

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-517909

(P2021-517909A)

(43) 公表日 令和3年7月29日 (2021.7.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 6 5
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027 Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 1 1 O Z	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/113 Z	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-568662 (P2020-568662)	(71) 出願人	520130649
(86) (22) 出願日	平成31年2月15日 (2019.2.15)		ディセルナ ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	令和2年10月21日 (2020.10.21)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/018184		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(87) 国際公開番号	W02019/168686		2 4 2 1 レキシントン ヘイデン アベ
(87) 国際公開日	令和1年9月6日 (2019.9.6)		ニュー 3 3
(31) 優先権主張番号	62/637, 973	(74) 代理人	100094569
(32) 優先日	平成30年3月2日 (2018.3.2)		弁理士 田中 伸一郎
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100103610
			弁理士 ▲吉▼田 和彦
		(74) 代理人	100109070
			弁理士 須田 洋之
		(74) 代理人	100119013
			弁理士 山崎 一夫
		最終頁に続く	

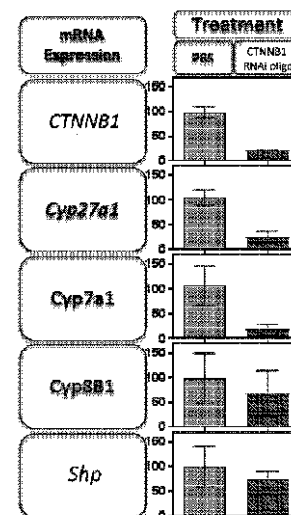
(54) 【発明の名称】 胆管減少症関連状態を治療するための方法及び組成物

(57) 【要約】

本開示は、胆管減少症関連状態を治療するための、特に肝実質細胞での CTNNB1 発現の低減に有用なオリゴヌクレオチド、組成物、及び方法に関する。CTNNB1 発現を低減させるための本開示のオリゴヌクレオチドは、二本鎖であってもよく又は一本鎖であってもよく、ヌクレアーゼに対するより強力な耐性及びより低い免疫原性等の特徴を向上させるために修飾されていてもよい。また、CTNNB1 発現を低減させるための本開示のオリゴヌクレオチドは、肝臓の肝実質細胞等の特定の細胞又は臓器を標的とするための標的指向性リガンドを含んでいてもよい。

【選択図】 図 7 C

FIG. 7C



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

胆管形成の促進を必要とする対象における胆管形成を促進するための方法であって、C T N N B 1 発現を低減するオリゴヌクレオチドを前記対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項 2】

前記投与が、前記対象における機能的胆管の数及び／又はサイズの増加をもたらす、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記投与が、前記対象における胆管の表面積の増加をもたらす、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記対象が、前記オリゴヌクレオチドの投与前に、胆管減少症（B D P）関連状態を有すると特定されている、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記 B D P 関連状態が、アラジール症候群である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 B D P 関連状態が、胆道閉鎖症である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 B D P 関連状態が、I 型胆道閉鎖症、I I 型胆道閉鎖症、又は I I I 型胆道閉鎖症である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記対象の胆管が、肝内胆管である、請求項 2 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記対象の胆管が、肝外胆管である、請求項 2 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記対象が、青年期ヒト対象である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記オリゴヌクレオチドが、15 ～ 30ヌクレオチド長のアンチセンス鎖を含み、前記アンチセンス鎖が、C T N N B 1 mRNA の標的配列との相補性領域を有し、前記相補性領域が、少なくとも15連続ヌクレオチド長である、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記相補性領域が、前記 C T N N B 1 mRNA の標的配列と完全に相補的である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記アンチセンス鎖が、19 ～ 27ヌクレオチド長である、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記アンチセンス鎖が、21 ～ 27ヌクレオチド長である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記オリゴヌクレオチドが、15 ～ 40ヌクレオチド長のセンス鎖を更に含み、前記センス鎖が、前記アンチセンス鎖と二重鎖領域を形成する、請求項 11 ～ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記センス鎖が、19 ～ 40ヌクレオチド長である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記二重鎖領域が、少なくとも19ヌクレオチド長である、請求項 15 又は 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記二重鎖領域が、少なくとも21ヌクレオチド長である、請求項 15 ～ 17 のいずれ

10

20

30

40

50

か一項に記載の方法。

【請求項 19】

C T N N B 1 m R N A との前記相補性領域が、少なくとも 19 連続ヌクレオチド長である、請求項 11～17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

C T N N B 1 m R N A との前記相補性領域が、少なくとも 21 連続ヌクレオチド長である、請求項 11～19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記センス鎖が、その 3' - 末端に、S 1 - L - S 2 として示されるステムループを含み、式中、S 1 が、S 2 と相補的であり、L が、S 1 と S 2 との間に 3～5 ヌクレオチド長のループを形成する、請求項 15～20 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 22】

L が、テトラループである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

L が、4 ヌクレオチド長である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

L が、G A A A として示される配列を含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記アンチセンス鎖が、27 ヌクレオチド長であり、前記センス鎖が、25 ヌクレオチド長である、請求項 15～20 に記載の方法。

20

【請求項 26】

前記アンチセンス鎖及び前記センス鎖が、25 ヌクレオチド長の二重鎖領域を形成する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記アンチセンス鎖に 2 ヌクレオチド長の 3' - 突出配列を更に含む、請求項 22～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記オリゴヌクレオチドが、各々が 21～23 ヌクレオチド長の範囲であるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含む、請求項 15～20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記オリゴヌクレオチドが、19～21 ヌクレオチド長の範囲の二重鎖構造を含む、請求項 28 に記載の方法。

30

【請求項 30】

前記オリゴヌクレオチドが、1 又は複数ヌクレオチド長の 3' - 突出配列を含み、前記 3' - 突出配列が、前記アンチセンス鎖、前記センス鎖、又は前記アンチセンス鎖及び前記センス鎖に存在する、請求項 28 又は 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記オリゴヌクレオチドが、2 ヌクレオチド長の 3' - 突出配列を含み、前記 3' - 突出配列が、前記アンチセンス鎖に存在し、前記センス鎖が、21 ヌクレオチド長であり、前記アンチセンス鎖が、23 ヌクレオチド長であり、前記センス鎖及び前記アンチセンス鎖が、21 ヌクレオチド長の二重鎖を形成する、請求項 28 又は 29 に記載の方法。

40

【請求項 32】

前記オリゴヌクレオチドが、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1～31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記修飾ヌクレオチドが、2' - 修飾を含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記 2' - 修飾が、2' - アミノエチル、2' - フルオロ、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル、及び 2' - デオキシ - 2' - フルオロ - β - d - アラビノ核酸から選択される修飾である、請求項 33 に記載の方法。

