１つにコンジュゲートされる。一部の例では、約５個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約６個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約７個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約８個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。

【０２２８】

一部の態様では、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のＰＭＯ分子が、抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、少なくとも１個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、少なくとも２個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、少なくとも３個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、少なくとも４個のＰＭＯ分子が、１つにコンジュゲートされる。一部の例では、少なくとも５個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、少なくとも６個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、少なくとも７個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、少なくとも８個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。

【０２２９】

一部の例では、約１～約１６個のＰＭＯ分子が、抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約２～約１５個のＰＭＯ分子が、抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約３～約１４個のＰＭＯ分子が、抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約４～約１３個のＰＭＯ

分子が、抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約５～約１２個のＰＭＯ分子が、抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約６～約１１個のＰＭＯ分子が、抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約７～約１０個のＰＭＯ分子が、抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、約８～約９個のＰＭＯ分子が、抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。

【０２３０】

一部の態様では、平均で１または複数個のＰＭＯ分子が、抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６個、またはそれ以上のＰＭＯ分子が、抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で約１個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で約２個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で約３個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で約４個のＰＭＯ分子が、１つにコンジュゲートされる。一部の例では、平均で約５個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で約６個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で約７個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で約８個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。

【０２３１】

一部の例では、平均で少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、または１７個のＰＭＯ分子が、抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で少なくとも１個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で少なくとも２個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で少なくとも３個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で少なくとも４個のＰＭＯ分子が、１つにコンジュゲートされる。一部の例では、平均で少なくとも５個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で少なくとも６個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で少なくとも７個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。一部の例では、平均で少なくとも８個のＰＭＯ分子が、１つの抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートされる。

【０２３２】

一部の態様では、抗体にコンジュゲートされるＰＭＯ分子の数は、一定の比を形成する。一部の例では、この比はＤＡＲ（薬物対抗体）比と称され、ここで言及される薬物はＰＭＯ分子である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体のＤＡＲ比は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、またはそれ以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体のＤＡＲ比は、約１以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体のＤＡＲ比は、約２以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体のＤＡＲ比は、約３以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体のＤＡＲ比は、約４以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体のＤＡＲ比は、約５以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体のＤＡＲ比は、約６以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体のＤＡＲ比は、約７以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体のＤＡＲ比は、約８以上である。

【０２３３】

一部の態様では、抗体にコンジュゲートされるＰＭＯ分子の平均数は、一定の平均比を形成する。一部の例では、平均比は平均ＤＡＲ（薬物対抗体）比と称され、ここで言及さ

れる薬物はＰＭＯ分子である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、またはそれ以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約１以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約２以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約３以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約４以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約５以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約６以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約７以上である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、約８以上である。

【０２３４】

一部の態様では、抗体にコンジュゲートされるＰＭＯ分子の平均数は、一定の平均比を形成する。一部の例では、平均比は平均ＤＡＲ（薬物対抗体）比と称され、ここで言及される薬物はＰＭＯ分子である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、１．５～２．５、２．５～３．５、３．５～４．５、４．５～５．５、５．５～６．５、６．５～７．５、７．５～８．５、８．５～９．５、９．５～１０．５、１０．５～１１．５、１１．５～１２．５、１２．５～１３．５、１３．５～１４．５、１４．５～１５．５、１５．５～１６．５、または１６．５～１７．５の範囲である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、１．５～２．５の範囲である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、２．５～３．５の範囲である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、３．５～４．５の範囲である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、４．５～５．５の範囲である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、５．５～６．５の範囲である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、６．５～７．５の範囲である。一部の例では、ＰＭＯ分子対抗体の平均ＤＡＲ比は、７．５～８．５の範囲である。

【０２３５】

コンジュゲーション化学

【０２３６】

一部の態様では、本明細書に開示されるポリ核酸分子（例えば、ＰＭＯ）は、抗体（例えば、本明細書に開示される抗体）にコンジュゲートされる。一部の例では、抗体は、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、抗原、毒素、ホルモン、脂質、ヌクレオチド、ヌクレオシド、糖、炭水化物、ポリエチレングリコールやポリプロピレングリコールなどのポリマーのほか、これらのクラスの物質のすべての類似体または誘導体を含む。抗体のさらなる例には、コレステロール、リン脂質、ジアシルグリセロールおよびトリアシルグリセロール、脂肪酸、炭化水素（例えば、飽和であるか、不飽和であるか、または置換を含有する）、酵素基質、ビオチン、ジゴキシゲニン、および多糖類などのステロイドも含まれる。一部の例では、ポリ核酸分子は、ポリマー、および任意選択でエンドソーム溶解性部分にさらにコンジュゲートされる。

【０２３７】

一部の態様では、ポリ核酸分子は、化学ライゲーションプロセスによって抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、ポリ核酸分子は、天然ライゲーションによって抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、コンジュゲーションは、Ｄａｗｓｏｎらによる「Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｂｙ ｎａｔｉｖｅ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｌｉｇａｔｉｏｎ」，Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９４，２６６，７７６～７７９頁；Ｄａｗｓｏｎらによる「Ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｒｅａｃｔｉｖｉｔｙ ｉｎ Ｎａｔｉｖｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｌｉｇａｔｉｏｎ ｔｈｒｏｕｇｈ ｔｈｅ Ｕｓｅ ｏｆ Ｔｈｉｏｌ Ａｄｄｉｔｉｖｅｓ」，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１９９７，１１９，４３２５～４３２９頁；Ｈａｃｋｅｎｇらによる「Ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｂｙ ｎａｔｉｖｅ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｌｉｇａｔｉｏｎ：Ｅｘｐａｎｄｅｄ ｓｃｏｐｅ ｂｙ ｕｓｉｎｇ ｓｔｒａｉｇｈｔｆｏｒｗａｒｄ ｍｅｔｈｏｄｏｌｏｇｙ．」，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９９９，９６，１００６８～１０

０７３頁；またはＷｕらによる「Ｂｕｉｌｄｉｎｇ ｃｏｍｐｌｅｘ ｇｌｙｃｏｐｅｐｔｉｄｅｓ：Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ａ ｃｙｓｔｅｉｎｅ－ｆｒｅｅ ｎａｔｉｖｅ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｌｉｇａｔｉｏｎ ｐｒｏｔｏｃｏｌ」，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．２００６，４５，４１１６～４１２５頁に記載されるとおりである。一部の例では、コンジュゲーションは、米国特許第８，９３６，９１０号明細書に記載されるとおりである。一部の態様では、ポリ核酸分子は、天然ライゲーション化学を介して、部位特異的または非特異的のいずれかで抗体にコンジュゲートされる。

【０２３８】

一部の例では、ポリ核酸分子は、「トレースレス」カップリング技術（Ｐｈｉｌｏｃｈｅｍ）を利用する部位特異的方法によって抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、「トレースレス」カップリング技術は、後にアルデヒド基を含有するポリ核酸分子でコンジュゲートされる抗体上のＮ末端１，２－アミノチオール基を利用する（Ｃａｓｉらによる「Ｓｉｔｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｔｒａｃｅｌｅｓｓ ｃｏｕｐｌｉｎｇ ｏｆ ｐｏｔｅｎｔ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ ｄｒｕｇｓ ｔｏ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ ｐｈａｒｍａｃｏｄｅｌｉｖｅｒｙ」，ＪＡＣＳ １３４（１３）：５８８７～５８９２頁（２０１２）を参照）。

【０２３９】

一部の例では、ポリ核酸分子は、抗体に組み込まれた非天然アミノ酸を利用する部位特異的方法によって抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、非天然アミノ酸は、ｐ－アセチルフェニルアラニン（ｐＡｃＰｈｅ）を含む。一部の例では、ｐＡｃＰｈｅのケト基は、アルコキシ－アミン誘導体コンジュゲート部分に選択的にカップリングされて、オキシム結合を形成する（Ａｘｕｐらによる「Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｓｉｔｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｕｓｉｎｇ ｕｎｎａｔｕｒａｌ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄｓ」，ＰＮＡＳ １０９（４０）：１６１０１～１６１０６頁（２０１２）を参照）。

【０２４０】

一部の例では、ポリ核酸分子は、酵素触媒型プロセスを利用する部位特異的方法によって抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、部位特異的方法は、ＳＭＡＲＴａｇ（商標）技術（Ｒｅｄｗｏｏｄ）を利用する。一部の例では、ＳＭＡＲＴａｇ（商標）技術は、アルデヒドタグの存在下での酸化プロセスによるホルミルグリシン生成酵素（ＦＧＥ）によるシステインからのホルミルグリシン（ＦＧｌｙ）残基の生成と、その後のｈｙｄｒａｚｉｎｏ－Ｐｉｃｔｅｔ－Ｓｐｅｎｇｌｅｒ（ＨＩＰＳ）ライゲーションによるアルキルヒドライン（ａｌｋｙｌｈｙｄｒａｉｎｅ）官能化ポリ核酸分子に対するＦＧｌｙのコンジュゲーションとを含む（Ｗｕらによる「Ｓｉｔｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｐｒｏｄｕｃｅｄ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｃｅｌｌｓ ｂｙ ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ ｇｅｎｅｔｉｃａｌｌｙ ｅｎｃｏｄｅｄ ａｌｄｅｈｙｄｅ ｔａｇ」，ＰＮＡＳ １０６（９）：３０００～３００５頁（２００９）；Ａｇａｒｗａｌらによる「Ａ Ｐｉｃｔｅｔ－Ｓｐｅｎｇｌｅｒ ｌｉｇａｔｉｏｎ ｆｏｒ ｐｒｏｔｅｉｎ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ」，ＰＮＡＳ １１０（１）：４６～５１頁（２０１３）を参照）。

【０２４１】

一部の例では、酵素触媒型プロセスは、微生物トランスグルタミナーゼ（ｍＴＧ）を含む。場合により、ポリ核酸分子は、微生物トランスグルタミナーゼ（ｔｒａｎｓｇｌｕｔａｍｉｎｚｅ）触媒型プロセスを利用して抗体にコンジュゲートされる。一部の例では、ｍＴＧは、認識配列内のグルタミンのアミド側鎖と官能化ポリ核酸分子の第１級アミンとの間における共有結合の形成を触媒する。一部の例では、ｍＴＧはストレプトミセス・モバレンシス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｍｏｂａｒｅｎｓｉｓ）から産生される（Ｓｔｒｏｐらによる「Ｌｏｃａｔｉｏｎ ｍａｔｔｅｒｓ：ｓｉｔｅ ｏｆ ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ ｍｏｄｕｌａｔｅｓ ｓｔａｂｉｌｉｔｙ ａｎｄ ｐｈａｒｍａｃｏｋｉｎ

ｅｔｉｃｓ ｏｆ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ」，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２０（２）１６１～１６７頁（２０１３）を参照）。

【０２４２】

一部の例では、ポリ核酸分子は、配列特異的トランスペプチダーゼを利用する、国際公開第２０１４／１４０３１７号に記載の方法によって抗体にコンジュゲートされる。

【０２４３】

一部の例では、ポリ核酸分子は、米国特許出願第２０１５／０１０５５３９号明細書および同第２０１５／０１０５５４０号明細書に記載の方法によって抗体にコンジュゲートされる。

【０２４４】

抗体またはその抗原結合断片の産生

一部の態様では、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、抗体および抗原結合断片）は、ポリペプチド（例えば、抗体）の合成に有用であると当該技術分野で公知であるいずれかの方法を使用して、具体的には、化学合成または組換え発現によって産生され、好ましくは組換え発現技術によって産生される。

【０２４５】

一部の例では、抗体またはその抗原結合断片は組換え発現され、抗体または抗原結合断片をコードする核酸は、（例えば、Ｋｕｔｍｅｉｅｒらによる１９９４，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １７：２４２に記載されるように）化学合成されたオリゴヌクレオチドから構築され、これには、配列のうち抗体をコードする部分を含有する重複オリゴヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよびライゲーション、その後にＰＣＲによるライゲートされたオリゴヌクレオチドの増幅が含まれる。

【０２４６】

代替的に、抗体をコードする核酸分子は、配列の３’末端および５’末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するＰＣＲ増幅によって、または特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって、適切なソース（例えば、抗体ｃＤＮＡライブラリ、または免疫グロブリンを発現するあらゆる組織もしくは細胞から生成されたｃＤＮＡライブラリ）から任意選択的に生成される。

【０２４７】

一部の例では、抗体またはその抗原結合断片は、ポリクローナル抗体を生成するためにウサギなどの動物を免疫化することによって、またはより好ましくは、例えばＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５，Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５～４９７頁）、もしくはＫｏｚｂｏｒら（１９８３，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ ４：７２頁）、もしくはＣｏｌｅら（１９８５ ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，７７～９６頁）に記載されるようにモノクローナル抗体を生成することによって任意選択的に生成される。代替的に、抗体の少なくともＦａｂ部分をコードするクローンは、特異的抗原に結合するＦａｂ断片のクローンについて（例えば、Ｈｕｓｅらによる１９８９，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５～１２８１頁に記載されるように）Ｆａｂ発現ライブラリをスクリーニングすることによって、または抗体ライブラリをスクリーニングすることによって任意選択的に得られる（例えば、Ｃｌａｃｋｓｏｎらによる１９９１，Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４頁；Ｈａｎｅらによる１９９７ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９４：４９３７を参照）。

【０２４８】

一部の態様では、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子とともにスプライシングすることによる「キメラ抗体」（Ｍｏｒｒｉｓｏｎらによる１９８４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８１：８５１～８５５頁；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒらによる１９８４，Ｎａｔｕｒｅ ３１２：６０４～６０８頁；Ｔａｋｅｄａらによる１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１４：４５２～４５４頁）の産生のために開発された技術が使用される。キメラ抗体は、マウスモノクローナル抗

体に由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域、例えばヒト化抗体を有するものなど、様々な部分が様々な動物種に由来する分子である。

【０２４９】

一部の態様では、単鎖抗体の産生について記載される技術（米国特許第４，６９４，７７８号明細書；Ｂｉｒｄによる１９８８，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３～４２頁；Ｈｕｓｔｏｎらによる１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：５８７９～５８８３頁；Ｗａｒｄらによる１９８９，Ｎａｔｕｒｅ ３３４：５４４～５４頁）は、単鎖抗体を産生するのに適している。単鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してＦｖ領域の重鎖断片および軽鎖断片を連結し、単鎖ポリペプチドをもたらすことによって形成される。大腸菌中で機能的Ｆｖ断片を構築するための技術も任意選択で使用される（Ｓｋｅｒｒａらによる１９８８，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：１０３８～１０４１頁）。

【０２５０】

一部の態様では、抗体のヌクレオチド配列を含む発現ベクター、または抗体のヌクレオチド配列は、従来技術（例えば、エレクトロポレーション、リポソームトランスフェクション、およびリン酸カルシウム沈降）によって宿主細胞に形質移入され、次いで、トランスフェクトされた細胞は従来技術によって培養され、抗体を産生する。特定の態様では、抗体の発現は、構成的プロモータ、誘導性プロモータ、または組織特異的プロモータによって調節される。

【０２５１】

一部の態様では、様々な宿主発現ベクター系が、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合断片を発現させるために利用される。このような宿主発現系は、抗体のコード配列が産生されて後に精製されるビヒクルを表すが、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトされた場合に抗体またはその結合断片をｉｎ ｓｉｔｕで発現する細胞も表す。これらには、抗体もしくはその結合断片コード配列を含有する組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、もしくはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）および枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ））；抗体またはその結合断片コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母菌（例えば、サッカロミセス・ピキア（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ Ｐｉｃｈｉａ））；抗体またはその結合断片コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）およびタバコモザイクウイルス（ＴＭＶ））を感染させたか、または抗体もしくはその結合断片コード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えばＴｉプラスミド）で形質転換された植物細胞系；または哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモータ（例えば、メタロチオネインプロモータ）もしくは哺乳動物ウイルスに由来するプロモータ（例えば、アデノウイルス後期プロモータ、ワクシニアウイルス７．５Ｋプロモータ）を含有する組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系（例えば、ＣＯＳ細胞、ＣＨＯ細胞、ＢＨ細胞、２９３細胞、２９３Ｔ細胞、３Ｔ３細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２５２】

組換えタンパク質を長期的に高収率で産生するには、安定した発現が好ましい。一部の例では、抗体を安定に発現する細胞株は、任意選択で操作される。宿主細胞は、ウイルス複製起点を含有する発現ベクターを使用するのではなく、適切な発現制御要素（例えば、プロモータ、エンハンサ、配列、転写ターミネータ、ポリアデニル化部位など）および選択可能なマーカによって制御されるＤＮＡで形質転換される。外来ＤＮＡの導入後、操作された細胞は濃縮培地中で１～２日間成長させられ、次いで選択培地に切り替えられる。組換えプラスミド中の選択可能なマーカは、選択に対する耐性を付与し、細胞がその染色体中にプラスミドを安定して組み込み成長することで、後にクローニングされ細胞株に拡張される病巣を形成することを可能にする。この方法は、有利には、抗体またはその結合断片を発現する細胞株を操作するために使用することができる。

【０２５３】

一部の例では、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Ｗｉｇｌｅｒらによる１９７７，Ｃｅｌｌ　１１：２２３頁）、ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｓｚｙｂａｌｓｋａ　＆Ｓｚｙｂａｌｓｋｉによる１９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　４８：２０２頁）、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ｌｏｗｙらによる１９８０，Ｃｅｌｌ　２２：８１７頁）の遺伝子を含むがこれらに限定されない、いくつかの選択系が、それぞれｔｋ細胞、ｈｇｐｒｔ細胞、またはａｐｒｔ細胞に使用される。また、代謝拮抗物質耐性も、以下の遺伝子の選択の基礎として使用される：メトトレキサートに対する体制を付与するｄｈｆｉｒ（Ｗｉｇｌｅｒらによる１９８０，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７：３５７頁；Ｏ’Ｈａｒｅらによる１９８１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：１５２７頁）、ミコフェノール酸に対する耐性を付与するｇｐｔ（Ｍｕｌｌｉｇａｎ　＆　Ｂｅｒｇによる１９８１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７８：２０７２頁）、アミノグリコシドＧ－４１８に対する耐性を付与するｎｅｏ（Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｐｈａｒｍａｃｙ　１２：４８８～５０５頁；Ｗｕ　ａｎｄ　Ｗｕによる１９９１，Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ　３：８７～９５頁；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖによる１９９３，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２：５７３～５９６頁；Ｍｕｌｌｉｇａｎ，１９９３，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６０：９２６～９３２頁；ならびにＭｏｒｇａｎおよびＡｎｄｅｒｓｏｎによる１９９３，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１～２１７頁；Ｍａｙによる１９９３，ＴＩＢ　ＴＥＣＨ　１１（５）：１５５～２１５頁）、およびヒグロマイシンに対する耐性を付与するｈｙｇｒｏ（Ｓａｎｔｅｒｒｅらによる１９８４，Ｇｅｎｅ　３０：１４７頁）。使用可能な組換えＤＮＡ技術の分野で周知の方法は、Ａｕｓｕｂｅｌら（編集）の１９９３，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，ＮＹ；Ｋｒｉｅｇｌｅｒによる１９９０，Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ　ａｎｄ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ　Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ；およびＤｒａｃｏｐｏｌｉら（編集）の１９９４，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，ＮＹ．の第１２および１３章；Ｃｏｌｂｅｒｒｅ－Ｇａｒａｐｉｎらによる１９８１，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５０：１）に記載されている。

【０２５４】

一部の例では、抗体の発現レベルは、ベクター増幅によって上昇する（概説については、ＢｅｂｂｉｎｇｔｏｎおよびＨｅｎｔｓｃｈｅｌによる、Ｔｈｅ　ｕｓｅ　ｏｆ　ｖｅｃｔｏｒｓ　ｂａｓｅｄ　ｏｎ　ｇｅｎｅ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｏｆ　ｃｌｏｎｅｄ　ｇｅｎｅｓ　ｉｎ　ｍａｍｍａｌｉａｎ　ｃｅｌｌｓ　ｉｎ　ＤＮＡ　ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｖｏｌ．３．（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９８７）を参照）。抗体を発現するベクター系内のマーカが増幅可能である場合、宿主細胞の培養物中に存在する阻害剤のレベルが上昇すると、マーカ遺伝子のコピー数が増加する。増幅された領域は抗体のヌクレオチド配列と関連付けられるため、抗体の産生も増加する（Ｃｒｏｕｓｅらによる１９８３，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．３：２５７）。

【０２５５】

一部の例では、抗体または抗体コンジュゲートの精製または分析について当該技術分野で公知のいずれかの方法が、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、特にプロテインＡより後の特異的抗原に対する親和性による親和性クロマトグラフィー、およびサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質の精製における他のいずれかの標準技法によって使用される。例示的なクロマトグラフィー方法には、強陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、および高速タンパク質液体クロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２５６】

リンカー
一部の態様では、本明細書に記載のリンカーは、切断可能リンカーまたは切断不能リンカーである。一部の例では、リンカーは、切断可能リンカーである。他の例では、リンカーは、切断不能リンカーである。
【０２５７】
場合により、リンカーは非ポリマーリンカーである。非ポリマーリンカーは、重合プロセスによって生成されるモノマーの繰返し単位を含有しないリンカーを指す。例示的な非ポリマーリンカーとして、Ｃ１－Ｃ６アルキル基（例えば、Ｃ５、Ｃ４、Ｃ３、Ｃ２、またはＣ１アルキル基）、ホモ二官能性クロスリンカー、ヘテロ二官能性クロスリンカー、ペプチドリンカー、トレースレスリンカー、自己犠牲リンカー、マレイミド系リンカー、またはこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。場合により、非ポリマーリンカーは、Ｃ１－Ｃ６アルキル基（例えば、Ｃ５、Ｃ４、Ｃ３、Ｃ２、またはＣ１アルキル基）、ホモ二官能性クロスリンカー、ヘテロ二官能性クロスリンカー、ペプチドリンカー、トレースレスリンカー、自己犠牲リンカー、マレイミド系リンカー、またはそれらの組合せを含む。さらなる場合では、非ポリマーリンカーは、同じタイプのリンカーのうちの２つより多く、例えば、２つより多くのホモ二官能性クロスリンカー、または２つより多くのペプチドリンカーを含まない。さらなる場合では、非ポリマーリンカーは、任意選択で１つまたは複数の反応性官能基を含む。
【０２５８】
一部の例では、非ポリマーリンカーは、上述のポリマーを包含しない。一部の例では、非ポリマーリンカーは、ポリマー部分Ｃによって包含されるポリマーを包含しない。場合により、非ポリマーリンカーは、ポリアルキレンオキシド（例えば、ＰＥＧ）を包含しない。場合により、非ポリマーリンカーはＰＥＧを包含しない。
【０２５９】
一部の例では、リンカーは、ホモ二官能性リンカーを含む。例示的なホモ二官能性リンカーとして、Ｌｏｍａｎｔ’ｓ試薬ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）ＤＳＰ、３’３’－ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート（ＤＴＳＳＰ）、ジスクシンイミジルスベレート（ＤＳＳ）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（ＢＳ）、ジスクシンイミジルタートレート（ＤＳＴ）、ジスルホスクシンイミジルタートレート（スルホＤＳＴ）、エチレングリコビス（スクシンイミジルスクシネート）（ＥＧＳ）、ジスクシンイミジルグルタレート（ＤＳＧ）、Ｎ，Ｎ’－ジスクシンイミジルカーボネート（ＤＳＣ）、ジメチルアジピミデート（ＤＭＡ）、ジメチルピメリミデート（ＤＭＰ）、ジメチルスベリミデート（ＤＭＳ）、ジメチル－３，３’－ジチオビスプロピオンイミデート（ＤＴＢＰ）、１，４－ジ－３’－（２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミド）ブタン（ＤＰＤＰＢ）、ビスマレイミドヘキサン（ＢＭＨ）、ハロゲン化アリール含有化合物（ＤＦＤＮＢ）、例えば１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼンもしくは１，３－ジフルオロ－４，６－ジニトロベンゼン、４，４’－ジフルオロ－３，３’－ジニトロフェニルスルホン（ＤＦＤＮＰＳ）、ビス－［β－（４－アジドサリチルアミド）エチル］ジスルフィド（ＢＡＳＥＤ）、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、１，４－ブタンジオールジグリシジルエーテル、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、ｏ－トルイジン、３，３’－ジメチルベンジジン、ベンジジン、α，α’－ｐ－ジアミノジフェニル、ジヨード－ｐ－キシレンスルホン酸、Ｎ，Ｎ’－エチレン－ビス（ヨードアセトアミド）、またはＮ，Ｎ’－ヘキサメチレン－ビス（ヨードアセトアミド）が挙げられるが、これらに限定されない。
【０２６０】
一部の態様では、リンカーはヘテロ二官能性リンカーを含む。例示的なヘテロ二官能性リンカーとして、アミン反応性およびスルフヒドリルクロスリンカー、例えば、Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ｓＰＤＰ）、長鎖Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＬＣ－ｓＰＤＰ）、水溶性長鎖Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（スルホ－ＬＣ－ｓＰ

ＤＰ）、スクシンイミジルオキシカルボニル－α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルエン（ｓＭＰＴ）、スルホスクシンイミジル－６－［α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルアミド］ヘキサノエート（スルホ－ＬＣ－ｓＭＰＴ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＭＣＣ）、スルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ｓＭＣＣ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢｓ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＭＢｓ）、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨードアクテイル（ｉｏｄｏａｃｔｅｙｌ））アミノベンゾエート（ｓＩＡＢ）、スルホスクシンイミジル（４－ヨードアクテイル）アミノベンゾエート（スルホ－ｓＩＡＢ）、スクシンイミジル－４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（ｓＭＰＢ）、スルホスクシンイミジル－４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（スルホ－ｓＭＰＢ）、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミドエステル（ＧＭＢｓ）、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＧＭＢｓ）、スクシンイミジル６－（（ヨードアセチル）アミノ）ヘキサノエート（ｓＩＡＸ）、スクシンイミジル６－［６－（（（ヨードアセチル）アミノ）ヘキサノイル）アミノ］ヘキサノエート（ｓＩＡＸＸ）、スクシンイミジル４－（（（ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＩＡＣ）、スクシンイミジル６－（（（（４－ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボニル）アミノ）ヘキサノエート（ｓＩＡＣＸ）、ｐ－ニトロフェニルヨードアセテート（ＮＰＩＡ）、カルボニル反応性およびスルフヒドリル反応性クロスリンカー、例えば、４－（４－Ｎ－マレイミドフェニル）酪酸ヒドラジド（ＭＰＢＨ）、４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシル－ヒドラジド－８（Ｍ２Ｃ２Ｈ）、３－（２－ピリジルジチオ）プロピオニルヒドラジド（ＰＤＰＨ）、アミン反応性および光反応性クロスリンカー、例えば、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（ＮＨｓ－ＡｓＡ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（スルホ－ＮＨｓ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－（４－アジドサリチルアミド）ヘキサノエート（スルホ－ＮＨｓ－ＬＣ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｐ－アジドサリチルアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡｓＤ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（ＨｓＡＢ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（スルホ－ＨｓＡＢ）、Ｎ－スクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（ｓＡＮＰＡＨ）、スルホスクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（スルホ－ｓＡＮＰＡＨ）、Ｎ－５－アジド－２－ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド（ＡＮＢ－ＮＯｓ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｍ－アジド－ｏ－ニトロベンゾアミド）－エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＮＤ）、Ｎ－スクシンイミジル－４（４－アジドフェニル）１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＤＰ）、Ｎ－スルホスクシンイミジル（４－アジドフェニル）－１，３’－ジチオプロピオネート（スルホ－ｓＡＤＰ）、スルホスクシンイミジル４－（ρ－アジドフェニル）ブチレート（スルホ－ｓＡＰＢ、スルホスクシンイミジル２－（７－アジド－４－メチルクマリン－３－アセトアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＥＤ）、スルホスクシンイミジル７－アジド－４－メチルクマイン（ｍｅｔｈｙｌｃｏｕｍａｉｎ）－３－アセテート（スルホ－ｓＡＭＣＡ）、ρ－ニトロフェニルジアゾピルベート（ρＮＰＤＰ）、ρ－ニトロフェニル－２－ジアゾ－３，３，３－トリフルオロプロピオネート（ＰＮＰ－ＤＴＰ）、スルフヒドリル反応性および光反応性クロスリンカー、例えば、１－（ρ－アジドサリチルアミド）－４－（ヨードアセトアミド）ブタン（ＡｓＩＢ）、Ｎ－［４－（ρ－アジドサリチルアミド）ブチル］－３’－（２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミド（ＡＰＤＰ）、ベンゾフェノン－４－ヨードアセトアミド、ベンゾフェノン－４－マレイミドカルボニル反応性および光反応性クロスリンカー、例えば、ρ－アジドベンゾイルヒドラジド（ＡＢＨ）、カルボキシレート反応性および光反応性クロスリンカー、例えば、４－（ρ－アジドサリチルアミド）ブチルアミ

ン（ＡｓＢＡ）、ならびにアルギニン反応性および光反応性クロスリンカー、例えば、ｐ－アジドフェニルグリオキサール（ＡＰＧ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２６１】

一部の例では、リンカーは反応性官能基を含む。場合により、反応性官能基は、抗体上に存在する求電子基に対して反応性である求核基を含む。例示的な求電子基として、カルボニル基、例えばアルデヒド、ケトン、カルボン酸、エステル、アミド、エノン、ハロゲン化アシル、または酸無水物が挙げられる。一部の態様では、反応性官能基はアルデヒドである。例示的な求核基として、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジドが挙げられる。

【０２６２】

一部の態様では、リンカーはマレイミド基を含む。一部の例では、マレイミド基は、マレイミドスペーサとも称される。一部の例では、マレイミド基はカプロン酸をさらに包含し、マレイミドカプロイル（ｍｅ）を形成する。場合により、リンカーはマレイミドカプロイル（ｍｅ）を含む。場合により、リンカーはマレイミドカプロイル（ｍｅ）である。他の例では、マレイミド基は、上記のスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＭＣＣ）またはスルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ｓＭＣＣ）などのマレイミドメチル基を含む。

【０２６３】

一部の態様では、マレイミド基は、自己安定化マレイミドである。一部の例では、自己安定化マレイミドは、ジアミノプロピオン酸（ＤＰＲ）を利用して、マレイミドに隣接する塩基性アミノ基を組み込み、チオスクシンイミド環加水分解の分子内触媒作用を提供し、それによって、マレイミドがレトロマイケル反応による脱離反応を受けないようにする。一部の例では、自己安定化マレイミドは、Ｌｙｏｎらによる「Ｓｅｌｆ－ｈｙｄｒｏｌｙｚｉｎｇ ｍａｌ ｅｉｍｉｄｅｓ ｉｍｐｒｏｖｅｓ ｔｈｅ ｓｔａｂｉｌｉｔｙ ａｎｄ ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ」，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３２（１０）：１０５９～１０６２頁（２０１４）に記載されるマレイミド基である。一部の例では、リンカーは自己安定化マレイミドを含む。一部の例では、リンカーは自己安定化マレイミドである。

【０２６４】

一部の態様では、リンカーはペプチド部分を含む。一部の例では、ペプチド部分は、最低２、３、４、５、または６個以上のアミノ酸残基を含む。一部の例では、ペプチド部分は、最大２、３、４、５、６、７、または８個のアミノ酸残基を含む。一部の例では、ペプチド部分は、約２個、約３個、約４個、約５個、または約６個のアミノ酸残基を含む。一部の例では、ペプチド部分は、切断可能なペプチド部分（例えば、酵素的または化学的のいずれか）である。一部の例では、ペプチド部分は、切断不能なペプチド部分である。一部の例では、ペプチド部分は、Ｖａｌ－Ｃｉｔ（バリン－シトルリン）、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ（配列番号９６）、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ａｒｇ、Ｌｅｕ－Ｃｉｔ、Ｉｌｅ－Ｃｉｔ、Ｔｒｐ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ（配列番号９７）、またはＧｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ（配列番号９８）を含む。一部の例では、リンカーは、Ｖａｌ－Ｃｉｔ（バリン－シトルリン）、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ｌｙｓ、Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ａｌａ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ａｒｇ、Ｐｈｅ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ａｒｇ、Ｌｅｕ－Ｃｉｔ、Ｉｌｅ－Ｃｉｔ、Ｔｒｐ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ａｌａ、Ａｌａ－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｌｅｕ、またはＧｌｙ－Ｐｈｅ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙなどのペプチド部分を含む。場合により、リンカーはＶａｌ－Ｃｉｔを含む。場合により、リンカーはＶａｌ－Ｃｉｔである。

【０２６５】

一部の態様では、リンカーは、安息香酸基またはその誘導体を含む。一部の例では、安息香酸基またはその誘導体は、パラアミノ安息香酸（ＰＡＢＡ）を含む。一部の例では、安息香酸基またはその誘導体は、γ－アミノ酪酸（ＧＡＢＡ）を含む。

【０２６６】

一部の態様では、リンカーは、マレイミド基、ペプチド部分、および／または安息香酸基のうち１つまたは複数をあらゆる組合せで含む。一部の態様では、リンカーは、マレイミド基、ペプチド部分、および／または安息香酸基の組合せを含む。一部の例では、マレイミド基はマレイミドカプロイル（ｍｃ）である。一部の例では、ペプチド基はｖａｌ－ｃｉｔである。一部の例では、安息香酸基はＰＡＢＡである。一部の例では、リンカーはｍｃ－ｖａｌ－ｃｉｔ基を含む。場合により、リンカーはｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢＡ基を含む。さらなる場合には、リンカーはｍｃ－ｖａｌ－ｃｉｔ－ＰＡＢＡ基を含む。

【０２６７】

一部の態様では、リンカーは、自己犠牲リンカーまたは自己脱離（ｓｅｌｆ－ｅｌｉｍｉｎａｔｉｏｎ）リンカーである。場合により、リンカーは自壊性リンカーである。他の場合、リンカーは自己脱離リンカー（例えば、環化自己脱離リンカー）である。一部の例では、リンカーは、米国特許第９，０８９，６１４号明細書または国際公開第２０１５０３８４２６号に記載のリンカーを含む。

【０２６８】

一部の態様では、リンカーは樹状型リンカーである。一部の例では、樹状型リンカーは、分岐状の多官能性リンカー部分を含む。一部の例では、樹状型リンカーは、ポリヌクレオチド対抗体のモル比を上昇させるために使用される。一部の例では、樹状型リンカーはＰＡＭＡＭデンドリマーを含む。