50

【請求項 35】

前記オリゴヌクレオチドの全てのヌクレオチドが、修飾されている、請求項 32～34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記オリゴヌクレオチドが、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチド間連結を含む、請求項 1～35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチド間連結が、ホスホロチオエート連結である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記アンチセンス鎖の 5' -ヌクレオチドの糖の 4' -炭素が、ホスフェート類似体を含む、請求項 1～37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記ホスフェート類似体が、オキシメチルホスホネート、ビニルホスホネート、又はマロニルホスホネートである、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つのヌクレオチドが、1 つ又は複数の標的指向性リガンドにコンジュゲートされている、請求項 1～39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

各標的指向性リガンドが、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 部分を含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記 GalNAc 部分が、一価 GalNAc 部分、二価 GalNAc 部分、三価 GalNAc 部分、又は四価 GalNAc 部分である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 43】

前記ステムループの L の最大で 4 個のヌクレオチドが、各々一価 GalNAc 部分にコンジュゲートされている、請求項 22～24 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2018年3月2日に出願された「METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING BILE DUCT PAUCITY-ASSOCIATED CONDITIONS」と題する米国特許仮出願第 62/637973 号の米国特許法第 119 条 (e) に基づく利益を主張するものである。この文献の内容は全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本出願は、オリゴヌクレオチド、及びそれらの使用、特に胆管減少症に関する状態の治療に関する使用に関する。

配列表の参照

本出願は、電子フォーマットの配列表と共に提出されている。配列表は、ファイル名が D0800_70013WO00-SEQ.txt であり、2019年2月15日に作成され、サイズが 5.45 KB のファイルとして提供されている。電子フォーマットの配列表の情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

胆汁酸産生、分泌、及び／又は取り込みに影響を及ぼす障害は、重要な生理学的意味を有する場合がある。例えば、胆汁うっ滞は、特に新生児では、胆汁流及び排泄の減少、並びに長期抱合型高ビリルビン血症をもたらす一般的な肝臓疾患である。同様に、肝内胆管の減少は、慢性胆汁うっ滞、心奇形、筋骨格異常、眼球異常、及び顔面形成異常に関与す

10

20

30

40

50

る、アラジール症候群（A G S）と呼ばれる家族性症候群を含む種々の障害及び異常に関連する。多くの個体、特にA G Sに罹患した個体では、胆管の減少は、急速進行性肝臓疾患に関連する。胆道閉鎖症（B A）は、乳児の肝内及び肝外胆管の別の進行性繊維閉塞性障害である。胆管減少症を改善するための方法を含む、そのような患者の治療に好適な方法は欠如している。

【発明の概要】

【0004】

本開示の態様は、対象の胆管減少症及び関連状態を治療するための方法に関する。一部の実施形態では、本開示は、対象のC T N N B 1発現を選択的に阻害することが、対象の胆管能力を増加させるために（例えば、新しい胆管形成を刺激するために）有用であるという発見に関する。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法では、対象のβ-カテニン活性を低減し、それにより対象の胆管能力（例えば、胆管の再生を促進する）を増加させるためのR N A iオリゴヌクレオチドが使用される。本明細書で提供される方法によりもたらされる胆管能力増加の帰結は、胆汁流の改善（例えば、胆汁酸取り込みの増加）、及び循環胆汁酸の対応する減少である（例えば、C T N N B 1 R N A iオリゴヌクレオチドの投与が、胆管損傷動物モデルにおいて胆汁酸レベルを低減させることが示されている実施例4を参照）。一部の実施形態では、β-カテニン活性の低減は、肝実質細胞での胆汁酸合成を減少させ、それにより対象における胆管減少症による胆汁酸誘導性急性毒性を予防することができる。従って、一部の実施形態では、本明細書で提供される方法は、新しい胆管を再生すること及び胆汁酸合成を低減することにより、アラジール症候群及び胆道閉鎖症等の胆管減少症関連状態を治療するのに有用である。

本開示の一態様は、C T N N B 1の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドであって、15～30ヌクレオチド長のアンチセンス鎖を含むオリゴヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、相補性領域は、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、又は少なくとも22連続ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、相補性領域は、C T N N B 1の標的配列と完全に相補的である。一部の実施形態では、C T N N B 1の相補性領域は、少なくとも19連続ヌクレオチド長である。

一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、19～27ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、21～27ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、15～40ヌクレオチド長のセンス鎖を更に含み、センス鎖は、アンチセンス鎖と二重鎖領域を形成する。一部の実施形態では、センス鎖は、19～40ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、アンチセンス鎖は、27ヌクレオチド長であり、センス鎖は、25ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、二重鎖領域は、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、又は少なくとも21ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、アンチセンス鎖及びセンス鎖は、25ヌクレオチド長の二重鎖領域を形成する。

【0005】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、アンチセンス鎖に2ヌクレオチド長の3'-突出配列を更に含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、各々が21～23ヌクレオチド長の範囲であるアンチセンス鎖及びセンス鎖を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、19～21ヌクレオチド長の範囲である二重鎖構造を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1又は複数ヌクレオチド長の3'-突出配列を含み、3'-突出配列は、アンチセンス鎖、センス鎖、又はアンチセンス鎖及びセンス鎖に存在する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、2ヌクレオチド長の3'-突出配列を含み、3'-突出配列はアンチセンス鎖に存在し、センス鎖は21ヌクレオチド長であり、アンチセンス鎖は23ヌクレオチド長であり、センス鎖及びアンチセンス鎖は、21ヌクレオチド長の二重鎖を形成する。

一部の実施形態では、C T N N B 1との相補性領域は、少なくとも19連続ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、センス鎖は、その3'-末端に、S1-L-S2とし

て示されるステムループを含み、式中 S 1 は S 2 と相補的であり、L は、S 1 と S 2 との間に 3 ～ 5 ヌクレオチド長のループを形成する。

【0006】

本開示の別の態様は、CTNNB1 の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドであって、オリゴヌクレオチドは、アンチセンス鎖及びセンス鎖を含み、アンチセンス鎖は、21 ～ 27 ヌクレオチド長であり、CTNNB1 との相補性領域を有し、センス鎖は、その 3' - 末端に、S 1 - L - S 2 として示されるステムループを含み、式中 S 1 は S 2 と相補的であり、L は、S 1 と S 2 との間に 3 ～ 5 ヌクレオチド長のループを形成し、アンチセンス鎖及びセンス鎖は、少なくとも 19 ヌクレオチド長の二重鎖構造を形成するが、共有結合で連結されていない、オリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、相補性領域は、CTNNB1 mRNA の少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、又は少なくとも 21 個の連続ヌクレオチドと完全に相補的である。一部の実施形態では、L は、テトラループである。一部の実施形態では、L は、4 ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、L は、G A A A として示される配列を含む。

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2' - 修飾を含む。一部の実施形態では、2' - 修飾は、2' - アミノエチル、2' - フルオロ、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル、及び 2' - デオキシ - 2' - フルオロ - β - d - アラビノ核酸から選択される修飾である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドのヌクレオチドは全て修飾されている。

【0007】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチド間連結は、ホスホロチオエート連結である。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の 5' - ヌクレオチドの糖の 4' - 炭素は、ホスフェート類似体を含む。一部の実施形態では、ホスフェート類似体は、オキシメチルホスホネート、ビニルホスホネート、又はマロニルホスホネートである。

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つのヌクレオチドは、1 つ又は複数の標的指向性リガンド (targeting ligand) にコンジュゲートされている。一部の実施形態では、各標的指向性リガンドは、炭水化物、アミノ糖、コレステロール、ポリペプチド、又は脂質を含む。一部の実施形態では、各標的指向性リガンドは、N - アセチルガラクトサミン (GalNAc) 部分を含む。一部の実施形態では、GalNAc 部分は、一価 GalNAc 部分、二価 GalNAc 部分、三価 GalNAc 部分、又は四価 GalNAc 部分である。一部の実施形態では、ステムループの L の最大で 4 個のヌクレオチドが、各々一価 GalNAc 部分にコンジュゲートされている。一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、アプタマーを含む。

【0008】

本開示の別の態様は、本開示のオリゴヌクレオチド及び賦形剤を含む組成物を提供する。本開示の別の態様は、本開示の組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。一部の実施形態では、本方法は、対象の胆管減少症の減少をもたらす。一部の実施形態では、本方法は、対象の胆管形成の増加、及び従って胆管能力の増加をもたらす。一部の実施形態では、治療しようとする対象は、アラジール症候群を罹患している。一部の実施形態では、治療しようとする対象は、胆道閉鎖症を罹患している。

本開示の別の態様は、CTNNB1 の発現を低減するためのオリゴヌクレオチドであって、15 ～ 40 ヌクレオチド長のセンス鎖及び 15 ～ 30 ヌクレオチド長のアンチセンス鎖を含み、センス鎖はアンチセンス鎖と二重鎖領域を形成し、アンチセンス鎖は相補的配列を含むオリゴヌクレオチドを提供する。

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、付表 A に示されている表の行から選択される 1 対のセンス鎖及びアンチセンス鎖を含む。

【0009】

本明細書に組み込まれており、本明細書の一部分を構成する添付の図面は、ある実施形態を図示するものであり、記載されている説明と共に、本明細書で開示されている組成物及び方法のある態様の非限定的な例を提供する役目を果たす。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】0.1%の3, 5-ジエトキシカルボニル-1, 4-ジヒドロコリジン (DDC) を給餌し、PBSで処置したマウス (最初の3つのパネル)、及び0.1%DDCを給餌し、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで処置したマウス (最後の3つのパネル) に由来する肝臓切片におけるCK19の免疫組織化学染色を示す一連の写真である。CK19は、胆管上皮マーカーである。配列番号1に示されている配列を有するセンス鎖、及び配列番号2に示されている配列を有するアンチセンス鎖を含むCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドが提供される。

10

【図2】0.1%DDCを給餌し、PBS又はCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで10日間、24日間、又は38日間にわたって週1回処置したマウスに由来する肝臓切片におけるCK19の免疫組織化学染色を示す一連の写真を含む。写真の上段の行は、PBS処置による結果を示し、写真の下段の行は、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドによる結果を示す。処置日は、各々の日における2つの免疫組織化学染色と共に下部に示されている。各処置の通常餌マウス (0.1%DDCを給餌しないマウス) の結果は、最も右側に示されている。

20

【図3】PBSで処置したMdr2^{+/+}-マウス (左側の最初のパネル)、PBSで処置したMdr2^{-/-}-マウス (左から2番目及び3番目のパネル)、及びCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで処置したMdr2^{-/-}-マウス (右側に示されている最後の3つのパネル) に由来する肝臓切片におけるCK19の免疫組織化学染色を示す一連の写真である。各マウスの性別は、関連パネルの下に示されている。

【図4】PBS (左側から開始して最初の3つのパネル)、5mg/kgのCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチド (左から4番目のパネル)、及び100mg/kgのCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチド、Q1W×6 (右側に示されている最後の3つのパネル) で処置した各々個々の野生型動物に由来する肝臓切片におけるCK19の免疫組織化学染色を示す一連の写真である。矢印は、実質区画の非門脈周囲区域のCK19陽性細胞を有する区域を示す。スケールバーは、100µmを示す。

30

【図5】PBS (上部2つのパネル) 又はCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチド (下部2つのパネル) で処置した2匹のDDC給餌動物 (動物1及び動物2) の、レジニキャストを使用した胆管アーキテクチャーを示す一連の写真である。動物1の画像は、2×拡大であり、スケールバーは500µmを示し、動物2の画像は、4×拡大であり、スケールバーは100µmを示す。

【図6】CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで処置した単一のDDC給餌動物の、インク注入による胆管アーキテクチャーを示す写真である。画像は、10×拡大であり、スケールバーは50µmを示す。

【図7A】PBSで処置した対照餌マウス、及び0.1%DDCを給餌しPBSで処置したマウス、及び0.1%DDCを給餌し、4回の週1回用量のCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで処置したマウスから重力流により収集した胆汁試料に由来する総胆汁酸濃度を比較するグラフである。Swiss Webster雌マウスを使用した。

40

【図7B】PBSで処置した対照餌マウス、0.1%DDCを給餌しPBSで処置したマウス、及び0.1%DDCを給餌しCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドによりQW×4で処置したマウスの胆汁流速を比較するグラフである。Swiss Webster雌マウスを使用した。

【図7C】PBSで処置したDDC給餌マウス (明灰色バー)、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドによりQW×4で処置したマウス (暗灰色バー) でのCTNNB1、Cyp27a1、Cyp7a1、Cyp8b1、及びShpの発現を比較する一連のグラ

50

フである。Swiss Webster 雌マウスを使用した。

【発明を実施するための形態】

【0011】

一部の態様によると、本開示は、胆管減少症を治療するための、細胞、特に肝臓細胞（例えば、肝実質細胞）におけるCTNNB1発現の低減に効果的な、CTNNB1 mRNAを標的とするオリゴヌクレオチドを使用する方法を提供する。従って、関連する態様では、本開示は、肝臓でのCTNNB1遺伝子発現を選択的に低減することを含む、胆管減少症を治療するための方法を提供した。ある実施形態では、本明細書で提供されるCTNNB1標的指向性オリゴヌクレオチドは、標的組織の選択された細胞（例えば、肝臓肝実質細胞）に送達して、対象の胆管減少症を治療するように設計されている。