【０２６９】

一部の態様では、リンカーは、トレースレスリンカー、すなわち切断後にリンカー部分（例えば、原子またはリンカー基）を結合部分（例えば、抗体）、ポリヌクレオチド、ポリマー、またはエンドソーム溶解性部分に残さないリンカーである。例示的なトレースレスリンカーとして、ゲルマニウムリンカー、ケイ素リンカー、硫黄リンカー、セレンリンカー、窒素リンカー、リンリンカー、ホウ素リンカー、クロムリンカー、またはフェニルヒドラジドリンカーが挙げられるが、これらに限定されない。場合により、リンカーは、Ｈｅｊｅｓｅｎらによる「Ａ ｔｒａｃｅｌｅｓｓ ａｒｙｌ－ｔｒｉａｚｅｎｅ ｌｉｎｋｅｒ ｆｏｒ ＤＮＡ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ」，Ｏｒｇ Ｂｉｏｍｏｌ Ｃｈｅｍ １１（１５）：２４９３～２４９７頁（２０１３）に記載されるトレースレスアリール－トリアゼンリンカーである。一部の例では、リンカーは、Ｂｌａｎｅｙらによる「Ｔｒａｃｅｌｅｓｓ ｓｏｌｉｄ－ｐｈａｓｅ ｏｒｇａｎｉｃ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」，Ｃｈｅｍ．Ｒｅｖ．１０２：２６０７～２０２４頁（２００２）に記載されるトレースレスリンカーである。一部の例では、リンカーは、米国特許第６，８２１，７８３号明細書に記載されるトレースレスリンカーである。

【０２７０】

一部の例では、リンカーは、米国特許第６，８８４，８６９号明細書、同第７，４９８，２９８号明細書、同第８，２８８，３５２号明細書、同第８，６０９，１０５号明細書、もしくは同第８，６９７，６８８号明細書、米国特許出願第２０１４／０１２７２３９号明細書、同第２０１３／０２８９１９号明細書、同第２０１４／２８６９７０号明細書、同第２０１３／０３０９２５６号明細書、同第２０１５／０３７３６０号明細書、もしくは同第２０１４／０２９４８５１号明細書、または国際公開第２０１５０５７６９９号、国際公開第２０１４０８０２５１号、国際公開第２０１４１９７８５４号、国際公開第２０１４１４５０９０号、もしくは国際公開第２０１４１７７０４２号に記載のリンカーである。

【０２７１】

一部の例では、リンカーはＣ１－Ｃ６アルキル基である。場合により、リンカーは、Ｃ５、Ｃ４、Ｃ３、Ｃ２、またはＣ１アルキル基などのＣ１－Ｃ６アルキル基である。場合

により、Ｃ１－Ｃ６アルキル基は、非置換Ｃ１－Ｃ６アルキル基である。リンカーの文脈、特にリンカーの文脈で使用される場合、アルキルは、最大６個の炭素原子を含有する飽和した直鎖または分岐鎖炭化水素ラジカルを意味する。一部の例では、リンカーは非ポリマーリンカーである。一部の例では、リンカーは、上記のホモ二官能性リンカーまたはヘテロ二官能性リンカーを含む。場合により、リンカーはヘテロ二官能性リンカーを含む。場合により、リンカーは、ｓＭＣＣを含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ　ｏｒ　ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）。他の例では、リンカーは、Ｃ１－Ｃ６アルキル基に任意選択でコンジュゲートされたヘテロ二官能性リンカーを含む。他の例では、リンカーは、Ｃ１－Ｃ６アルキル基に任意選択でコンジュゲートされたｓＭＣＣを含む。さらなる場合には、リンカーは、上記のホモ二官能性リンカーもヘテロ二官能性リンカーも含まない。

【０２７２】

医薬製剤

一部の態様では、本明細書に記載の医薬製剤は、非経口（例えば、静脈内、皮下、筋肉内）、経口、鼻腔内、頬側、直腸、または経皮投与経路を含むがこれらに限定されない複数の投与経路によって対象に投与される。一部の例では、本明細書に記載の医薬組成物は、非経口（例えば、静脈内、皮下、筋肉内、動脈内、腹腔内、髄腔内、脳内、脳室内、または頭蓋内）投与用に製剤化される。他の例では、本明細書に記載の医薬組成物は、経口投与用に製剤化される。さらに他の例では、本明細書に記載の医薬組成物は、鼻腔内投与用に製剤化される。

【０２７３】

一部の態様では、医薬製剤として、水性液体分散剤、自己乳化分散剤、固溶体、リポソーム分散剤、エアロゾル剤、固体剤形、散剤、即時放出製剤、制御放出製剤、速溶製剤、錠剤、カプセル剤、丸剤、遅延放出製剤、持続放出製剤、パルス放出製剤、多粒子製剤（例えば、ナノ粒子製剤）、および即時放出・制御放出混合型製剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２７４】

一部の例では、医薬製剤は、多粒子製剤を含む。一部の例では、医薬製剤は、ナノ粒子製剤を含む。一部の例では、ナノ粒子は、ｃＭＡＰ、シクロデキストリン、または脂質を含む。場合により、ナノ粒子は、固体脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、自己乳化ナノ粒子、リポソーム、マイクロエマルジョン、またはミセル溶液を含む。さらなる例示的なナノ粒子として、常磁性ナノ粒子、超常磁性ナノ粒子、金属ナノ粒子、フラーレン様材料、無機ナノチューブ、デンドリマー（共有結合された金属キレートを有するものなど）、ナノファイバ、ナノホーン、ナノオニオン、ナノロッド、ナノロープ、および量子ドットが挙げられるが、これらに限定されない。一部の例では、ナノ粒子は、金属ナノ粒子、例えば、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、イットリウム、ジルコニウム、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、銀、カドミウム、ハフニウム、タンタル、タングステン、レニウム、オスミウム、イリジウム、白金、金、ガドリニウム、アルミニウム、ガリウム、インジウム、スズ、タリウム、鉛、ビスマス、マグネシウム、カルシウム、ストロンチウム、バリウム、リチウム、ナトリウム、カリウム、ホウ素、シリコン、リン、ゲルマニウム、ヒ素、アンチモン、およびそれらの組合せ、合金、または酸化物のナノ粒子である。

【０２７５】

一部の例では、ナノ粒子は、コア－シェルナノ粒子におけるように、コア、またはコアおよびシェルを含む。

【０２７６】

一部の例では、ナノ粒子は、機能的要素の付着のための分子（例えば、ポリ核酸分子または結合部分（例えば、本明細書に記載の抗体）のうち１つまたは複数）でさらにコーティングされる。一部の例では、コーティングは、コンドロイチン硫酸、デキストラン硫酸、カルボキシメチルデキストラン、アルギン酸、ペクチン、カラギーナン、フコイダン、アガロペクチン、ポルフィラン、カラヤガム、ジェランガム、キサンタンガム、ヒアルロ

ン酸、グルコサミン、ガラクトサミン、キチン（またはキトサン）、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、リゾチーム、シトクロムＣ、リボヌクレアーゼ、トリプシノーゲン、キモトリプシノーゲン、α－キモトリプシン、ポリリシン、ポリアルギニン、ヒストン、プロタミン、オボアルブミン、またはデキストリンもしくはシクロデキストリンを含む。一部の例では、ナノ粒子は、グラフェン被覆ナノ粒子を含む。

【０２７７】

場合により、ナノ粒子は、約５００ｎｍ、４００ｎｍ、３００ｎｍ、２００ｎｍ、または１００ｎｍ未満の少なくとも１つの寸法を有する。

【０２７８】

一部の例では、ナノ粒子製剤は、常磁性ナノ粒子、超常磁性ナノ粒子、金属ナノ粒子、フラーレン様材料、無機ナノチューブ、デンドリマー（共有結合した金属キレートを有するものなど）、ナノファイバ、ナノホーン、ナノオニオン、ナノロッド、ナノロープ、または量子ドットを含む。一部の例では、本明細書に記載のポリ核酸分子または結合部分（例えば、抗体）は、ナノ粒子に直接または間接的にコンジュゲートされる。一部の例では、本明細書に記載される少なくとも１、５、１０、１５、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００個、またはそれ以上のポリ核酸分子または結合部分が、ナノ粒子に直接または間接的にコンジュゲートされる。

【０２７９】

一部の態様では、医薬製剤は、ポリ核酸分子を細胞に送達する送達ベクター、例えば組換えベクターを含む。一部の例では、組換えベクターはＤＮＡプラスミドである。他の例では、組換えベクターはウイルスベクターである。例示的なウイルスベクターには、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、またはアルファウイルスに由来するベクターが挙げられる。一部の例では、ポリ核酸分子を発現可能な組換えベクターは、標的細胞に安定した発現をもたらす。さらなる例では、ポリ核酸分子の一過的な発現をもたらすウイルスベクターが使用される。

【０２８０】

一部の態様では、医薬製剤は、本明細書に開示される組成物との適合性および所望の剤形の放出プロファイル特性に基づいて選択される担体または担体材料を含む。例示的な担体材料として、例えば、結合剤、懸濁化剤、崩壊剤、充填剤、界面活性剤、可溶化剤、安定剤、潤滑剤、湿潤剤、希釈剤などが挙げられる。薬学的に適合性の担体材料として、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、マルトデキストリン、グリセリン、ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）、コレステロール、コレステロールエステル、カゼイン酸ナトリウム、大豆レシチン、タウロコール酸、ホスホチジルコリン、塩化ナトリウム、リン酸三カルシウム、リン酸二カリウム、セルロースおよびセルロースコンジュゲート、ステアロイル乳酸ナトリウムの糖、カラギーナン、モノグリセリド、ジグリセリド、アルファ化デンプンなどが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，Ｎｉｎｅｔｅｅｎｔｈ Ｅｄ（Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．：Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９５）；Ｈｏｏｖｅｒ，Ｊｏｈｎ Ｅ．，Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ １９７５；Ｌｉｂｅｒｍａｎ，Ｈ．Ａ．ａｎｄ Ｌａｃｈｍａｎ，Ｌ．，Ｅｄｓ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｃｋｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，１９８０；およびＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｓｅｖｅｎｔｈ Ｅｄ．（Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ１９９９）を参照されたい。

【０２８１】

治療レジメン

一部の態様では、本明細書に記載の医薬組成物は、治療用途のために投与される。一部

の態様では、医薬組成物は、１日１回、１日２回、１日３回、またはそれ以上投与される。医薬組成物は、日常的に、毎日、隔日、週５日、週１回、隔週、月２週、月３週、月１回、月２回、月３回、またはそれ以上投与される。医薬組成物は、少なくとも１か月間、２か月間、３か月間、４か月間、５か月間、６か月間、７か月間、８か月間、９か月間、１０か月間、１１か月間、１２か月間、１８か月間、２年間、３年間、またはそれ以上投与される。

【０２８２】

一部の態様では、１つまたは複数の医薬組成物が、同時に、連続して、または一定の時間間隔で投与される。一部の態様では、１つまたは複数の医薬組成物は、同時に投与される。場合により、１つまたは複数の医薬組成物は、連続して投与される。さらなる場合には、１つまたは複数の医薬組成物は、一定の時間間隔で投与される（例えば、第１の医薬組成物の第１の投与が１日目に行われ、その後、少なくとも第２の医薬組成物の投与の前に少なくとも１、２、３、４、５日、またはそれ以上の間隔が設けられる）。

【０２８３】

一部の態様では、２つ以上の異なる医薬組成物が、共投与される。一部の例では、２つ以上の異なる医薬組成物は、同時に共投与される。場合により、２つ以上の異なる医薬組成物は、投与間に時間のずれを設けることなく連続して共投与される。他の場合、２つ以上の異なる医薬組成物は、投与間に約０．５時間、１時間、２時間、３時間、１２時間、１日、２日、またはそれ以上の間隔を空けて連続して共投与される。

【０２８４】

患者の状態が改善する場合、医師の裁量により、組成物の投与は連続的に行われ、代替的に、投与される組成物の用量は、ある特定の期間にわたって一時的に減少または一時的に中断される（すなわち、「休薬期間」）。一部の例では、休薬期間の長さは、２日～１年の間で変動し、ほんの一例ではあるが、２日、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１５日、２０日、２８日、３５日、５０日、７０日、１００日、１２０日、１５０日、１８０日、２００日、２５０日、２８０日、３００日、３２０日、３５０日、または３６５日が含まれる。休薬期間中の用量減少は１０％～１００％であり、ほんの一例ではあるが、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％が含まれる。

【０２８５】

患者の状態の改善が生じると、必要に応じて維持用量が投与される。その後、投与量もしくは投与頻度、またはその両方を、症状に応じて、疾患、障害、または疾病の改善が保持されるレベルに減少させることができる。

【０２８６】

一部の態様では、そのような量に相当する所与の薬剤の量は、特定の化合物、疾患の重症度、処置を必要とする対象または宿主の同一性（例えば、体重）などの因子に依拠して変動するが、にもかかわらず、例えば、投与される特定の薬剤、投与経路、および処置されている対象または宿主を含む、症例を取り囲む特定の状況に従い、当該技術分野で公知の方法で慣例的に決定される。一部の例では、所望の用量は、単回用量で、または同時に（もしくは短期間にわたって）もしくは適切な間隔で投与される分割用量、例えば、１日２回、３回、４回、またはそれ以上のサブ用量として都合よく提供される。

【０２８７】

個々の処置レジメンに関する変数の数は多く、これらの推奨値からの相当な逸脱は珍しくはないことから、前述の範囲は単に示唆的なものである。そのような投与量は、限定されないが、使用される化合物の活性、処置される疾患または疾病、投与形態、個々の対象の要件、処置される疾患または疾病の重症度、および医療従事者の判断といった、多数の変数に応じて変更される。

【０２８８】

一部の態様では、そのような治療レジメンの毒性および治療効果は、ＬＤ５０（集団の

５０％に対して致死的な用量）およびＥＤ５０（集団の５０％において治療上有効な用量）の決定を含むがこれらに限定されない、細胞培養物または実験動物に対する標準的な薬学的手順によって決定される。毒性効果と治療効果との間の用量比は治療指数であり、ＬＤ５０とＥＤ５０との間の比として表される。高い治療指数を示す化合物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトでの使用のための投与量の範囲を製剤化する際に使用される。このような化合物の投与量は、好ましくは、毒性が最小限のＥＤ５０を含む循環濃度の範囲内にある。投与量は、利用される剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で変動する。

【０２８９】

キット／製造品

本明細書中のある特定の態様では、本明細書に記載される組成物および方法のうち１または複数とともに使用するためのキットおよび製造品が開示される。そのようなキットは、バイアルやチューブなどの１つまたは複数の容器を収容するように区画化されたキャリア、パッケージ、または容器を含み、容器のそれぞれには、本明細書に記載の方法に使用される別々の要素のうち１つが含まれる。適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、および試験管が挙げられる。一実施形態では、容器は、ガラスやプラスチックなどの様々な材料から形成される。

【０２９０】

本明細書で提供される製造品は、包装材料を伴う。医薬品包装材料の例として、ブリスターパック、ボトル、チューブ、バッグ、容器、ボトル、ならびに選択された製剤、意図した投与形態、および処置の形態に適したいずれかの包装材料が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２９１】

例えば容器は、本明細書に記載の標的核酸分子を含む。このようなキットは、任意選択で、本明細書に記載の方法での使用に関する識別記述、ラベル、または説明書を含む。

【０２９２】

キットは、典型的には、内容物を列挙するラベルおよび／または使用説明書、ならびに使用説明書を伴う添付文書を含む。一組の説明書も典型的には含まれる。

【０２９３】

一実施形態では、ラベルは、容器の上にあるか、または容器に付随している。一実施形態では、ラベルを形成する文字、数字、またはその他の文字が容器自体に付着されるか、印字されるか、またはエッチングされる場合、ラベルは容器の上にある。容器も保持するレセプタクルまたはキャリア内に存在する場合、ラベルは例えば添付文書として容器に付随する。一実施形態では、ラベルは、内容物が特定の治療用途に使用されることを示すために使用される。ラベルはまた、本明細書に記載の方法などにおいて内容物を使用するための指示を示す。

【０２９４】

特定の態様では、医薬組成物は、本明細書で提供される化合物を含有する１つまたは複数の単位剤形を含有するパックまたはディスペンサ装置で提供される。パックは、例えばブリスターパックなどの金属またはプラスチック箔を含有する。一実施形態では、パックまたはディスペンサ装置には、投与のための指示書が付随する。一実施形態では、パックまたはディスペンサにはまた、医薬品の製造、使用、または販売を規制する政府機関が規定する形で容器に付けられた通知が付随し、この通知は、ヒトまたは動物への投与のための薬物の形態についての政府機関による承認を反映する。そのような通知は、例えば、米国食品医薬品局が処方薬について承認したラベル、または承認された製品挿入物である。一実施形態では、適合性のある医薬担体中で製剤化された本明細書で提供される化合物を含有する組成物も、調製され、適切な容器に入れられ、指定の疾病の処置に関するラベルを付けられる。

【０２９５】

特定の用語

別段の定めのない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、特許請求される主題が属する技術分野の当業者が共通して理解するのと同じ意味を有する。前述の概要および以下の詳細な説明は、例示的および説明的なものにすぎず、特許請求されるいかなる主題も制限するものではないことを理解されたい。本出願では、単数形の使用は、具体的に別段の記載がない限り、複数形を含む。本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈が明らかに反対の意味を示していない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。本出願では、「または（ｏｒ）」の使用は、特に明記しない限り、「および／または（ａｎｄ／ｏｒ）」を意味する。さらに、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」という用語のほか、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、および「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」などの他の形態の使用は、限定的ではない。