10

【0012】

用語の定義の説明を含む本開示の更なる態様が下記に提供されている。

I. 定義

投与：本明細書で使用される場合、用語「投与する」又は「投与」は、物質（例えば、オリゴヌクレオチド）を、薬理的に有用な様式で（例えば、対象の状態を治療するために）対象に提供することを意味する。

およそ：本明細書で使用される場合、1つ又は複数の目的の値に適用される用語「およそ」又は「約」は、表記されている参照値と同様である値を指す。ある実施形態では、用語「およそ」又は「約」は、別様の記述がない限り又は別様に状況から明白でない限り（そのような数値が、可能な値の100%を超えてしまう場合を除く）、表記されている参照値のいずれかの方向に（より大きな又は未満）25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、又はそれよりも小さな値内に入る値の範囲を指す。

20

【0013】

アラジール症候群：本明細書で使用される場合、「アラジール症候群」は、肝臓の胆管の狭窄、奇形、及び／又は減少により特徴付けられる障害を指す。アラジール症候群では、肝内胆管の分化障害が、胆管の狭窄、奇形、及び減少に結びつく場合がある。そのような胆管異常は、胆汁流を低減させ（肝内胆汁うっ滞）、肝臓での胆汁蓄積をもたらす。例えば、Turnpennyら、Alagille syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. Eur J Hum Genet. 2012年3月; 20巻(3号): 251~7頁を参照されたい。この文献は、参照により本目的のためにその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0014】

アシアロ糖タンパク質受容体(ASGPR)：本明細書で使用される場合、用語「アシアロ糖タンパク質受容体」又は「ASGPR」は、大きな48kDaサブユニット(ASGPR-1)及び小さな40kDaサブユニット(ASGPR-2)により形成される二分C型レクチン(bipartite C-type lectin)を指す。ASGPRは、主に肝実質細胞の洞様表面に発現され、末端ガラクトース又はN-アセチルガラクトサミン残基を含む循環性糖タンパク質(アシアロ糖タンパク質)の結合、内部移行、及びその後のクリアランスに主要な役割を有する。

40

CTNNB1：本明細書で使用される場合、CTNNB1は、 β -カテニンタンパク質をコードする遺伝子である。ヒトでは、CTNNB1は、少なくとも4つの転写物、すなわちNM_001904.3(バリエント1)、NM_001098209.1(バリエント2)、NM_001098210.1(バリエント3)、及びNM_001330729.1(バリエント4)をコードする。バリエント1、2、及び3は、同じアイソフォーム(NP_001091680.1、アイソフォーム1)をコードする。バリエント4は、アイソフォーム1と比較してより短いN末端基を有するアイソフォーム2(NP_001317658.1)をコードする。マウスでは、CTNNB1は、少なくとも2つの転写物、すなわちNM_007614.3(バリエント1)及びNM_001165902.1(バリエント2)をコードする。両転写物は、同じタンパク質(例えば、NP_0

50

0 1 1 5 9 3 7 4. 1 及び N P _ 0 3 1 6 4 0. 1 で提供されている配列) をコードする。

胆管減少症：本明細書で使用される場合、「胆管減少症」は、対象における、胆管の非存在に起因する胆管機能縮小、胆管の数及び／若しくはサイズの低減、又は胆管の閉塞を指す。一部の実施形態では、胆管減少症は、肝内胆管の非存在又は数の低減に関連する。一部の実施形態では、胆管減少症は、肝外胆管の非存在又は数の低減に関連する。一部の実施形態では、胆管減少症は、肝内又は肝外胆管の閉塞に関連する。非限定的な例として、小葉間胆管の減少は、門脈路の総数と比較した、胆管を欠如する門脈路の比を決定することにより算出することができる（例えば、Hadchouel Paucity of interlobular bile ducts. Semin Diagn Pat hol. 1992年2月；9巻（1号）：24～30頁を参照。この文献は、その全体が本目的のために参照により本明細書に組み込まれる）。

【0015】

胆管減少症関連状態：本明細書で使用される場合、用語「胆管減少症関連状態」又は「BDP関連状態」は、その状態を有していない正常対照対象と比較して、対象に機能的胆管の数又はサイズの低減をもたらすか又は関連する対象の状態を指す。一部の実施形態では、BDP関連状態を有する対象は、機能的胆管の数及び／又はサイズの低減を示す。一部の実施形態では、対象の欠損胆管系は、肝内胆管に生じる。一部の実施形態では、機能障害を有する肝内胆管は、門脈周囲細胆管（ヘリング管）及び小葉内胆管（細胆管）からなる群から選択される。一部の実施形態では、対象において機能障害を有する胆管は、胆外胆管である。一部の実施形態では、機能障害を有する肝外胆管は、左胆管、右胆管、及び総胆管からなる群から選択される。一部の実施形態では、BDP関連状態は、アラジール症候群である。一部の実施形態では、BDP関連状態は、胆道閉鎖症である。

胆道閉鎖症：本明細書で使用される場合、「胆道閉鎖症（BA）」は、胆管の破壊又は喪失が胆汁流を妨害する、特に幼児における疾患を指す。例えば、Kellyら、Current management of Biliary Atresia. Arch Dis Child. 2007年12月；92巻（12号）：1132～5頁を参照されたい。この文献は、参照により本目的のためにその全体が本明細書に組み込まれる。

【0016】

相補的：本明細書で使用される場合、用語「相補的」は、ヌクレオチドが互いに塩基対を形成することを可能にするヌクレオチド（例えば、一本鎖核酸鎖の向かい合う核酸又は向かい合う領域の2つのヌクレオチド）間の構造的関係性を指す。例えば、向かい合う核酸のピリミジンヌクレオチドと相補的な一方の核酸のプリンヌクレオチドは、互いに水素結合を形成することにより共に塩基対を形成することができる。一部の実施形態では、相補的ヌクレオチドは、ワトソン－クリック様式の、又は安定的二重鎖の形成を可能にする任意の他の様式の塩基対を形成することができる。一部の実施形態では、2つの核酸は、本明細書に記載のような、相補性領域を形成するように互いに相補的なヌクレオチド配列を有していてもよい。

デオキシリボヌクレオチド：本明細書で使用される場合、用語「デオキシリボヌクレオチド」は、リボヌクレオチドと比較して、そのペントース糖の2'位に水素を有するヌクレオチドを指す。修飾デオキシリボヌクレオチドは、糖、ホスフェート基、若しくは塩基に修飾を含むか又は糖、ホスフェート基、若しくは塩基の置換を含む、2'位以外の原子の1つ又は複数の修飾又は置換を有するデオキシリボヌクレオチドである。

【0017】

二本鎖オリゴヌクレオチド：本明細書で使用される場合、用語「二本鎖オリゴヌクレオチド」は、実質的に二重鎖形態であるオリゴヌクレオチドを指す。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの二重鎖領域の相補的塩基対合は、共有結合的に別々の核酸鎖のヌクレオチドの逆平行配列間に形成される。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの二重鎖領域の相補的塩基対合は、共有結合的に連結されている核酸鎖のヌクレオチドの逆平行配列間に形成される。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドの二

重鎖領域の相補的塩基対合は、フォールディングして（例えば、ヘアピンにより）共に塩基対を形成するヌクレオチドの相補的逆平行配列を提供する一本鎖核酸鎖で形成される。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、互いに完全に二重鎖である2つの共有結合的に別々の核酸鎖を含む。しかしながら、一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、部分的に二重鎖であり、例えば一方の又は両方の末端に突出を有する2つの共有結合的に別々の核酸鎖を含む。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、部分的に相補的であり、従って、内部ミスマッチ又は末端ミスマッチを含んでいてもよい1つ又は複数のミスマッチを有していてもよいヌクレオチドの逆平行配列を含む。

【0018】

二重鎖：本明細書で使用される場合、核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）に関する用語「二重鎖」は、ヌクレオチドの2つの逆平行配列の相補的塩基対合により形成される構造を指す。

賦形剤：本明細書で使用される場合、用語「賦形剤」は、例えば、所望の稠度又は安定化効果を提供又は寄与するように組成物に含まれていてもよい非治療剤を指す。

肝実質細胞：本明細書で使用される場合、用語「肝実質細胞」又は「肝実質細胞（複数）」は、肝臓の実質組織の細胞を指す。こうした細胞は、肝臓質量のおよそ70～85%を占め、血清アルブミン、フィブリノーゲン、及び凝固因子のプロトロンビン群（第3因子及び第4因子を除く）を製造する。肝実質細胞系統細胞のマーカーとしては、これらに限定されないが、トランスサイレチン（T t r）、グルタミンシンテターゼ（G l u l）、肝実質細胞核内因子1 a（H n f 1 a）、及び肝実質細胞核内因子4 a（H n f 4 a）を挙げることができる。成熟肝実質細胞のマーカーとしては、これらに限定されないが、シトクロムP 4 5 0（C y p 3 a 1 1）、フマリルアセトアセテートヒドロラーゼ（F a h）、グルコース6-ホスフェート（G 6 p）、アルブミン（A l b）、及びO C 2-2 F 8を挙げることができる。例えば、H u c hら（2013年）N a t u r e、494巻（7436号）：247～250頁を参照されたい。この文献の肝実質細胞マーカーに関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0019】

ループ：本明細書で使用される場合、用語「ループ」は、互いに十分に相補的な核酸の2つの逆平行領域によりフランキングされる核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）の非対合領域を指し、非対合領域をフランキングする2つの逆平行領域は、適切なハイブリダイゼーション条件下で（例えば、リン酸緩衝液中で、細胞中で）ハイブリダイズして二重鎖（「ステム」と呼ばれる）を形成する。

修飾ヌクレオチド間連結：本明細書で使用される場合、用語「修飾ヌクレオチド間連結」は、リン酸ジエステル結合を含む参照ヌクレオチド間連結と比較して、1つ又は複数の化学的修飾を有するヌクレオチド間連結を指す。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは非天然連結である。典型的には、修飾ヌクレオチド間連結は、修飾ヌクレオチド間連結が存在する核酸に1つ又は複数の望ましい特性を付与する。例えば、修飾ヌクレオチドは、熱安定性、分解に対する耐性、ヌクレアーゼ耐性、溶解性、生物学的利用能、生物活性、低免疫原性等を向上させることができる。

修飾ヌクレオチド：本明細書で使用される場合、用語「修飾ヌクレオチド」は、アデニンリボヌクレオチド、グアニンリボヌクレオチド、シトシンリボヌクレオチド、ウラシルリボヌクレオチド、アデニンデオキシリボヌクレオチド、グアニンデオキシリボヌクレオチド、シトシンデオキシリボヌクレオチド、及びチミジンデオキシリボヌクレオチドから選択される対応する参照ヌクレオチドと比較して、1つ又は複数の化学的修飾を有するヌクレオチドを指す。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは非天然ヌクレオチドである。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、その糖、核酸塩基、及び／又はホスフェート基に1つ又は複数の化学的修飾を有する。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、対応する参照ヌクレオチドにコンジュゲートされた1つ又は複数の化学部分を有する。典型的には、修飾ヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドが存在する核酸に1つ又は複数の望ましい特性を付与する。例えば、修飾ヌクレオチドは、熱安定性、分解に対する耐性、ヌク

レアーゼ耐性、溶解性、生物学的利用能、生物活性、低免疫原性等を向上させることができる。ある実施形態では、修飾ヌクレオチドは、リボース環の2'位に2'-O-メチル置換又は2'-F置換を含む。

【0020】

ニック付きテトラループ構造：「ニック付きテトラループ構造」は、別々のセンス鎖（パッセンジャー鎖）及びアンチセンス鎖（ガイド鎖）が存在することにより特徴付けられるRNA iオリゴヌクレオチドの構造であって、センス鎖は、2つの鎖が二重鎖を形成するようにアンチセンス鎖との相補性領域を有し、鎖の少なくとも一方、一般にはセンス鎖は、二重鎖から伸長し、伸長は、テトラループ及びテトラループに隣接するステム領域を形成する2つの自己相補的配列を含み、テトラループは、少なくとも一方の鎖の自己相補的配列により形成される隣接ステム領域を安定させるように構成されている構造である。

オリゴヌクレオチド：本明細書で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、例えば、100ヌクレオチド長未満の短い核酸を指す。オリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、及び／又は例えば修飾リボヌクレオチドを含む修飾ヌクレオチドを含むことができる。オリゴヌクレオチドは、一本鎖であってもよく又は二本鎖であってもよい。オリゴヌクレオチドは、二重鎖領域を有していてもよく又は有していなくともよい。1セットの非限定的な例として、オリゴヌクレオチドは、これらに限定されないが、低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）、短鎖ヘアピンRNA（shRNA）、ダイサー基質干渉RNA（dicer substrate interfering RNA）（dsiRNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、短鎖siRNA、又は一本鎖siRNAであってもよい。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、RNA iオリゴヌクレオチドである。

【0021】

突出：本明細書で使用される場合、用語「突出」は、1つの鎖又は領域がそれと二重鎖を形成する相補的鎖の末端を越えて伸長する1つの鎖又は領域から生じる末端非塩基対合ヌクレオチドを指す。一部の実施形態では、突出は、二本鎖オリゴヌクレオチドの5'末端又は3'末端の二重鎖領域から伸長する1つ又は複数の非対合ヌクレオチドを含む。ある実施形態では、突出は、二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖又はセンス鎖にある3'突出又は5'突出である。