【０２９６】

本明細書で使用される場合、範囲および量は、「約（ａｂｏｕｔ）」の付く特定の値または範囲として表すことができる。約は、正確な量も含む。したがって、「約５μＬ」は、「約５μＬ」、さらには「５μＬ」も意味する。一般に、「約」という用語は、実験誤差内にあると予想される量を含む。

【０２９７】

本明細書で使用されるセクション見出しは、編成のみを目的とするものであり、記載される主題を限定するものとして解釈されるべきではない。

【０２９８】

本明細書で使用される場合、「個体」、「対象」、および「患者」という用語は、あらゆる哺乳動物を意味する。一部の態様では、哺乳動物はヒトである。一部の態様では、哺乳動物はヒトではない。これらの用語のいずれも、医療従事者（例えば、医師、登録看護師、診療看護師、医師助手、熟練作業者またはホスピス作業者）による監督（例えば、継続的または断続的）によって特徴付けられる状況を必要とせず、またはそれに限定されない。

【０２９９】

本明細書で使用される場合、「ＤＭＤ対象」という用語は、ＤＭＤに罹患しているかまたは罹患すると予想され、かつ／またはＤＭＤに関連する遺伝的素因（例えば、ＤＭＤ遺伝子の変異）を有するあらゆる哺乳動物を意味する。一部の態様では、哺乳動物はヒトである。一部の態様では、哺乳動物はヒトではない。

【実施例】

【０３００】

これらの実施例は、例示のみを目的として提供され、本明細書に提供される特許請求の範囲を限定するものではない。

【０３０１】

実施例１：高いｈＤＭＤエクソン４４スキッピング活性が予想されるホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（ＰＭＯ）に対するｉｎ　ｓｉｌｉｃｏでの同定

【０３０２】

エクソン４４スキッピング活性について修正可能である領域をｈＤＭＤ　ｐｒｅ－ｍＲＮＡ上で同定するためのアルゴリズムがいくつか報告されている。ＰＭＯスクリーニングでは、エクソン４４スキッピングで報告された予測に基づき、エクソン４４アクセプタ部位に最も近接する特定の領域に焦点を当てた（Ｅｃｈｉｇｏｙａらによる２０１５，ＰＬｏＳ　ＯＮＥ　１０（３）：ｅ０１２００５８）。

【０３０３】

ｈＤＭＤエクソン４４スキッピング活性を有するＰＭＯをｉｎ　ｓｉｌｉｃｏで同定した。図１は、ＰＭＯ　３０－ｍｅｒおよび２５－ｍｅｒのエクソン４４スキッピング活性を示す。エクソン４４アクセプタ部位の位置に結合するＰＭＯは、アクセプタ部位からそれらの３’末端までの距離（塩基）に基づき標識される。大きな正方形はＰＭＯのエクソン４４スキッピング活性を表し、点はエクソン４４スキッピング活性が予測されたＰＭＯ

を表す。エクソン４４のアクセプタ部位は、１４８塩基対の長さを有し（ソース：ＮＣＢＩ ａ Ｈｏｍｏ ｓａｐｉｅｎｓジストロフィン（ＤＭＤ）、転写バリアントＤｐ４２７ｍ、ｍＲＮＡ。ＡＣＣＥＳＳＩＯＮ ＮＭ＿００４００６）５’－ＧＣＧＡＴＴＴＧＡＣＡＧＡＴＣＴＧＴＴＧＡＧＡＡＡＴＧＧＣＧＧＣＧＴＴＴＴＣＡＴＴＡＴＧＡＴＡＴＡＡＡＧＡＴＡＴＴＴＡＡＴＣＡＧＴＧＧＣＴＡＡＣＡＧＡＡＧＣＴＧＡＡＣＡＧＴＴＴＣＴＣＡＧＡＡＡＧＡＣＡＣＡＡＡＴＴＣＣＴＧＡＧＡＡＴＴＧＧＧＡＡＣＡＴＧＣＴＡＡＡＴＡＣＡＡＡＴＧＧＴＡＴＣＴＴＡＡＧ－３’（配列番号１３４）、活性なエクソン４４スキッピングＰＭＯの大半は、０位のアクセプタ部位（Ａｃ０）と２０位のアクセプタ部位（Ａｃ２０）との間で相互作用することが観察された。７０％を超えるｈＤＭＤエクソン４４スキッピング活性が予測された１２個のＰＭＯ（３０ｍｅｒ）（図１のボックスを参照）をさらに同定した。ｈＤＭＤエクソン４４アクセプタ部位を標的とするこれら１２個のＰＭＯの配列を表１に示す。

【０３０４】

結果

【０３０５】

全体として、予測されたエクソン４４スキッピング活性が最も高い１２個のホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（ＰＭＯ）を、エクソン４４スキッピング活性について修正可能であり得る領域をｈＤＭＤ ｐｒｅ－ｍＲＮＡ上で同定するのを補助するアルゴリズムに基づき選択した。

【０３０６】

実施例２：健常な初代ヒト骨格筋細胞（ｈＳｋＭＣ）におけるエクソン４４スキッピング活性が高いＰＭＯの同定および選択

【０３０７】

健常な初代ヒト骨格筋細胞に対するさらなるｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイのために、実施例１の高い予測エクソン４４スキッピング活性を有する選択された１２個のＰＭＯを合成した。初代ヒト骨格筋細胞（ＳｋＭＣ）は市販で入手した（Ｇｉｂｃｏ、＃Ａ１１４４０）。これらの細胞を予め分化させ、１型コラーゲンを被覆した２４ウェルプレート（Ｇｉｂｃｏ、＃１９７０７８）（５００００個の細胞／ウェル）上、２％ウマ血清および１×ＩＴＳ（Ｇｉｂｃｏ、＃１９３３８６）を補充したＤＭＥＭ中で製造業者の指示に従い２日間播種することによって筋管を形成するように誘導した。細胞はトランスフェクションの前に、抗生物質なしで２４時間インキュベートした。ＰＭＯをＧｅｎｅＴｏｏｌによって合成した。ＰＭＯを水に配合し、６５～７０℃で５分間加熱し、２μＭ Ｅｎｄｏ－Ｐｏｒｔｅｒ（Ｇｅｎｅ Ｔｏｏｌｓ、＃ＥＰ６Ｐ１－１）とともに温かい培地に希釈することで、細胞へのＰＭＯ取込みを促進させた。トランスフェクションの４８時間後、細胞を採取した。細胞をＴｒｉｚｏｌ中で回収し、製造業者の指示に従いＤｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ－９６ ＲＮＡ単離キット（Ｚｙｍｏ）を用いたＲＮＡ単離のための処理を行うまで－８０℃で保管した。全ＲＮＡ濃度を分光学的に定量した。１００～２００ｎｇの精製ＲＮＡを、Ｈｉｇｈ－Ｃａｐａｃｉｔｙ ｃＤＮＡ逆転写キット（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）およびＳｉｍｐｌｉＡｍｐ熱サイクラ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用してｃＤＮＡに変換した。全ＤＭＤ ｍＲＮＡまたはエクソン４４スキップｍＲＮＡを表すＤＮＡ断片を、ＴａｑＭａｎ Ｆａｓｔ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｍａｓｔｅｒ ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）、およびｈＤＭＤ ＴａｑＭａｎアッセイＨｓ０１０４９４０１＿ｍｌ（ＶＩＣ－ＭＧＢ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）またはｈＤＭＤエクソン４３／４５接合部に特異的な特注のＴａｑＭａｎアッセイ（ＦＡＭ－ＭＧＢ、フォワード：５’－ＣＴＧＴＧＧＡＡＡＧＧＧＴＧＡＡＧＣＴＡ－３’（配列番号９０）、リバース：５’－ＧＡＣＡＡＧＧＧＡＡＣＴＣＣＡＧＧＡＴＧ－３’（配列番号９１）、プローブ：５’－ＡＧＣＴＣＴＣＴＣＣＣＡＧＣＴＴＧＡＴＴＴＣＣＡ－３’（配列番号９２））のいずれかを用いて、ＰＣＲにより増幅した。ゲル電気泳動によるエクソン４４スキップレベルの定量化のために、ＰＣＲ反応物を９５℃で２０秒間インキュベートし、続いてＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ ７ Ｆｌｅｘ

（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して９５℃で１秒間および６０℃で２０秒間のサイクルを３２回行った。ＰＣＲ産物をＴＡＥローディングバッファで４：１に希釈し、ＧｅｌＧｒｅｅｎを含有する２４ウェル４％ＴＡＥゲル（Ｅｍｂｉ　Ｔｅｃ、＃ＧＧ３８０７）に装入した。ＰＣＲ産物を電気泳動（５０Ｖで２時間）により分離した。全ＤＭＤ産物およびスキップＤＭＤ産物に対応する帯域の強度を、ＣｈｅｍｉＤｏｃ　ＴＭ　ＸＲＳ＋（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を用いたデンシトメトリーによって定量した。

【０３０８】

結果

【０３０９】

選択された１２個のＰＭＯを、上記のＥｎｄｏｐｏｒｔｅｒを用いて予め筋管に分化された健常な初代ＨＳｋＭＣにトランスフェクトし、トランスフェクションの４８時間後に採取した。全ＤＭＤ　ｍＲＮＡおよびエクソン４４スキップＤＭＤ　ｍＲＮＡをＲＴ－ｑＰＣＲによって増幅させた。ＰＣＲ産物をゲル電気泳動によって分離し、デンシトメトリーによって定量した。提示されたデータを特異的結合アルゴリズム（単一部位）に当てはめた。結合親和性（Ｋｄ＝ＥＣ５０）および（Ｂｍａｘ＝最大スキッピング％）の最良適合値を表９に報告する。これらの結果は、１、３、および１０μＭ、または０．１、１、および１０μＭのいずれかのＰＭＯを二通り用いて行われた、２つの独立実験によるものである。

【０３１０】

【表１０】

表 9

PMO	最大スキッピング%	EC 50 (μM)	K_d (mM)	B_{max}
PMO (BG) なし	6.1	N/A	N/A	N/A
hEx44_Ac0	88.9	1.4	0.3	95.5
hEx44_Ac1	92.7	0.7	0.5	120.1
hEx44_Ac2	98.8	2.7	0.5	110.8
hEx44_Ac3	83.3	1.7	0.5	94.9
hEx44_Ac4	90.5	0.6	0.3	95.1
hEx44_Ac5	76.8	1.4	0.3	82.8
hEx44_Ac6	83.9	2.1	0.5	89.6
hEx44_Ac7	91.3	3.0	0.5	96.8
hEx44_Ac8	83.4	4.3	0.5	89.8
hEx44_Ac9	77.7	No fit	0.3	82.3
hEx44_Ac10	85.5	8.7	1.0	100.1
hEx44_Ac14	85.6	2.0	0.3	81.7

【０３１１】
結果
【０３１２】
図２は、健常な初代ヒト骨格筋細胞（ｈＳｋＭＣ）におけるヒトＤＭＤエクソン４４のアクセプタ部位を標的とする選択された１２個のＰＭＯ（３０ｍｅｒ）のエクソン４４スキッピング活性の、用量依存性応答を示す。
【０３１３】
ＨＳｋＭＣにおけるアッセイの結果より、試験されたＰＭＯの最大ｈＤＭＤエクソン４４スキッピング活性は７５％超であることが示され、それらの予測活性は表９および図２に示されるように確認される。さらに、選択された１２個のＰＭＯ（３０ｍｅｒ）に関するエクソン４４スキッピング活性細胞の用量応答はすべて、表９に示されるように同様の結合親和性（Ｋｄ）を示した（０．３～１．０ｍＭ、単一部位、特異的結合アルゴリズム）。
【０３１４】
全体として、選択された１２個のＰＭＯの活性に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイにより、それらの予測されたエクソン４４スキッピング活性を確認する。
【０３１５】
実施例３：健常なヒト不死化筋芽細胞における、長さを最適化したエクソン４４スキッピングＰＭＯの選択
【０３１６】
最適な長さ／活性比を呈するＰＭＯを選択するために、Ａｃ０－Ａｃ１０部位を標的とする短いＰＭＯオリゴヌクレオチドの、エクソン４４アクセプタ部位を標的とする予測された自由結合エネルギー（ΔＧ）を分析した。表１１は、ｈＤＭＤのエクソン４４アクセプタ部位を標的とする様々な長さのＰＭＯの予測された自由結合エネルギー（ΔＧ（ｋｃａｌ／ｍｏｌ））を示す。一次近似としてＤＮＡ－ＤＮＡオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション（ＩＤＴオリゴアナライザ）を用いてΔＧを算出した。
【０３１７】

【表１１】

表 11

	PMO長				
標的部位	25-mer	26-mer	27-mer	28-mer	30-mer
Ac0	*-44.2*	*-45.6*	*-47.6*	*-50.7*	*-57.4*
Ac1	-42.5	-44.5	-47.5	-50.7	-57.3
Ac2	-40.8	-43.9	-47	-50.7	-56.9
Ac3	-42.3	-45.5	-50.7	**-52.2**	-58.9
Ac4	-44	-47.6	-50.7	**-53.8**	-58.8
Ac5	-45.7	-48.7	**-51.9**	**-55.5**	***-58.8***
Ac6	-46.8	-49.9	**-53.6**	**-54.9**	***-58.8***
Ac7	-48	**-51.6**	**-52.9**	***-54.9***	***-58.8***
Ac8	-50	**-51.4**	***-53.3***	***-55.3***	***-56.8***
Ac9	-50	***-52***	***-53.9***	***-55.9***	***-59.4***
Ac10	***-50***	***-52***	***-53.9***	***-55.5***	***-58.9***
Ac23	-49	***-50***	***-51.9***	***-53.9***	***-57***
Ac24	-48	-50	-51.9	**-53.5**	-56.6
Ac25	-48.5	-50.4	-52	**-53.6**	-56
Ac26	-48.5	-50.1	-51.7	**-53.1**	-55.6

【０３１８】

結果

【０３１９】

ＰＭＯ分子長とＤＭＤ標的ｍＲＮＡに対する予測された自由結合エネルギー（ΔＧ）との関係を特徴付けることで、３０ｍｅｒ未満の配列長で最大活性を保持するＰＭＯオリゴヌクレオチドを同定した。より短い配列は、３０ｍｅｒの親配列と比較して結合エネルギーが低いと予測された（表１１）。表１１におけるＰＭＯの予測された自由結合エネルギー（ΔＧ（ｋｃａｌ／ｍｏｌ））から、オリゴヌクレオチド長が２６～２８の間であり見かけのΔＧが－５０ｋｃａｌ／ｍｏｌ未満である、＋２～＋１０の間のアクセプタ部位を標的とする１３個の異なるＰＭＯを選択し、合成した（表１１のボックスを参照）。これらは、予測されたｈＤＭＤエクソン４４スキッピング活性が５０％超であるＰＭＯ（ｈＥｘ＿４４＿Ａｃ２４＿２８、ｈＥｘ＿４４＿Ａｃ２５＿２８、およびｈＥｘ＿４４＿Ａｃ２８）を含む（データは示さず）。１３個のＰＭＯそれぞれの配列を表１０に示す。さらに、予測された結合エネルギー（ΔＧ）が－４０．８ｋｃａｌ／ｍｏｌである短い２５ｍｅｒ　ＰＭＯ　ｈＥｘ＿４４＿Ａｃ２＿２５を、内部対照として含めた（表１１を参照）。ヒト初代および不死化骨格筋細胞（ｈＳｋＭＣ）におけるエクソン４４スキッピング活性に対するさらなるｉｎ　ｖｉｔｒｏスクリーニングのために、自由結合エネルギー（ΔＧ）が－５０ｋｃａｌ／ｍｏｌ未満である２６～２８－ｍｅｒの範囲の選択された１３個のＰＭＯ、および対照として２５ｍｅｒを合成した。

【０３２０】

Ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのエクソン４４スキッピングのスクリーニングアッセイ

【０３２１】

ヒト筋芽細胞株は、ＥｕｒｏＢｉｏＢａｎｋと提携したＭｙｏＢａｎｋ（認証参照番号ＡＣ－２０１９－３５０２）を通じてＡｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔ　ｄｅ