ホスフェート類似体：本明細書で使用される場合、用語「ホスフェート類似体」は、ホスフェート基の静電気特性及び／又は立体特性を模倣する化学部分を指す。一部の実施形態では、ホスフェート類似体は、酵素的に除去され易いことが多い5'-ホスフェートの代わりに、オリゴヌクレオチドの5'末端ヌクレオチドに配置されている。一部の実施形態では、5'ホスフェート類似体は、ホスファターゼ耐性連結を含む。ホスフェート類似体の例としては、5'メチレンホスホネート（5'-MP）及び5'-(E)-ビニルホスホネート（5'-VP）等の5'ホスホネートが挙げられる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、5'-末端ヌクレオチドの糖の4'-炭素位置にホスフェート類似体を有する（「4'-ホスフェート類似体」と呼ばれる）。4'-ホスフェート類似体の例は、オキシメチル基の酸素原子が糖部分に（例えば、その4'-炭素に）又はその類似体に結合されているオキシメチルホスホネートである。例えば、2017年9月1日出願された国際特許出願第PCT/US2017/049909号パンフレット、2016年9月2日出願された米国特許仮出願第62/383,207号明細書、及び2016年9月12日出願された第62/393,401号明細書を参照されたい。これらの文献の各々のホスフェート類似体に関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる。オリゴヌクレオチドの5'末端のための他の修飾が開発されている（例えば、国際公開第2011/133871号パンフレット；米国特許第8,927,513号明細書；及びPrakashら（2015年）、Nucleic Acids Res.、43巻（6号）：2993～3011頁を参照、これらの文献の各々のホスフェート類似体に関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。

【0022】

発現の低減：本明細書で使用される場合、遺伝子の「発現の低減」という用語は、遺伝子によりコードされるRNA転写物若しくはタンパク質の量の減少、及び／又は適切な参照細胞若しくは参照対象と比較した細胞若しくは対象の遺伝子の活性の量の減少を指す。例えば、二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、CTNNB1 mRNA配列と相補的なアンチセンス鎖を有するもの）で細胞を処置する行為は、二本鎖オリゴヌクレオチドで処置されていない細胞と比較して、RNA転写物、タンパク質、及び／又は酵素活性（CTNNB1遺伝子によりコードされる）の量の減少をもたらすことができる。同様に、「発現を低減する」は、本明細書で使用される場合、遺伝子（例えば、CTNNB1）の発現の低減をもたらす行為を指す。

【0023】

相補性領域：本明細書で使用される場合、用語「相補性領域」は、適切なハイブリダイゼーション条件下で、例えば、リン酸緩衝液中、細胞中等で、ヌクレオチドの2つの配列間のハイブリダイゼーションを可能にするために、ヌクレオチドの逆平行配列（例えば、mRNA内の標的ヌクレオチド配列）と十分に相補的である核酸（例えば、二本鎖オリゴヌクレオチド）のヌクレオチドの配列を指す。相補性領域は、ヌクレオチド配列（例えば、mRNA又はその部分内に存在する標的ヌクレオチド配列）と完全に相補的であってもよい。例えば、mRNAに存在するヌクレオチド配列と完全に相補的である相補性領域は、mRNAの対応する配列と一切のミスマッチ又はギャップ無しで相補的であるヌクレオチドの連続配列を有する。或いは、相補性領域は、ヌクレオチド配列（例えば、mRNA又はその部分に存在するヌクレオチド配列）と部分的に相補的であってもよい。例えば、mRNAに存在するヌクレオチド配列と部分的に相補的である相補性領域は、相補性領域が適切なハイブリダイゼーション条件下でmRNAと依然としてハイブリダイズ可能である限り、mRNAの対応する配列と相補的であるが、mRNAの対応する配列と比較して、1つ又は複数のミスマッチ又はギャップ（例えば、1つ、2つ、3つ、又はそれよりも多くのミスマッチ又はギャップ）を含むヌクレオチドの連続配列を有する。

【0024】

リボヌクレオチド：本明細書で使用される場合、用語「リボヌクレオチド」は、その2'位にヒドロキシル基を含むリボースをそのペントース糖として有するヌクレオチドを指す。修飾リボヌクレオチドは、リボース、ホスフェート基、若しくは塩基に修飾を含むか又はリボース、ホスフェート基、若しくは塩基の置換を含む、2'位以外の原子の1つ又は複数の修飾又は置換を有するリボヌクレオチドである。

RNAiオリゴヌクレオチド：本明細書で使用される場合、用語「RNAiオリゴヌクレオチド」は、(a)センス鎖（パッセンジャー）及びアンチセンス鎖（ガイド）を有する二本鎖オリゴヌクレオチドであって、アンチセンス鎖又はアンチセンス鎖の一部分は、標的mRNAの切断に際してアルゴノート2（Ago2）エンドヌクレアーゼにより使用される二本鎖オリゴヌクレオチド、又は(b)単一のアンチセンス鎖を有する一本鎖オリゴヌクレオチドであって、そのアンチセンス鎖（又はそのアンチセンス鎖の一部分）は、標的mRNAの切断に際してAgo2エンドヌクレアーゼにより使用される一本鎖オリゴヌクレオチドのいずれかを指す。

鎖：本明細書で使用される場合、用語「鎖」は、ヌクレオチド間連結（例えば、ホスホジエステル連結、ホスホロチオエート連結）を介して共に連結されているヌクレオチドの単一の連続配列を指す。一部の実施形態では、鎖は、2つの遊離末端、例えば、5'-末端及び3'-末端を有する。

対象：本明細書で使用される場合、用語「対象」は、マウス、ウサギ、及びヒトを含む任意の哺乳動物を意味する。一実施形態では、対象は、ヒト又は非ヒト霊長類である。用語「個体」又は「患者」は、「対象」と同義的に使用される場合がある。一部の実施形態では、対象は、青年期ヒト対象（例えば、18歳未満、12歳未満、6歳未満、3歳未満）である。しかしながら、一部の実施形態では、対象は、成人ヒト対象（例えば、18歳又はそれよりも高齢の）である。