Ｍｙｏｌｏｇｉｅ－Ｃｅｎｔｒｅ ｄｅ Ｒｅｃｈｅｒｃｈｅ ｅｎ Ｍｙｏｌｏｇｉｅ（ＵＭＲＳ ７８７ ＩＮＳＥＲＭ ａｎｄ Ｓｏｒｂｏｎｎｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｅ、フランス）から入手した。筋芽細胞株は、２０歳の健常な男性ドナーの大腿筋膜（ＡＢ１１６７Ｃ２０ＦＬ）由来であった。５％ＦＢＳを補充したＰｒｏｍｏｃｅｌｌ成長培地（Ｃ－２３１６０）中、細胞を８０％未満の細胞密度で成長させた。不死化筋芽細胞を成長培地中、５００００個の細胞／ウェルで２４ウェルプレートに播種し、コンフルエンスになるまで成長させた後、分化させた。筋管への分化を誘導するために、細胞をＤＭＥＭですすぎ、次いで分化培地（ＤＭＥＭ、５０ｕｇ／ｍＬゲンタマイシン、１０ｐｇ／ｍＬインスリン）中で３～４日間インキュベートした。細胞はトランスフェクションの前に、抗生物質なしで２４時間インキュベートした。ＰＭＯをＧｅｎｅＴｏｏｌによって合成して水に配合し、６５～７０℃で５分間加熱し、２μＭ Ｅｎｄｏ－Ｐｏｒｔｅｒ（Ｇｅｎｅ Ｔｏｏｌｓ、＃ＥＰ６Ｐ１－１）とともに温かい培地に希釈することで、細胞へのＰＭＯ取込みを促進させた。実験は０．３、１、３．３、および１０μＭのＰＭＯを用いて行った。４８時間後、細胞を採取し、前述のようにＲＮＡ単離およびｃＤＮＡ合成を行った。ｑＰＣＲによる定量のために、ＰＣＲ反応を４０回繰り返し、ＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ ６または７ Ｆｌｅｘ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲ機器（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて全体およびエクソン４４スキップＰＣＲ産物の増幅をモニタリングした。データをＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏＴＭ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲソフトウェアｖ１．３（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）によって分析した。エクソン４４スキップｍＲＮＡの％を、１００＊２（ＣＴ（全体）－ＣＴ（スキップ））として算出した。使用したプライマー：ｈＤＭＤ ＴａｑＭａｎアッセイＨｓ０１０４９４０１＿ｍｌ（ＶＩＣ－ＭＧＢ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）またはｈＤＭＤエクソン４３／４５接合部に特異的な特注のＴａｑＭａｎアッセイ（ＦＡＭ－ＭＧＢ、フォワード：５’－ＣＴＧＴＧＧＡＡＡＧＧＧＴＧＡＡＧＣＴＡ－３’（配列番号９０）、リバース：５’－ＧＡＣＡＡＧＧＧＡＡＣＴＣＣＡＧＧＡＴＧ－３’（配列番号９１）、プローブ：５’－ＡＧＣＴＣＴＣＴＣＣＣＡＧＣＴＴＧＡＴＴＴＣＣＡ－３’（配列番号９２）。選択されたＰＭＯの用量応答を特異的結合アルゴリズム（単一部位）に当てはめた。全ＤＭＤ ｍＲＮＡおよびエクソン４４スキップＤＭＤ ｍＲＮＡをＲＴ－ｑＰＣＲによってモニタリングした。選択された主要なＰＭＯの用量応答を特異的結合アルゴリズム（単一部位）に当てはめた。

【０３２２】

選択されたＰＭＯを健常な不死化ｈＳｋＭＣに由来する筋管にトランスフェクトすることで、様々なサイズの３つの異なるＰＭＯは、他のＰＭＯよりも優れたエクソン４４スキッピング活性を呈することが明らかになった。アクセプタ部位７を標的とする２６ｍｅｒ ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６、アクセプタ部位５を標的とする２７ｍｅｒ ｈＥｘ４４＿Ａｃ５＿２７、およびアクセプタ部位４を標的とする２８ｍｅｒ ｈＥｘ４４＿Ａｃ４＿２８は、１０μＭの濃度で少なくとも７５％以上のエクソン４４スキッピング活性を示す（図３）。３個のＰＭＯの中でも、ＰＭＯ ｈＥｘ４４＿Ａｃ７－２６－ｍｅｒは長さ／活性比が最高であり、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏアッセイでのさらなる評価のためにＰＭＯ分子として選択された。

【０３２３】

健常な不死化ｈＳｋＭＣに由来するエクソン４４スキッピング活性に基づき、２６ｍｅｒ ＰＭＯ ｈＥｘ４４＿Ａｃ７－２６（５’－ＣＧＣＣＧＣＣＡＴＴＴＣＴＣＡＡＣＡＧＡＴＣＴＧＴＣ－３’（配列番号１１８）は、３個のＰＭＯの中でも最良のエクソン４４スキッピング活性を呈した。

【０３２４】

実施例４：ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は、健常なヒト細胞およびＤＭＤ患者由来細胞においてエクソン４４スキッピング活性を誘導する

【０３２５】

ヒト不死化および初代骨格筋細胞（ＨＳｋＭＣ）（ＤＭＤ細胞：ＡＢ１３２３－不死化

、４７８１１－初代、４７８９８－初代、健常細胞：ＡＢ１１６７－不死化、ＭＢ０７－初代、ＭＢ０９－初代）を、フランスパリのＩｎｓｔｉｔｕｔ ｄｅ Ｍ ｙｏｌｏｇｉｅ（ｌｏＭ）（不死化）およびイタリアのＢｅｓｔａ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（初代）から入手した。２個の初代細胞および１個の不死化細胞株はそれぞれ、エクソン４５欠失を有するＤＭＤ患者に由来する。不死化細胞を骨格筋成長培地（Ｐｒｏｍｏｃｅｌｌ、Ｃ－２３１６０）中で成長させた。初代細胞を、２０％ＦＢＳ（Ｃｏｒｎｉｎｇ）、１％Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、１０ｕｇ／ｍｌインスリン（Ｓｉｇｍａ）、２５ｎｇ／ｍｌ ｈＦＧＦ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、１０ｎｇ／ｍｌ ＥＧＦ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＤＭＥＭ＋Ｇｌｕｔａｍａｘ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１０５６６－０１６）で構成されるＧＭ中で成長させ、１％Ｍａｔｒｉｇｅｌを被覆した２４ウェルプレートに播種した（２００００個の細胞／ウェル）。筋芽細胞を、骨格筋細胞分化培地（Ｐｒｏｍｏｃｅｌｌ、カタログ番号Ｃ－３９３６６）および１％Ｐｅｎ／Ｓｔｒｅｐを補充したＤＭＥＭ Ｇｌｕｔａｍａｘ（Ｇｉｂｃｏ）中、製造業者の指示に従い２日間、筋管を形成するように誘導した。ＰＭＯをＧｅｎｅＴｏｏｌによって合成した。ＰＭＯを水に配合し、６５～７０℃で５～１０分間加熱し、温かい培地に希釈した。トランスフェクションの４８時間後、細胞を採取した。細胞をＴｒｉｚｏｌ中で回収し、製造業者の指示に従いＤｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ－９６ ＲＮＡ単離キット（Ｚｙｍｏ）を用いたＲＮＡ単離のための処理を行うまで－８０℃で保管した。総ＲＮＡ濃度を分光学的に定量化した。ＳｉｍｐｌｉＡｍｐ熱サイクラ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）中でＨｉｇｈ－Ｃａｐａｃｉｔｙ ｃＤＮＡ逆転写キット（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、１００～５００ｎｇの精製ＲＮＡからｃＤＮＡを調製した。４０ｎｇのｃＤＮＡを、Ｔａｑｍａｎプローブ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｃｈｅｒ）、２Ｘ ｄｄＰＣＲ Ｓｕｐｅｒｍｉｘ（ｄＵＴＰなし）（ＢｉｏＲａｄ）、およびＢａｍＨＩ制限酵素（ＢｉｏＲａｄ）と組み合わせたＱＸ２００ Ａｕｔｏｍａｔｅｄ Ｄｒｏｐｌｅｔ Ｇｅｎｅｒａｔｏｒ（ＢｉｏＲａｄ）中、三通りに液滴に分配した。液滴の生成後、混合物をＰＣＲ増幅のためにディープウェルＣ１０００ Ｔｏｕｃｈ熱サイクラ（ＢｉｏＲａｄ）に装入した。標的ＲＮＡ分子の絶対定量は、ＱＸ Ｍａｎａｇｅｒソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）を用いてＱＸ２００ Ｄｒｏｐｌｅｔ Ｄｉｇｉｔａｌ ＰＣＲシステム（ＢｉｏＲａｄ）で測定した。エクソンスキッピングの割合は、標的エクソンの数を全遺伝子発現に対して正規化することによって算出した。使用したプライマー：ｈＤＭＤ ＴａｑＭａｎアッセイＨｓ０１０４９４０１＿ｍｌ（ＶＩＣ－ＭＧＢ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）またはｈＤＭＤエクソン４３／４５接合部に特異的な特注のＴａｑＭａｎアッセイ（ＦＡＭ－ＭＧＢ、フォワード：５’－ＣＴＧＴＧＧＡＡＡＧＧＧＴＧＡＡＧＣＴＡ－３’（配列番号９０）、リバース：５’－ＧＡＣＡＡＧＧＧＡＡＣＴＣＣＡＧＧＡＴＧ－３’（配列番号９１）、プローブ：５’－ＡＧＣＴＣＴＣＴＣＣＣＡＧＣＴＴＧＡＴＴＴＣＣＡ－３’（配列番号９２））。

【０３２６】

結果

【０３２７】

ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６でトランスフェクトされたエクソン４５欠失由来の筋管を使用して、エクソンスキッピング定量化において高感度かつ非常に正確な方法であるｄｄＰＣＲを使用することによって、初代および不死化の健常な患者またはＤＭＤ患者におけるエクソン４４スキッピング活性を評価した。ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６を用いたこれらのｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイは、エクソン４４スキッピング療法に適している、エクソン４５の欠失を有する健常な患者およびＤＭＤ患者由来の筋管に対して行った。図４Ｃに示すように、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は、健常な患者およびＤＭＤ患者由来の筋管においてエクソン４４スキッピングを誘導することができ、これらの細胞におけるエクソン４４スキッピング活性は用量依存的であった。興味深いことに、結果が示すところでは、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は、ＤＭＤ細胞では健常な細胞よりも高いエクソン４４スキッピング

活性を呈する。ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６でトランスフェクトされたＤＭＤ由来患者細胞におけるエクソン４４スキッピング活性は最大６０％であるが（図４Ｃ）、健常な初代細胞または不死化細胞におけるエクソン４４スキッピング活性はわずか最大１０％である（図４Ａ～図４Ｂ）。いかなる特定の理論にも縛られるものではないが、健常な細胞におけるジストロフィンｐｒｅ－ｍＲＮＡ中にある特定のエクソンのスキッピングは、スキップｍＲＮＡの不安定化および全ジストロフィンｍＲＮＡの減少をもたらし得るが、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は、ＤＭＤ由来患者細胞においてフレームシフトの修復を誘導し、スキップＤＭＤ転写物のレベルを大幅に上昇させるため、全ジストロフィンｍＲＮＡ発現レベルのＷＴレベルへの上昇と高度に相関する可能性がある。

【０３２８】

全体として、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は、健常なヒト細胞およびＤＭＤ患者由来細胞においてエクソン４４スキッピングを誘導することができ、ＤＭＤ患者由来細胞におけるエクソン４４スキッピング活性は、健常なヒト細胞の活性よりも大きい。

【０３２９】

実施例５：ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は、ＤＭＤ患者由来の筋管においてジストロフィン修復を誘導する

【０３３０】

健常な患者およびＤＭＤ患者に由来するヒト初代筋芽細胞を骨格筋成長培地（ＧＭ、Ｚｅｎｂｉｏ）中で増幅させた。０日目に、ウェルごとに１５０００個のヒト初代筋芽細胞を、１０μｇ／ｍｌフィブロネクチン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を被覆した９６ウェルＭｙｏＳｃｒｅｅｎ　ＣＹＴＯＯプレート（ＣＹＴＯＯ）中のＧＭに蒔いた。播種の翌日（１日目）、成長培地を、ダルベッコ改変イーグル培地で構成される分化培地（ＤＭ）：栄養素混合物Ｆ１２（ＤＭＥＭ／Ｆ１２、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、２％ウマ血清（ＨＳ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、および１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と交換した。３日目または６日目、培地交換なしにそれぞれ６日間または３日間、化合物（ＰＭＯおよびＡＯＣ）をＤＭＤ細胞に添加した。ＰＭＯ処理のために、ＰＭＯをＧｅｎｅＴｏｏｌによって合成した。ＰＭＯを７０℃で５分間加熱し、次いでゆっくり冷却してから培地に添加した。この特定の条件では、Ｅｎｄｏ－Ｐｏｒｔｅｒ（ＧｅｎｅＴｏｏｌ）を同時に、送達試薬として１μＭでウェルに添加した。各実験において、陰性対照として使用する、ビヒクル＋／－Ｅｎｄｏ－Ｐｏｒｔｅｒに対応する模擬条件を含めた。９日目、１０％ホルマリン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で３０分間固定した後、筋管をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ）で３回洗浄し、０．５％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で透過処理した。１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）中でブロッキングした後、ブロッキング溶液中で調製した一次抗体で細胞をインキュベートし、筋管をトロポニンＴ特異的抗体（ａｂ４５９３２　Ａｂｃａｍ）またはミオシン重鎖特異的抗体（１４－６５０３－８２　Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）で染色した。Ｃ末端およびＮ末端ジストロフィンを、それぞれＮＣＬ－Ｄｙｓ２抗体およびＮＣＬ－ＤｙｓＢ抗体（Ｌｅｉｃａ）を用いて染色した。次いで、ＤＰＢＳで３回洗浄した後、ＢＳＡ　１％中で調製した二次抗体をＨｏｅｃｈｓｔ　３３３４２とともにウェルに添加した。最後に細胞をＤＰＢＳで３回洗浄してから獲得した。１０ｘ／０．３ＮＡ対物レンズ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を備えたＯｐｅｒｅｔｔａ　ＨＣＳ撮像システムを用いて、定量的顕微鏡法を実施した。筋管および核のカスタマイズされたセグメント化を含む、Ａｃａｐｅｌｌａソフトウェア（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で開発されたスクリプトを使用して、画像を分析した。筋管は、骨格筋分化マーカであるトロポニン－Ｔまたはミオシン重鎖（ＭＨＣ）において陽性であって、筋管の最小／最大面積、最大配向、最小伸長、および最小／最大長などの最適化された特定のフィルタに適合する面積として定めた。核カウント（ｎｕｃｌｅｉ　ｃｏｕｎｔ）を行い、核の総数を定めた。融合指数（ＦＩ）を、核の総数で割った筋管染色領域内の核の数として算出し、パーセンテージで表した。画像境界に接触する筋管を除外した後、最終的に筋管全体を使用して、筋管面積およびジストロフィン平均強

度を抽出した。各実験には３名の健常ドナーを含めた。これらの健常な筋管におけるジストロフィン発現の平均強度を算出し、次の式：ジストロフィン修復％＝（ＩＤＭＤ処置－ＩＤＭＤ模擬）／（Ｉ平均健常－ＩＤＭＤ模擬）で算出されたＤＭＤ処置条件におけるジストロフィン修復のパーセンテージを評価するための基準として使用した。陽性の筋管のパーセンテージを、対応の模擬条件を用いて判定された閾値よりも優れたジストロフィン強度を発現する筋管のパーセンテージとして、条件ごとに判定した。

【０３３１】

Ｊｅｓｓ Ｃａｐｉｌｌａｒｙウェスタンブロット

【０３３２】

エクソン４５欠失を有する患者由来のヒト不死化骨格筋芽細胞および健常なヒト不死化骨格筋芽細胞を、Ｇｅｎｅｒａｌ Ｍｅｄｉａ（骨格筋成長培地、Ｐｒｏｍｏｃｅｌｌ ｃ－２３１６０、ゲンタマイシン５％、Ｇｉｂｃｏ １５７１００６４）中、２０，０００個の細胞／ウェルの開始密度で、１％マトリゲルを被覆した２４ウェルプレートに蒔いた。分化培地（ＤＭＥＭ＋Ｇｌｕｔｍａｘ Ｇｉｂｃｏ １０５６６－０１６、Ｉｎｓｕｌｉｎ Ｐｒｏｍｏｃｅｌｌ Ｃ－３９３６６）を添加することによって、播種の３日後に筋芽細胞から筋管への分化を開始した。分化の４日後およびＰＭＯ処置の２日後、筋芽細胞を回収した。氷上で、筋芽細胞は冷ＤＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ １４１９０１４４）での２回の洗浄サイクルを経て、その後、Ｍ－ＰＥＲ溶解緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ、７８５０１）およびＨａｌｔプロテアーゼ阻害剤（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ、７８４２９）で５分間インキュベートした。次いで、各ウェルを個々に２０秒間擦った。次いで、懸濁液を回収し、１４０００ｇで１５分間、４℃で遠心分離にかけた。上清を回収し、総タンパク質濃度を、製造業者の指示に従いＰｉｅｒｃｅ ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、２３２２７）を用いて測定した。試料を３００μｇ／ｍＬに正規化した。次いで、試料を液体窒素中で急速冷凍した後、Ｊｅｓｓ Ｃａｐｉｌｌａｒｙウェスタンブロットで定量化した。６６－４４０ｋＤＡ分離モジュール（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｉｍｐｌｅ、ＳＭ－Ｗ００８）、抗ウサギ検出モジュール（ＰｒｏｔｅｉｎＳｉｍｐｌｅ、ＤＭ－００１）、およびＲｅｐｌｅｘモジュール（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｉｍｐｌｅ、ＲＰ－００１）を備えたｐｒｏｔｅｉｎ ｓｉｍｐｌｅ Ｊｅｓｓシステムを用いるキャピラリーウェスタンブロット分析によって、ジストロフィンタンパク質の定量化を測定した。抗ジストロフィンウサギモノクローナル抗体（Ａｂｃａｍ、ＡＢ１５４１６８）特異的ジストロフィンを、抗体希釈緩衝液２（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｉｍｐｌｅ）中で１：５０００に希釈した。抗ウサギ検出モジュールには、ブロッキング試薬（抗体希釈剤）、ＨＲＰ抱合抗ウサギ二次抗体、および化学発光基質が含まれていた。Ｒｅｐｌｅｘモジュールには、総タンパク質正規化薬剤およびビオチン化剤が含まれていた。これらの試薬を製造業者のプロトコルに従い播種した。試料緩衝液（分離モジュールから１００倍希釈した「１０倍試料緩衝液」）中で適切な濃度に希釈した試料タンパク質をキャピラリー中で分離し、化学発光シグナルによって分析した。ジストロフィンシグナルは、Ｃｏｍｐａｓｓソフトウェア（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｉｍｐｌｅ）によって判定した。次の基準を使用して、低ジストロフィンシグナルをバックグラウンドと判別した：ソフトウェアによって与えられるピークシグナル対ノイズ（Ｓ／Ｎ）比は１０以上でなければならず、ピーク高さ／ベースライン比（ソフトウェアによって与えられるピーク高さおよびベースライン値からマニュアルで算出する）は３以上でなければならない（Ｂｅｅｋｍａｎら２０１８から採用）。シグナルは、最終定量化において各試料の総タンパク質に正規化した。

【０３３３】

結果

【０３３４】

ＭｙｏＳｃｒｅｅｎプラットフォームを用いてジストロフィン修復アッセイを行った。このプラットフォームは、培養筋管の分化、成熟、および長寿について最適化された培養条件を使用し、免疫蛍光によるジストロフィン修復の定量化を可能にする。図５Ａは、ジ

ストロフィン陽性線維に対して免疫蛍光染色されたＭｙｏＳｃｒｅｅｎプラットフォーム上の健常な細胞およびＤＭＤ患者由来細胞の写真を示す。健常な細胞（左パネル）およびｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６でトランスフェクトされたＤＭＤ患者由来細胞（右パネル）は、陽性の細胞免疫蛍光染色によって示されるようにジストロフィンの存在を示したが、ＤＭＤ患者由来細胞は、免疫蛍光染色の欠如によって証明されるように、いずれのジストロフィンも発現しなかった（中央パネル）。

【０３３５】

ＰＭＯ４４でトランスフェクトされた患者由来細胞におけるジストロフィン修復に対する免疫蛍光染色の定量分析より、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は、３名の患者に由来する初代筋管（エクソン４５欠失を有する２個の初代細胞と１個の不死化細胞株）において用量依存的にジストロフィンを効率よく修復したことが認められた（図５Ｂ）。ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は、不死化ＤＭＤ患者由来細胞株では野生型細胞（健常な初代細胞）と比較してジストロフィンを最大１００％修復することができ、一方で、２個の初代ＤＭＤ患者由来細胞では野生型細胞と比較してジストロフィンに最大７０％の修復を誘導することができた。ジストロフィン修復レベルの変動は、ＤＭＤドナー細胞に依拠し得る。

【０３３６】

さらに、ジストロフィン修復レベルを、健常な細胞および不死化ＤＭＤ患者由来細胞においてＪｅｓｓ ｃａｐｉｌｌａｒｙウェスタンブロッティングを用いても定量化した（図５Ｃ）。結果が示すところでは、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は、健常な初代細胞のジストロフィンのレベルと比較して、ＤＭＤ患者由来細胞のジストロフィン発現レベルを最大５０％修復することができる。

【０３３７】

全体として、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は、初代細胞および不死化ＤＭＤ患者由来細胞においてジストロフィンおよびＤＡＰＣを修復することができ、ジストロフィン修復の程度はＤＭＤドナー細胞に依拠した。

【０３３８】

実施例６：ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６で処置した野生型サル筋管におけるｉｎ ｖｉｔｒｏでの用量依存性のエクソン４４スキッピング活性

【０３３９】

野生型カニクイザル初代骨格筋細胞（ロット番号ＳＫＭ１１０４１４）を、Ｗｏｒｌｄｗｉｄｅ Ｐｒｉｍａｔｅ（ＷＷＰ）から入手した。細胞をＺｅｎｂｉｏ ＧＭ培地（ＳＫＭ－Ｍ）中で成長させ、１％Ｍａｔｒｉｇｅｌ（Ｃｏｒｎｉｎｇ）を被覆した２４ウェルプレート上で播種した（２０，０００個の細胞／ウェル）。筋芽細胞を、製造業者の指示に従い、Ｚｅｎｂｉｏ ＤＭ培地（ＳＫＭ－Ｄ）中で２日間、筋管を形成するように誘導した。ＰＭＯをＧｅｎｅＴｏｏｌによって合成した。ＰＭＯを水に配合し、６５～７０℃で５～１０分間加熱し、１μＭ Ｅｎｄｏ－Ｐｏｒｔｅｒ（Ｇｅｎｅ Ｔｏｏｌｓ、＃ＥＰ６Ｐ１－１）とともに温かい培地に希釈することで、細胞へのＰＭＯ取込みを促進させた。トランスフェクションの４８時間後、細胞を採取した。細胞をＴｒｉｚｏｌ中で回収し、製造業者の指示に従いＤｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ－９６ ＲＮＡ単離キット（Ｚｙｍｏ）を用いたＲＮＡ単離のための処理を行うまで－８０℃で保管した。総ＲＮＡ濃度を分光学的に定量化した。ＳｉｍｐｌｉＡｍｐ熱サイクラ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）中でＨｉｇｈ－Ｃａｐａｃｉｔｙ ｃＤＮＡ逆転写キット（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、１００～５００ｎｇの精製ＲＮＡからｃＤＮＡを調製した。エクソン４３～４５接合部に及ぶスキップＤＭＤ（ＩＤ番号ＡＰ７ＤＵＹＪ）およびエクソン３９～４０接合部に及ぶ全ＤＭＤ（ＩＤ番号Ｍｆ０１０４９４３６＿ｍ１）を標的とする６０Ｘ Ｔａｑｍａｎプローブ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｃｈｅｒ）、Ｔａｑｍａｎプローブ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｃｈｅｒ）、２Ｘ ｄｄＰＣＲ Ｓｕｐｅｒｍｉｘ（ｄＵＴＰなし）（ＢｉｏＲａｄ）、およびＢａｍＨＩ制限酵素（ＢｉｏＲａｄ）と組み合わせたＱＸ２００ Ａｕｔｏｍａｔｅｄ Ｄｒｏｐｌｅｔ Ｇｅｎｅｒａｔｏｒ（ＢｉｏＲａｄ）中、４０ｎｇのｃＤＮＡを三通りに液滴に分配した。液滴の生成後、混合物をＰＣ

Ｒ増幅のためにディープウェルＣ１０００　Ｔｏｕｃｈ熱サイクラ（ＢｉｏＲａｄ）に装入した。標的ＲＮＡ分子の絶対定量は、ＱＸ　Ｍａｎａｇｅｒソフトウェア（ＢｉｏＲａｄ）を用いてＱＸ２００　Ｄｒｏｐｌｅｔ　Ｄｉｇｉｔａｌ　ＰＣＲシステム（ＢｉｏＲａｄ）で測定した。ジストロフィンのエクソンスキッピングの割合は、標的エクソンの数を全遺伝子発現に対して正規化することによって算出した。

【０３４０】

結果

【０３４１】

サルＤＭＤ遺伝子におけるエクソン４４のアクセプタ配列はヒトのアクセプタ配列と同一であるため、本発明者らは、ｄｄＰＣＲを使用して漸増濃度のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６で処置した初代健常サル筋管におけるエクソン４４スキッピング活性を評価した。図６Ａ～図６Ｂに示すように、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで初代健常サル筋管においてエクソン４４スキッピングの強力な用量依存性応答を誘導する。ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は、健常なサル筋管において２５％超のエクソン４４スキッピング（図６Ａ）および１μｌごとに最大１００個のエクソン４４スキップコピー（図６Ｂ）を誘導する。興味深いことに、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は、対照群におけるジストロフィンｍＲＮＡコピーと比較して、１μｌごとのＤＭＤコピーの総数を４００未満に減少させた。健常なヒト筋管（実施例４を参照）と同様に、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６によってトランスフェクトされた健常サル細胞における総ジストロフィンｍＲＮＡコピー数の減少は、ＤＭＤ細胞と比較して最大２５％であり、これは、スキップされたエクソンｍＲＮＡの不安定化をもたらす、ジストロフィンｍＲＮＡのアウトオブフレーム変異に起因し得る。

【０３４２】

全体として、これらの結果より、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６は初代健常サル細胞においてＤＭＤ　ｍＲＮＡレベルを低下させることができ、健常な細胞においてＰＭＯによって誘導されるエクソン４４スキッピングは、ＤＭＤ　ｍＲＮＡのアウトオブフレーム変異によって生じ得るＤＭＤ遺伝子発現を低下させることが実証される。

【０３４３】

実施例７：３０ｍｇ／ｋｇのＰＭＯ（ｈＥｘ４４－Ａｃ７－２６）用量レベルに相当する１５９．９ｍｇ／ｋｇの用量のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣを０日目に単回用量で投与されたカニクイザルの筋肉組織および非筋肉組織における、エクソン４４スキッピングコピーの生体内分布。

【０３４４】

スキーム１：ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣの合成および精製

【０３４５】

抗ヒトトランスフェリン受容体抗体を産生した。ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６ＰＭＯをＧｅｎｅＴｏｏｌによって合成した。ホウ酸緩衝液（２５ｍＭテトラホウ酸ナトリウム、２５ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭジエチレントリアミンペンタ酢酸、ｐＨ８．０）中の抗体（１０ｍｇ／ｍｌ）を、水中の４当量のトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）を添加して３７℃で４時間インキュベートすることによって還元した。ＤＭＳＯ中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６ＰＭＯ（５０ｍｇ／ｍｌ）をＤＭＳＯ中の１０当量のＳＭＣＣ（１０ｍｇ／ｍｌ）で１時間インキュベートすることによって、４（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＳＭＣＣ）を、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６ＰＭＯの３’末端上の第一級アミンにカップリングさせた。非コンジュゲートＳＭＣＣを、３ｋＤａのＭＷＣＯを備えるＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５遠心フィルタユニットを用いた限外濾過によって除去した。ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６ＰＭＯ－ＳＭＣＣを酢酸緩衝液（１０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ６．０）で３回洗浄し、直ちに使用した。還元した抗体を２．２５当量のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６ＰＭＯ－ＳＭＣＣと混合し、４℃で一晩インキュベートした。次いで、反応混合物のｐＨを７．５に低下させ、８当量のＮ－エチルマレイミドを混合物に室温で３０分間かけて添加して、未反応のシステインをクエンチした。

【０３４６】
反応混合物を、ＨＩＣ法－１を用いてＡＫＴＡ　Ｅｘｐｌｏｒｅｒ　ＦＰＬＣにより精製した。コンジュゲートに応じて、薬物対抗体比が１（ＤＡＲ１）、２（ＤＡＲ２）、３（ＤＡＲ３）、４（ＤＡＲ４）、５（ＤＡＲ５）、６（ＤＡＲ６）、７（ＤＡＲ７）、８（ＤＡＲ８）であるいずれかのコンジュゲートを含有する画分、または薬物対抗体比が３＋（ＤＡＲ３＋）、４＋（ＤＡＲ４＋）、５＋（ＤＡＲ５＋）、６＋（ＤＡＲ６＋）、７＋（ＤＡＲ７＋）、（ＤＡＲ８＋）であるコンジュゲートを含有する画分、または平均薬物対抗体比が１（ＤＡＲ１）、２（ＤＡＲ２）、３（ＤＡＲ３）、４（ＤＡＲ４）、５（ＤＡＲ５）、６（ＤＡＲ６）、７（ＤＡＲ７）、または８（ＤＡＲ８）であるコンジュゲートを含有する画分を合わせて、５０ｋＤａのＭＷＣＯを備えたＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５遠心フィルタユニットにより濃縮した。濃縮したコンジュゲートを、分析前にＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－１５遠心分離フィルタユニットを用いてＰＢＳ（ｐＨ７．４）と緩衝液交換した。

【０３４７】
疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）法－１
カラム：ＧＥ、ＨｉＳｃｒｅｅｎ　Ｂｕｔｙｌ　ＨＰ、４．７ｍｌ
溶媒Ａ：５０ｍＭリン酸緩衝液、０．７Ｍ硫酸アンモニウム、ｐＨ７．０；溶媒Ｂ：８０％５０ｍＭリン酸緩衝液、２０％ＩＰＡ、ｐＨ７．０；流速：１．０ｍｌ／分
勾配：

Ａの％	Ｂの％	カラム体積
１００	０	１
７０	３０	２５
０	１００	１
０	１００	２

ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣをＢＣＡによって定量化し、ＨＩＣ（Ａｖｇ　ＤＡＲ　３．８～４．０）、ＳＥＣ（３．３％ＨＭＷ）、およびＬＡＬ（抗トランスフェリン受容体抗体１ｍｇにつき０．０２５ＥＵ未満）によって分析した。生成物を４℃で保管した。

【０３４８】
スキーム２：ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣの合成および精製

【０３４９】
抗ヒトトランスフェリン受容体抗体を産生した。ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６ＰＭＯを合成した。クエン酸緩衝液（５０ｍＭクエン酸ナトリウム、３００ｍＭスクロース、ｐＨ６．５）中の抗体（２０．４ｍｇ／ｍｌ）をエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ、０．５Ｍ、０．５９１ｍＬ）と合わせ、水中の２当量のトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）を添加して３７℃で２時間インキュベートすることによって還元した。ｐＨ７．２の５０ｍＭリン酸緩衝液中のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６ＰＭＯ（５０ｍｇ／ｍｌ）をＤＭＳＯ中の３当量のＳＭＣＣ（５０ｍｇ／ｍｌ）で１時間インキュベートすることによって、４（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＳＭＣＣ）を、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６ＰＭＯの３’末端上の第一級アミンにカップリングさせた。非コンジュゲートＳＭＣＣを、酢酸緩衝液（１０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ６．０）を含む３ｋＤａの膜ＭＷＣＯによるタンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）によって除去した。還元した抗体を４．７５当量のｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６ＰＭＯ－ＳＭＣＣと混合し、室温で１時間インキュベートした。Ｎ－エチルマレイミド（１０当量、ＤＭＳＯ中１５ｍｇ／ｍｌ、２５ｍｇ）を混合物に室温で３０分間かけて添加して、未反応のシステインをクエンチした。エンドトキシンを含まない水を用いて反応物を１Ｌに希釈した。ＳＣＸ法－１を用いたＳＣＸ精製（ＧＥ　ＳＰ／ＨＰ　１６　１０樹脂）により、過剰なＰＭＯおよびＮＥＭを除去した。合わせた画分をＴＦＦによりクエン酸緩衝液（５０ｍＭクエン酸ナトリウム、６０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ５．５）へと緩衝液交換し、約２５ｍｇ　Ａｂ／ｍＬに濃縮した。溶液を０．２２ｕｍ膜で滅菌濾過した。

【０３５０】
強陽イオンクロマトグラフィー（ＳＣＸ）法－１
カラム：ＧＥ　ＨｉＳｃａｌｅ　５０、ＨｉＰｒｅｐ　ＳＰ　ＨＰ、２００ｍｌ
溶媒Ａ：２５ｍＭ酢酸塩、２５ｍＭ　ＰＢ、ｐＨ６；溶媒Ｂ：２５ｍＭ酢酸塩、２５ｍＭ　ＰＢ、ｐＨ６、０．５ｍＭ　ＮａＣｌ；流速：３０ｍｌ／分
勾配：

Ａの％	Ｂの％	カラム体積
１００	０	３
４０	６０	１．５
０	１００	０．２
０	１００	１

ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣをＢＣＡによって定量化し、ＨＩＣ（Ａｖｇ　ＤＡＲ　３．８～４．０）、ＳＥＣ（３．３％ＨＭＷ）、およびＬＡＬ（抗トランスフェリン受容体抗体１ｍｇにつき０．０２５ＥＵ未満）によって分析した。生成物を４℃で保管した。

【０３５１】
スキーム３：ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣの合成および精製

【０３５２】
抗ヒトトランスフェリン受容体抗体をクエン酸緩衝液（５０ｍＭクエン酸ナトリウム、３００ｍＭスクロース、ｐＨ６．５）中で産生した。ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６ＰＭＯ－ＳＭＣＣは、４（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＳＭＣＣ）をｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６ＰＭＯの３’末端の第１級アミンにカップリングすることによって合成した。エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ、０．５Ｍ、０．０５ｍＬ）を抗体に添加し、溶液を完全に混合した。抗体をトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ、Ｈ２Ｏ中２０ｍｇ／ｍＬ、１０当量、１９．５ｍｇ、０．９７３ｍＬ）の添加によって還元し、溶液を３７℃で２時間インキュベートした。還元した抗体溶液をインキュベータから取り出し、室温に冷却した。ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６ＰＭＯ－ＳＭＣＣ溶液（１２当量、１０ｍＭ酢酸塩中２７．４ｍｇ／ｍＬ、ｐＨ６、２６．１ｍＬ）を還元抗体溶液に添加し、完全に混合した。反応を室温で１時間進行させた。ｎ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）溶液（１０当量、ＤＭＳＯ中２５ｍｇ／ｍＬ、８．５ｍｇ、０．３４ｍＬ）を反応混合物に添加し、反応を室温で３０分間進行させて未反応システインをクエンチした。エンドトキシンを含まない水を用いて反応混合物を０．２Ｌに希釈した。強陽イオンクロマトグラフィー精製ＳＣＸ法－１により過剰なＰＭＯおよびＮＥＭを除去した。合わせた画分を、スピン濾過を用いてヒスチジン緩衝液（２０ｍＭヒスチジン、１０ｍＭメチオニン、１２０ｍＭスクロース、ｐＨ６．０）に緩衝液交換し、ＢＣＡアッセイによって定量化した（０．７９ｇ、収率７９％）。溶液を０．２２μｍ膜で滅菌濾過した。ＢＣＡによってＰＭＯ４４－ＡＯＣを定量化し、疎水性相互作用クロマトグラフィー（平均ＤＡＲ　８）、サイズ排除クロマトグラフィー（３．３％ＨＭＷ）、還元キャピラリーゲル電気泳動（平均ＤＡＲ　７．８～８．０）、およびヒトトランスフェリン受容体に対するＥＬＩＳＡ結合親和性（７４．５ｐＭのＫｄ）によって分析した。ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣ　ＤＡＲ８　ＡＯＣの親和性は、図７に示すように非コンジュゲート抗トランスフェリン受容体抗体と等価であった。