合成：本明細書で使用される場合、用語「合成」は、人為的に合成されたか（例えば、

10

20

30

40

50

機械（例えば、固相核酸合成機）を使用して）、又はそうでなければ通常その分子を産生する天然供給源（例えば、細胞又は生物）に由来しない核酸又は他の分子を指す。

【0025】

標的指向性リガンド：本明細書で使用される場合、用語「標的指向性リガンド」は、目的の組織又は細胞の同種分子（例えば、受容体）と選択的に結合し、他方の物質を目的の組織又は細胞へと標的化するために別の物質にコンジュゲート可能である分子（例えば、炭水化物、アミノ糖、コレステロール、ポリペプチド、又は脂質）を指す。例えば、一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、オリゴヌクレオチドを目的の特定の組織又は細胞へと標的化するためにオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、細胞表面受容体と選択的に結合する。従って、一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされると、細胞の表面に発現されている受容体との選択的結合により、並びにオリゴヌクレオチド、標的指向性リガンド、及び受容体を含む複合体の細胞によるエンドソーム内部移行により、特定の細胞内へのオリゴヌクレオチドの送達を容易にする。一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、オリゴヌクレオチドが細胞中で標的指向性リガンドから放出されるように、細胞内部移行後に又は細胞内部移行中に切断されるリンカーを介してオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされている。

【0026】

テトラループ：本明細書で使用される場合、用語「テトラループ」は、ヌクレオチドのフランキング配列のハイブリダイゼーションにより形成される隣接二重鎖の安定性を増加させるループを指す。安定性の増加は、無作為に選択されたヌクレオチドの配列からなる同等の長さの1セットのループから平均して予想される隣接ステム二重鎖の T_m よりも高い隣接ステム二重鎖の融解温度（ T_m ）の上昇として検出可能である。例えば、テトラループは、少なくとも2塩基対長の二重鎖を含むヘアピンに、10mM NaHPO_4 中で少なくとも50℃、少なくとも55℃、少なくとも56℃、少なくとも58℃、少なくとも60℃、少なくとも65℃、又は少なくとも75℃の融解温度を付与することができる。一部の実施形態では、テトラループは、スタッキング相互作用により隣接ステム二重鎖中の塩基対を安定させることができる。加えて、テトラループのヌクレオチド間の相互作用としては、これらに限定されないが、非ワトソン・クリック型塩基対合、スタッキング相互作用、水素結合、及び接触相互作用が挙げられる（Cheongら、Nature、1990年8月16日；346巻（6285号）：680～2頁；Heus及びPardi、Science、1991年7月12日；253巻（5016号）：191～4頁）。一部の実施形態では、テトラループは、3～6個のヌクレオチドを含むか又はからなり、典型的には4～5個のヌクレオチドである。ある実施形態では、テトラループは、修飾されていてもよく又はされていなくともよい（例えば、標的指向性部分にコンジュゲートされていてもよく又はされていなくともよい）3、4、5、又は6個のヌクレオチドを含むか又はからなる。一実施形態では、テトラループは、4個のヌクレオチドからなる。任意のヌクレオチドをテトラループに使用することができ、Cornish-Bowden（1985年）Nucleic Acids Res.、13巻：3021～3030頁に記載の、そのようなヌクレオチドの標準IUPAC-IUB記号を使用することができる。例えば、文字「N」は、その位置には任意の塩基が存在してもよいことを意味するために使用することができ、文字「R」は、その位置にはA（アデニン）又はG（グアニン）が存在してもよいことを示すために使用することができ、「B」は、その位置にはC（シトシン）、G（グアニン）、又はT（チミン）が存在してもよいことを示すために使用することができる。テトラループの例としては、UNCGファミリーのテトラループ（例えば、UUCG）、GNRAファミリーのテトラループ（例えば、GAAA）、及びCUUGテトラループが挙げられる（Woeseら、Proc Natl Acad Sci USA、1990年11月；87巻（21号）：8467～71頁；Antaoら、Nucleic Acids Res.、1991年11月11日；19巻（21号）：5901～5頁）。DNAテトラループの例としては、d（GNNNA）ファミリーのテトラループ（

10

20

30

40

50

例えば、d (G T T A))、d (G N R A) ファミリーのテトラループ、d (G N A B) ファミリーのテトラループ、d (C N N G) ファミリーのテトラループ、及び d (T N C G) ファミリーのテトラループ (例えば、d (T T C G)) が挙げられる。例えば、N a k a n o ら、B i o c h e m i s t r y、41 巻 (48 号)、14281~14292 頁、2002 年。S H I N J I ら、N i p p o n K a g a k k a i K o e n Y o k o s h u 第 78 巻; 2 号; 731 頁 (2000 年) を参照されたい。これらの文献は、それらの関連開示について参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、テトラループは、ニック付きテトラループ構造内に含まれている。

【0027】

治療する：本明細書で使用される場合、用語「治療する」は、既存の状態 (例えば、疾患、障害) と比べて対象の健康及び／又は安寧を向上させるために、又は状態の発生の可能性を予防若しくは減少させるために、例えば、治療剤 (例えば、オリゴヌクレオチド) を対象に投与することにより、それを必要とする対象に療治を提供する行為を指す。一部の実施形態では、治療は、対象が経験している状態 (例えば、疾患、障害) の少なくとも 1 つの徴候、症状、又は寄与要因の頻度又は重症度を低減させることを含む。

【0028】

I I . オリゴヌクレオチドに基づく阻害剤

i . C T N N B 1 標的指向性オリゴヌクレオチド

C T N N B 1 標的指向性オリゴヌクレオチドを使用して、 β -カテニン活性を低減させることにより、並びに結果的には胆管形成を増加させること及び胆汁酸合成を阻害することにより、胆管減少症を有する対象の治療利益を達成することができる。製作された任意の好適な C T N N B 1 標的指向性オリゴヌクレオチドが使用される。例えば、製作された C T N N B 1 標的指向性オリゴヌクレオチドは、2011 年 7 月 1 日に出願された国際特許出願第 P C T / U S 2 0 1 1 / 0 4 2 8 2 0 号パンフレット; 2012 年 2 月 9 日に公開された国際公開第 2012 / 018754 号パンフレット; 及び 2013 年 7 月 18 日に公開された国際公開第 2013 / 105022 号パンフレットに見出される。これらの文献の各々の C T N N B 1 標的指向性オリゴヌクレオチドに関する内容は、本目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

標的指向性配列は、本明細書に記載のような複数の異なるオリゴヌクレオチド構造 (又は形式) に入れることができる。

従って、一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、細胞中の m R N A を標的としその発現を阻害するための、C T N N B 1 m R N A との相補性領域を有するように設計されている。相補性領域は、一般に、オリゴヌクレオチド (又はその鎖) が、その発現を阻害するために C T N N B 1 m R N A にアニーリングすることを可能にするのに好適な長さ及び塩基内容である。