【０３５３】
エクソン４４スキッピングアッセイ

【０３５４】
カニクイザルに、３０ｍｇ／ｋｇのＰＭＯ用量レベルに相当する１５９．９ｍｇ／ｋｇのｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣの単回静脈内（ＩＶ）注射を行った。４３／４４日目（剖検前）に、カニクイザルから筋肉組織および非筋肉生検試料を入手した。ビヒクル対照群では、動物はｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣをいずれも受けなかった。群ごとにオスの動物４匹を分析した。

【０３５５】
２０～５０ｍｇの範囲のカニクイザル筋肉組織および非筋肉試料を、１ｍＬのＴＲＩｚｏｌ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）中、ＯＭＮＩ Ｂｅａｄ Ｒｕｐｔｏｒ Ｅｌｉｔｅシステム（ＯＭＮＩ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ）上で均質化した。製造業者の指示に従い、Ｄｉｒｅｃｔ－ｚｏｌ－９６ ＲＮＡキット（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して組織ホモジネート上清からＲＮＡを単離した。２５０ｎｇの精製ＲＮＡを、大容量ｃＤＮＡ逆転写キット（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）およびＳｉｍｐｌｉＡｍｐ熱サイクラ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いてｃＤＮＡに変換した。ｄｄＰＣＲは、市販のＴｏｔａｌ ＤＭＤ Ｔａｑｍａｎアッセイ（Ｍｆ０１０４９４３６＿ｍ１ ＶＩＣ－ＭＧＢ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）、ｃｕｓｔｏｍ Ｓｋｉｐｐｅｄ ＤＭＤ Ｔａｑｍａｎアッセイ（フォワードプライマー：ＡＡＧＧＡＣＣＧＡＣＡＡＧＧＧＡＡＣＴ（配列番号９３）、プローブ（ＦＡＭ－ＭＧＢ）：ＴＴＣＴＧＡＣＡＡＣＡＧＴＴＴＧＣＣＧＣＴＧＣ（配列番号９４）、リバースプライマー：ＧＣＴＧＡＡＴＴＡＴＴＴＣＴＴＣＣＧＣＡＧＴＴＧ（配列番号９５）、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）、プローブ用のｄｄＰＣＲ Ｓｕｐｅｒｍｉｘ（ｄＵＴＰなし、Ｂｉｏ－Ｒａｄ）、ＢａｍＨＩ－ＨＦ制限酵素（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ）、およびＡｍｂｉｏｎ ｎｕｃｌｅａｓｅ ｆｒｅｅ ｗａｔｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を伴う反応において、５０ｎｇのｃＤＮＡ上で実行した。三通りに実施された各試料を、ＱＸ２００ Ａｕｔｏｍａｔｅｄ Ｄｒｏｐｌｅｔ Ｇｅｎｅｒａｔｏｒ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）中で液滴に分配した。液滴生成後、９６－Ｄｅｅｐ Ｗｅｌｌ Ｒｅａｃｔｉｏｎ Ｍｏｄｕｌｅ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を備えたＣ１０００ Ｔｏｕｃｈ熱サイクラに試料を移した。ＰＣＲ増幅後、試料をＱＸ２００ Ｄｒｏｐｌｅｔ Ｒｅａｄｅｒ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に装入した。ＱＸ Ｍａｎａｇｅｒソフトウェア、標準版、バージョン１．２（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用してデータを分析した。陽性液滴と陰性液滴との判別は、蛍光振幅閾値をマニュアルで適用することによって達成した。エクソンスキッピングの割合を、１００＊（１μＬごとのスキップエクソン４４のコピー数／１μＬごとの全ＤＭＤコピー）として算出した。

【０３５６】
結果

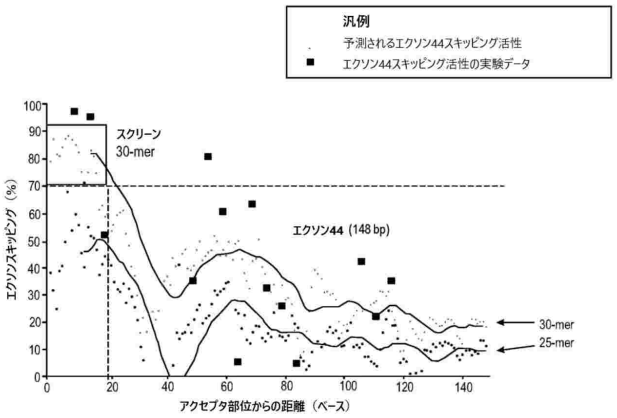
【０３５７】
カニクイザルに、３０ｍｇ／ｋｇのＰＭＯ（ｈＥｘ４４－Ａｃ７－２６）用量レベルに相当する１５９．９ｍｇ／ｋｇの用量のｈＥｘ４４－Ａｃ７－２６－ＡＯＣの単回ＩＶ注射を０日目に行った。動物から得た筋肉組織および非筋肉組織を投与の４３／４４日後に回収し、これら組織中のエクソン４４スキップコピーの数をｄｄＰＣＲによって測定した。エクソン４４スキッピング活性は、ＰＢＳ注射した試料では検出されなかった。１５９．９ｍｇ／ｋｇのｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣを単回用量でＩＶ注射して４４日後、エクソン４４スキッピング活性はすべての筋肉組織で検出されたが、肝臓および腎臓を含む非筋肉組織では検出されなかった（図８を参照）。筋肉中のエクソン４４スキッピング活性は、骨格筋のほか心筋でも検出された。筋肉組織中のエクソン４４スキッピング活性の最高レベルは、エクソン４４スキッピングコピーがｃＤＮＡ １ｎｇにつき２５を超える大腿直筋で検出され、最低レベルは、コピーがｃＤＮＡ １ｎｇにつき５未満の上腕二頭筋で検出された。さらに、心臓の心房および心室中のエクソン４４スキッピング活性を、ｃＤＮＡ １ｎｇにつき平均で約７のエクソン４４スキッピングコピーで測定した。これらの結果が示すところでは、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣは筋肉組織、骨格筋と心筋との両方を特異的に標的とし、これら特定の組織においてエクソン４４スキッピングを誘導する。エクソン４４スキッピング活性は、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣの単回ＩＶ注入の４３日後に検出され、その長時間作用型活性を標的組織で認めた。全体として、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣによって誘導されるエクソン４４スキッピング活性は筋肉組織に特異的であり、ｈＥｘ４４＿Ａｃ７＿２６－ＡＯＣは、筋肉組織に挑戦型エクソン４４スキッピング活性を有する。

【０３５８】

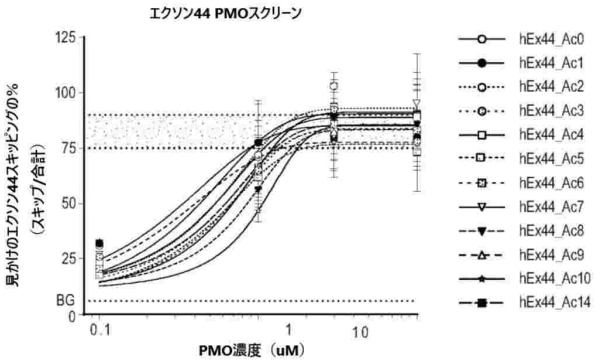
本開示の好ましい態様が本明細書に示され、かつ記載されてきたが、そのような態様は単なる例として提供されることが当業者には明白であろう。当業者には、本開示から逸脱することなく多数の変形、変更、および置換えが想到されるであろう。本明細書に記載される本開示の態様に対する様々な代替物が、本開示の実施において採用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲は本開示の範囲を定めること、およびこれら特許請求の範囲内の方法および構造、ならびにそれらの等価物は特許請求の範囲によってカバーされることが意図される。

【図面】

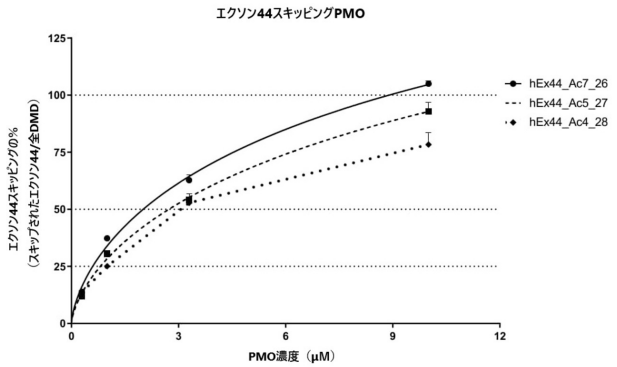
【図１】



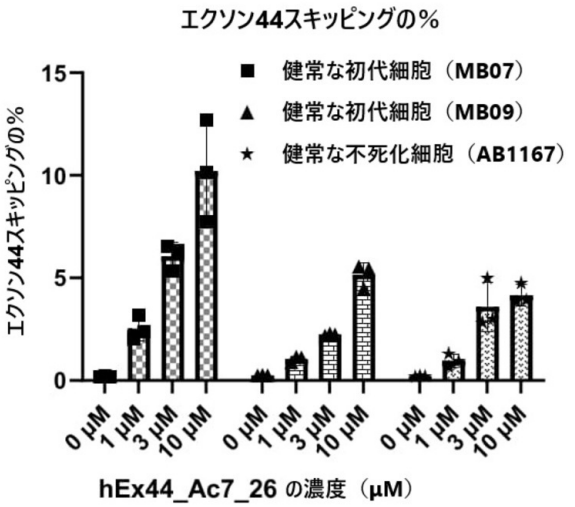
【図２】



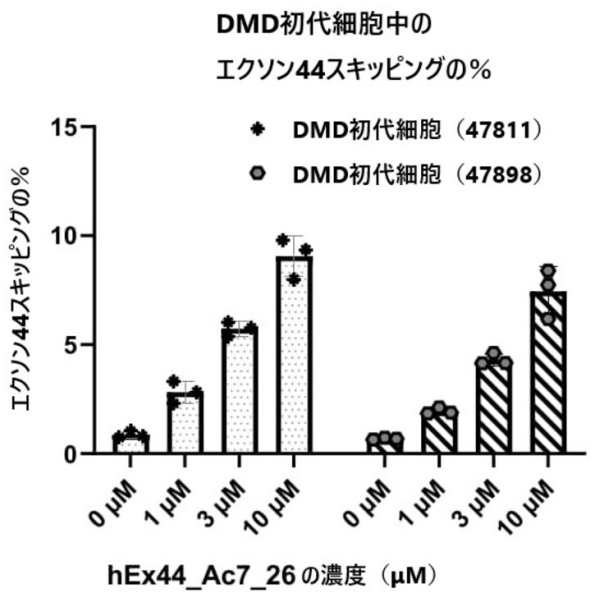
【図３】



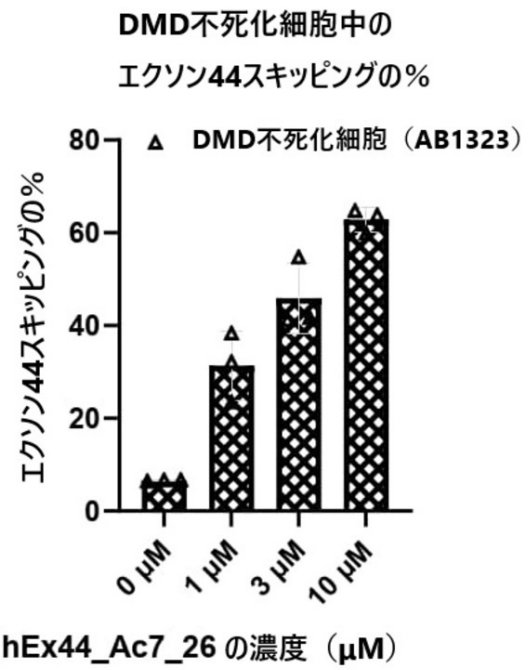
【図４Ａ】



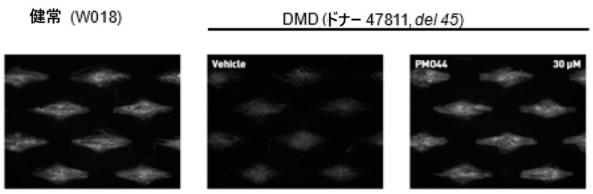
【図４Ｂ】



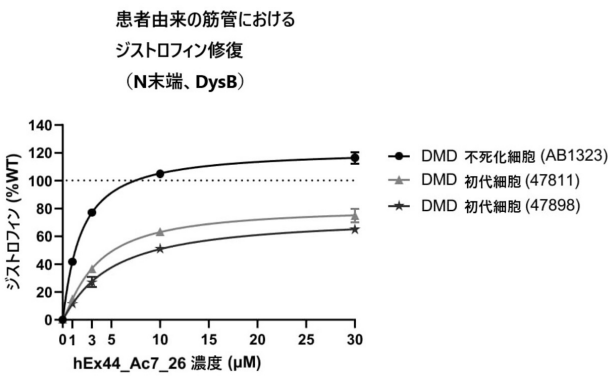
【図４Ｃ】



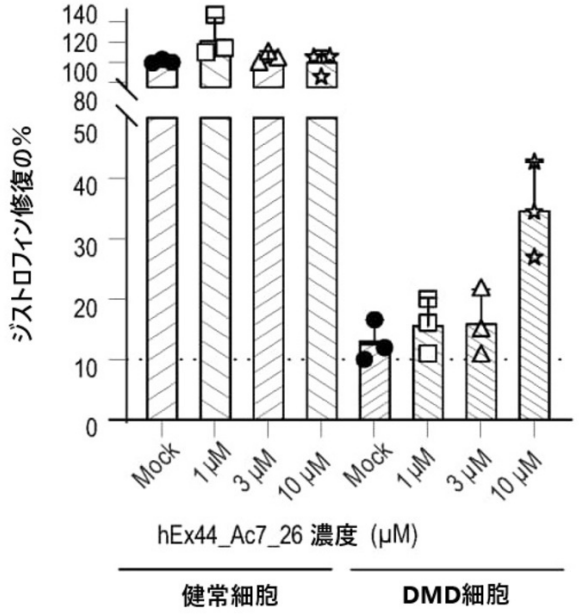
【図５Ａ】



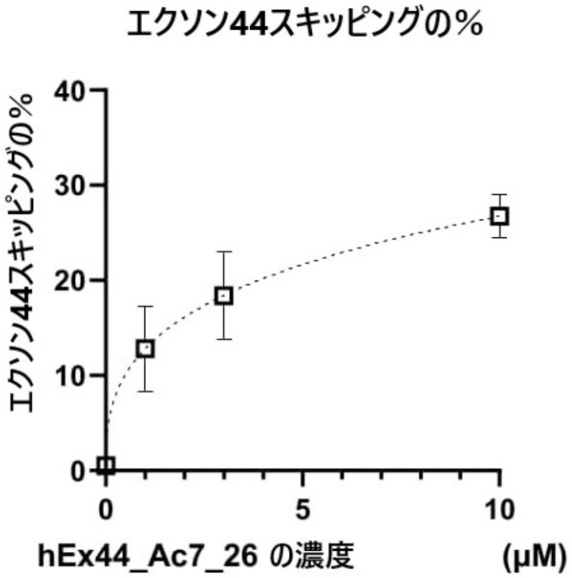
【図５Ｂ】



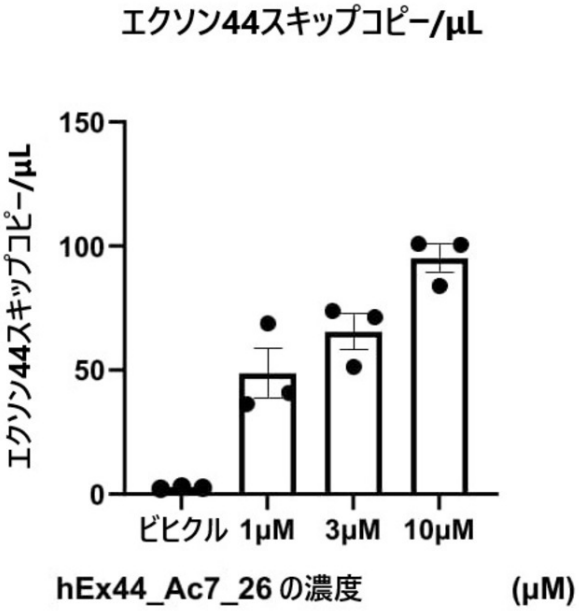
【図５Ｃ】



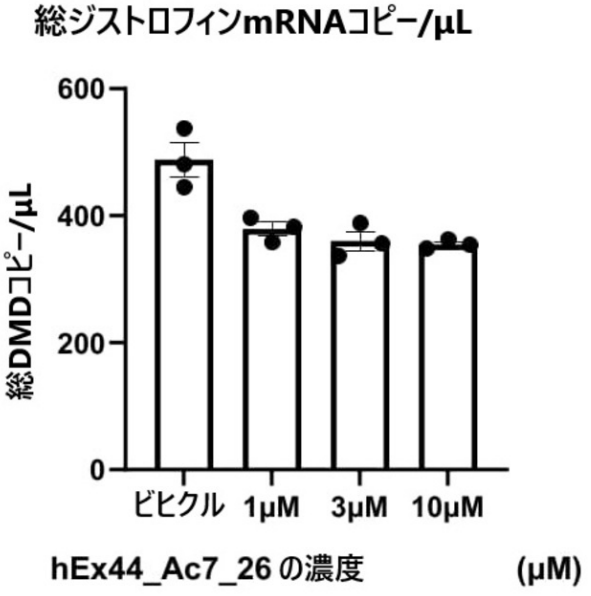
【図６Ａ】



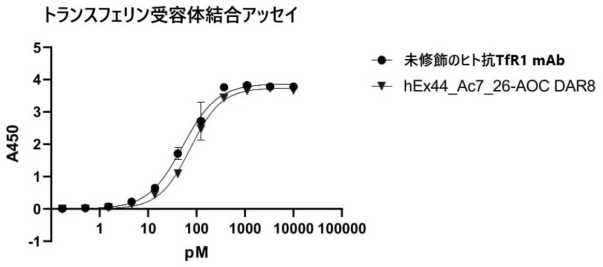
【図６Ｂ】



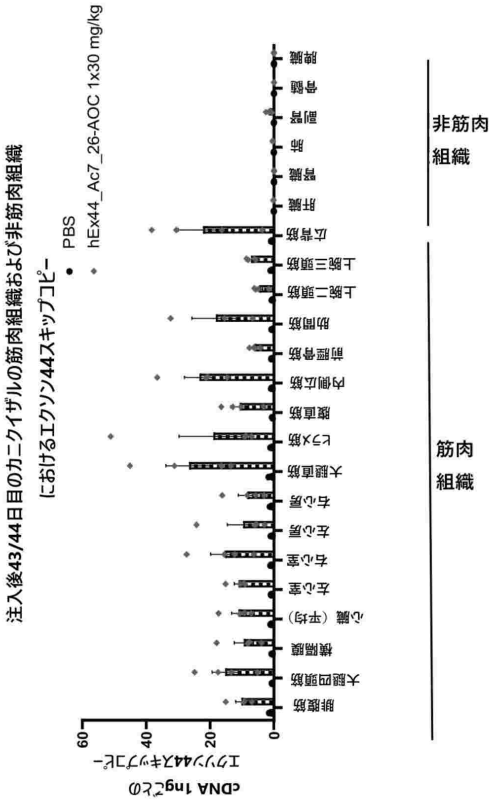
【図６Ｃ】



【図７】



【図８】



【配列表】

<u>202551171400000 1.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/017574

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - INV. - C12N 15/113; A61K 31/7125, 47/68; A61P 21/00; C07K 16/28 (2023.01)
ADD.

CPC - INV. - C12N 15/113; A61K 31/7125, 47/6807, 47/6849; A61P 21/00; C07K 16/2881 (2023.08)

ADD. - A61K 2039/505; C12N 2310/314, 2310/3233, 2310/3513, 2320/32 (2023.08)

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/060775 A1 (AVIDITY BIOSCIENCES LLC) 28 March 2019 (28.03.2019) entire document	1-3, 22-25, 38-40, 54-56
A	US 2020/0282074 A1 (AVIDITY BIOSCIENCES INC.) 10 September 2020 (10.09.2020) entire document	1-3, 22-25, 38-40, 54-56
A	US 2021/0395742 A1 (UNIVERSITY OF HAWAII) 23 December 2021 (23.12.2021) entire document	1-3, 22-25, 38-40, 54-56

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 October 2023	OCT 31 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/017574

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/017574

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 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/017574

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 4-21, 26-37, 41-53
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet(s).

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 22-25, 38-40, 54-56

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/017574

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

Group I+: claims 1-3, 22-25, 38-40, and 54-56 are drawn to phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO) conjugates, methods of treating muscular dystrophy in a subject in need thereof, methods of inducing exon 44 skipping in a targeted pre-mRNA transcript of DMD gene, methods of inducing exon 44 skipping in a DMD subject in need thereof, methods of restoring dystrophin in a DMD subject in need thereof, and methods of generating a truncated dystrophin protein in a DMD subject in need thereof.

The first invention of Group I+ is restricted to a PMO molecule sequence of SEQ ID NO: 100. The first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. Specifically, the first named invention was selected based on the first listed PMO molecule sequence species presented in the claims (see claim 1). It is believed that claims 1-3, 22-25, 38-40, and 54-56 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on.

Applicant is invited to elect additional PMO molecule sequences, and their respective, corresponding, SEQ ID NOs, to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a PMO molecule sequence of SEQ ID NO: 101. Additional PMO molecule sequences, and their respective, corresponding, SEQ ID NOs will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

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

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for PMO conjugates, treating muscular dystrophy, inducing exon 44 skipping in a DMD gene, restoring dystrophin in a DMD subject requiring the selection of alternative PMO molecule sequences where "wherein the PMO molecule comprises a sequence selected from a group consisting of SEQ ID NOs:100-133."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO) conjugate comprising an anti-transferrin receptor antibody or antigen binding fragment thereof conjugated to a PMO molecule; a method of treating muscular dystrophy in a subject in need thereof comprising administering to said subject a phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO) conjugate comprising an anti-transferrin receptor antibody or antigen binding fragment thereof conjugated to a PMO molecule; wherein the PMO molecule hybridizes to an acceptor splice site, a donor splice site, or an exonic splice enhancer element of a pre-mRNA transcript of the DMD gene and induces exon 44 skipping in said pre-mRNA transcript to generate a mRNA transcript encoding a truncated dystrophin protein; a method of inducing exon 44 skipping in a targeted pre-mRNA transcript of DMD gene, comprising: a) contacting a muscle cell with a phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO)-antibody conjugate, wherein the PMO-antibody conjugate comprises an anti-transferrin receptor antibody or antigen binding fragment thereof, and a PMO molecule targeting an acceptor splice site, a donor splice site, or an exonic splice enhancer element of the targeted pre-mRNA transcript of the DMD gene; wherein the PMO molecule induces exon 44 skipping in the targeted pre-mRNA transcript, and wherein the PMO-antibody conjugate is preferentially delivered into the muscle cell; b) hybridizing the PMO molecule to the targeted pre-mRNA transcript to induce exon 44 skipping in the targeted pre-mRNA transcript; and c) translating a mRNA transcript produced from the targeted pre-mRNA transcript processed in step b) in the muscle cell to generate a truncated dystrophin protein; a method of inducing exon 44 skipping in a DMD subject in need thereof comprising administering to said subject a phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO) conjugate comprising an anti-transferrin receptor antibody or antigen binding fragment thereof conjugated to a PMO molecule; wherein the PMO molecule hybridizes to the exon 44 acceptor splice site of a pre-mRNA transcript of the DMD gene and induces exon 44 skipping in said pre-mRNA transcript to generate a mRNA transcript encoding a truncated dystrophin protein; a method of restoring dystrophin in a DMD subject in need thereof comprising administering to said subject a phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO) conjugate comprising an anti-transferrin receptor antibody or antigen binding fragment thereof conjugated to a PMO molecule; wherein the PMO molecule hybridizes to the exon 44 acceptor splice site of a pre-mRNA transcript of the DMD gene and induces exon 44 skipping in said pre-mRNA transcript to generate a mRNA transcript encoding a truncated dystrophin protein; and a method of generating a truncated dystrophin protein in a DMD subject in need thereof comprising administering to said subject a phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO) conjugate comprising an anti-transferrin receptor antibody or antigen binding fragment thereof conjugated to a PMO molecule; wherein the PMO molecule hybridizes to the exon 44 acceptor splice site of a pre-mRNA transcript of the DMD gene and induces exon 44 skipping in said pre-mRNA transcript to generate a mRNA transcript encoding a truncated dystrophin protein. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

US 2020/028074 to Avidity Biosciences, Inc. (hereinafter, "Avidity") teaches a phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO) conjugate (anti-CD71 mAb-PMO conjugation; Paras. [0477]-[0478]) comprising an anti-transferrin receptor antibody or antigen binding fragment thereof (anti-CD71 antibody…anti-CD71 antibody is an anti-transferrin antibody; Paras. [0314], [0477]) conjugated to a PMO molecule (anti-CD71 mAb-PMO conjugation; Paras. [0477]-[0478]); a method of treating muscular dystrophy in a subject in need thereof (methods of treating a disease in a subject…the disease is muscular dystrophy; Para. [0004]) comprising administering to said subject a phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO) conjugate comprising an anti-transferrin receptor antibody or antigen binding fragment thereof conjugated to a PMO molecule (administering to the subject a polynucleic acid molecule conjugate is conjugated to a cell targeting binding moiety…the conjugate is an anti-CD71 mAb-PMO conjugate; Paras. [0004], [0477]); wherein the PMO molecule hybridizes to an acceptor splice site, a donor splice site, or an exonic splice enhancer element of a pre-mRNA transcript of the DMD gene (hybridizing the polynucleotide acid molecule conjugate to the pre-mRNA transcript…the polynucleic acid molecule targets exonic splice enhancers..the exon skipping is of the DMD gene; Paras. [0004], [0079], [0147]) and induces exon 44 skipping in said pre-mRNA transcript to generate a mRNA transcript encoding a truncated dystrophin protein (the exon skipped is exon 44 of the DMD gene… generating a fully processed mRNA transcript encoding the DMD gene; Para. [0004]); a method of inducing exon 44 skipping in a targeted pre-mRNA transcript of DMD gene (the polynucleic acid induces an alteration in the incorrectly spliced mRNA transcript to induce exon skipping…the exon skipped is exon 44 of the DMD gene…generating a fully processed mRNA transcript encoding the DMD gene; Para. [0004]), comprising: a) contacting a muscle cell with a phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO)-antibody conjugate (contacting a target cell with a polynucleic acid molecule conjugate…the conjugate is an anti-CD71 mAb-PMO conjugate…the cell is a muscle cell; Paras. [0031], [0309], [0477]), wherein the PMO-antibody conjugate comprises an anti-transferrin receptor

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/017574

antibody or antigen binding fragment thereof (anti-CD71 antibody...anti-CD71 antibody is an anti-transferrin antibody; Paras. [0314], [0477]), and a PMO molecule targeting an acceptor splice site, a donor splice site, or an exonic splice enhancer element of the targeted pre-mRNA transcript of the DMD gene (hybridizing the polynucleotide acid molecule conjugate to the pre-mRNA transcript...the polynucleic acid molecule targets exonic splice enhancers..the exon skipping is of the DMD gene...the polynucleic acid molecule is PMO; Paras. [0004], [0079], [0147], [0477]); wherein the PMO molecule induces exon 44 skipping in the targeted pre-mRNA transcript (induce exon skipping in the incorrectly spliced mRNA transcript...the exon skipped is exon 44 of the DMD gene; Para. [0004]), and wherein the PMO-antibody conjugate is preferentially delivered into the muscle cell (the binding moiety is an antibody that recognizes a cell surface protein on a muscle cell; Para. [0309]); b) hybridizing the PMO molecule to the targeted pre-mRNA transcript to induce exon 44 skipping in the targeted pre-mRNA transcript (hybridizing the polynucleotide acid molecule conjugate to the pre-mRNA transcript...the polynucleic acid molecule targets exonic splice enhancers..the exon skipping is exon 44 of the DMD gene...the polynucleic acid molecule is PMO; Paras. [0004], [0079], [0147], [0477]); and c) translating a mRNA transcript produced from the targeted pre-mRNA transcript processed in step b) in the muscle cell to generate a truncated dystrophin protein (translating the functional form of a protein from a fully processed mRNA transcript...within the target cell...the cell is a muscle cell; Paras. [0031], [0309]); a method of inducing exon 44 skipping in a DMD subject in need thereof (methods of treating a disease in a subject...the polynucleic acid induces an alteration in the incorrectly spliced mRNA transcript to induce exon skipping...the exon skipped is exon 44 of the DMD gene; Para. [0004]) comprising administering to said subject a phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO) conjugate comprising an anti-transferrin receptor antibody or antigen binding fragment thereof conjugated to a PMO molecule (administering to the subject a polynucleic acid molecule conjugate is conjugated to a cell targeting binding moiety...the conjugate is an anti-CD71 mAb-PMO conjugate; Paras. [0004], [0477]); wherein the PMO molecule hybridizes to the exon 44 acceptor splice site of a pre-mRNA transcript of the DMD gene and induces exon 44 skipping in said pre-mRNA transcript to generate a mRNA transcript encoding a truncated dystrophin protein (hybridizing the polynucleotide acid molecule conjugate to the pre-mRNA transcript...the polynucleic acid molecule targets exonic splice enhancers..the exon skipping is exon 44 of the DMD gene...the polynucleic acid molecule is PMO...as shown in table 14 acceptor splice sites; Paras. [0004], [0079], [0147], [0477]); a method of restoring dystrophin in a DMD subject in need thereof (methods of treating a disease in a subject...targeting DMD gene...to generate a functional dystrophin protein; Paras. [0004], [0031]) comprising administering to said subject a phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO) conjugate comprising an anti-transferrin receptor antibody or antigen binding fragment thereof conjugated to a PMO molecule (administering to the subject a polynucleic acid molecule conjugate is conjugated to a cell targeting binding moiety...the conjugate is an anti-CD71 mAb-PMO conjugate; Paras. [0004], [0477]); wherein the PMO molecule hybridizes to the exon 44 acceptor splice site of a pre-mRNA transcript of the DMD gene and induces exon 44 skipping in said pre-mRNA transcript to generate a mRNA transcript encoding a truncated dystrophin protein (hybridizing the polynucleotide acid molecule conjugate to the pre-mRNA transcript...the polynucleic acid molecule targets exonic splice enhancers..the exon skipping is exon 44 of the DMD gene...the polynucleic acid molecule is PMO...as shown in table 14 acceptor splice sites...generate a mRNA transcript that encodes a functional dystrophin protein; Paras. [0004], [0079], [0147], [0477]); and a method of generating a truncated dystrophin protein in a DMD subject in need thereof (methods of treating a disease in a subject...induce exon skipping...the exon skipped is in the DMD gene...to generate a functional dystrophin protein; Paras. [0004], [0031], [0079]) comprising administering to said subject a phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide (PMO) conjugate comprising an anti-transferrin receptor antibody or antigen binding fragment thereof conjugated to a PMO molecule (administering to the subject a polynucleic acid molecule conjugate is conjugated to a cell targeting binding moiety...the conjugate is an anti-CD71 mAb-PMO conjugate; Paras. [0004], [0477]); wherein the PMO molecule hybridizes to the exon 44 acceptor splice site of a pre-mRNA transcript of the DMD gene and induces exon 44 skipping in said pre-mRNA transcript to generate a mRNA transcript encoding a truncated dystrophin protein (hybridizing the polynucleotide acid molecule conjugate to the pre-mRNA transcript...the polynucleic acid molecule targets exonic splice enhancers..the exon skipping is exon 44 of the DMD gene...the polynucleic acid molecule is PMO...as shown in table 14 acceptor splice sites...generate a mRNA transcript that encodes a functional dystrophin protein; Paras. [0004], [0079], [0147], [0477]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A61K	*39/395(2006.01)*	A61K	39/395	L	
C12N	*15/12 (2006.01)*	A61K	39/395	C	
		C12N	15/12		

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

アメリカ合衆国 ９２１２１ カリフォルニア州 サンディエゴ サイエンス・センター・ドライブ １０５７８ スイート １２５

(72)発明者 ドッパラプディ，ヴェンカタ ラマナ
アメリカ合衆国 ９２１２１ カリフォルニア州 サンディエゴ サイエンス・センター・ドライブ １０５７８ スイート １２５

(72)発明者 コクラン，マイケル カラミアン
アメリカ合衆国 ９２１２１ カリフォルニア州 サンディエゴ サイエンス・センター・ドライブ １０５７８ スイート １２５

(72)発明者 マークス，アイザック
アメリカ合衆国 ９２１２１ カリフォルニア州 サンディエゴ サイエンス・センター・ドライブ １０５７８ スイート １２５

(72)発明者 アルビン，タイラー
アメリカ合衆国 ９２１２１ カリフォルニア州 サンディエゴ サイエンス・センター・ドライブ １０５７８ スイート １２５

Ｆターム（参考） 4C076 AA95 BB11 CC09 CC41 EE59
4C084 AA13 MA55 NA13 ZA941 ZA942
4C085 AA25 BB11 DD59 EE01
4H045 AA10 AA11 AA30 BA54 CA40 DA75 EA20