【0029】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドは、配列番号 3 に示されている配列に対して、その長さにわたって少なくとも部分的に相補的な相補性領域 (例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖の) を含む。一部の実施形態では、本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドは、配列番号 3 に示されている配列と、その長さにわたって完全に相補的である相補性領域を (例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖に) 含む。一部の実施形態では、配列番号 3 に示されている配列の連続ヌクレオチドと相補的であるオリゴヌクレオチドの相補性領域は、アンチセンス鎖の長さ全体にわたる。一部の実施形態では、配列番号 3 のいずれか 1 つに示されている配列の連続ヌクレオチドと相補的であるオリゴヌクレオチドの相補性領域は、アンチセンス鎖の長さ全体の部分にわたる (例えば、アンチセンス鎖の 3' 末端の 2 個以外の全てのヌクレオチド) 。

一部の実施形態では、相補性領域は、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも 14、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、少なくとも 22、少なくとも 23、少なくとも 2

10

20

30

40

50

4、少なくとも25ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、12~30（例えば、12~30、12~22、15~25、17~21、18~27、19~27、又は15~30）ヌクレオチド長の範囲である、CTNNB1との相補性領域を有する。一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30ヌクレオチド長である、CTNNB1との相補性領域を有する。

【0030】

一部の実施形態では、CTNNB1との相補性領域は、CTNNB1 mRNAの対応する配列と比較して、1つ又は複数のミスマッチを有してもよい。オリゴヌクレオチドにある相補性領域は、適切なハイブリダイゼーション条件下でCTNNB1 mRNAと相補的な塩基対を形成する能力を維持する限り、最大1つ、最大2つ、最大3つ、最大4つ、最大5つ等のミスマッチを有してもよい。或いは、オリゴヌクレオチドの相補性領域は、適切なハイブリダイゼーション条件下でCTNNB1 mRNAと相補的な塩基対を形成する能力を維持する限り、1つ以下、2つ以下、3つ以下、4つ以下、又は5つ以下のミスマッチを有してもよい。一部の実施形態では、相補性領域に1つよりも多くのミスマッチが存在する場合、それらは、オリゴヌクレオチドが適切なハイブリダイゼーション条件下でCTNNB1 mRNAと相補的な塩基対を形成する能力を維持する限り、連続的に（例えば、2つ、3つ、4つ、又はそれよりも多くが連続して）配置されていてもよく、又は相補性領域の全体にわたって点在していてもよい。

【0031】

i i. オリゴヌクレオチド構造

本開示の方法でCTNNB1 mRNAを標的とするのに有用なオリゴヌクレオチドには、RNAi、miRNA等を含む様々な構造が存在する。本明細書又は他所で開示される構造はいずれも、CTNNB1 mRNAを標的とするためのフレームワークとして使用することができる。CTNNB1発現を標的とするための二本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、RNAi経路による）は、一般に、互いに二重鎖を形成するセンス鎖及びアンチセンス鎖を有する。一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、共有結合で連結されていない。しかしながら、一部の実施形態では、センス鎖及びアンチセンス鎖は、共有結合で連結されている。

一部の実施形態では、CTNNB1発現を低減するための二本鎖オリゴヌクレオチドは、RNA干渉（RNAi）を引き起こす。例えば、各鎖が、1~5個ヌクレオチドの少なくとも1つの3'突出を有する19~25個ヌクレオチドのサイズを有するRNAiオリゴヌクレオチドが開発されている（例えば、米国特許第8,372,968号明細書を参照）。ダイサーによりプロセッシングされて活性RNAi産物を生成するより長いオリゴヌクレオチドも開発されている（例えば、米国特許第8,883,996号明細書を参照）。更なる研究により、鎖の一方が熱力学的に安定なテトラループ構造を含む構造を含む、少なくとも一方の鎖の少なくとも一方の末端が二重鎖標的指向性領域を越えて伸長している伸長二本鎖オリゴヌクレオチドがもたらされた（例えば、米国特許第8,513,207号明細書及び第8,927,705号明細書並びに国際公開第2010033225号パンフレットを参照。これらの文献は、それらのオリゴヌクレオチドの開示について参照により本明細書に組み込まれる）。そのような構造としては、一本鎖伸長（分子の一方又は両方の側の）並びに二本鎖伸長を挙げることができる。

【0032】

一部の実施形態では、本明細書に記載の配列は、両方とも17~36ヌクレオチド長の範囲であるセンス鎖及びアンチセンス鎖を含むオリゴヌクレオチドに組み込まれていてもよく、又はそうしたオリゴヌクレオチドを使用して標的化することができる。一部の実施形態では、それらのセンス鎖の3'伸長内にテトラループ構造、及びそのアンチセンス鎖の3'末端に2個の末端突出ヌクレオチドを有する、そのような配列が組み込まれているオリゴヌクレオチドが提供される。一部の実施形態では、2個の末端突出ヌクレオチドは

、G Gである。典型的には、アンチセンス鎖の2個の末端G Gヌクレオチドの一方又は両方は、標的と相補的ではない。

一部の実施形態では、両方とも21～23ヌクレオチド長の範囲であるセンス鎖及びアンチセンス鎖を有する、そのような配列が組み込まれているオリゴヌクレオチドが提供される。一部の実施形態では、1又は2ヌクレオチド長である3'突出が、センス鎖、アンチセンス鎖、又はセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方に提供されている。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、23個ヌクレオチドのガイド鎖及び21個ヌクレオチドのパッセンジャー鎖を有し、パッセンジャー鎖の3'-末端及びガイド鎖の5'-末端は平滑末端を形成し、ガイド鎖は2個ヌクレオチドの3'突出を有する。

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、21～23ヌクレオチド長の範囲であってもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、センス鎖及び／又はアンチセンス鎖の3'末端に突出（例えば、1、2、又は3ヌクレオチド長の）を有してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド（例えば、siRNA）は、標的RNAに対してアンチセンスである21個ヌクレオチドのガイド鎖、及び相補的パッセンジャー鎖を含んでいてもよく、両鎖はアニーリングして、19bp二重鎖、及びいずれかの又は両方の3'末端に2個ヌクレオチドの突出を形成する。例えば、米国特許第9012138号明細書、米国特許第9012621号明細書、及び米国特許第9193753号明細書を参照されたい。これらの文献の各々の内容は、それらの関連開示について本明細書に組み込まれる。

【0033】

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、アンチセンスーセンス二重鎖を越えて伸長する領域を含む36個ヌクレオチドのセンス鎖を有し、伸長領域は、ステムが6塩基対の二重鎖であり、テトラループが4個ヌクレオチドを有するステムーテトラループ構造を有する。こうした実施形態のあるものでは、テトラループヌクレオチドの3個又は4個は各々、一価GalNaCリガンドにコンジュゲートされている。

一部の実施形態では、本発明のオリゴヌクレオチドは、25個ヌクレオチドのセンス鎖、及びダイサー酵素による作用を受けると、成熟RISCに組み込まれるアンチセンス鎖がもたらされる27個ヌクレオチドのアンチセンス鎖を含む。[[この構造を指す参照を挿入する。出願を保留しないこと。]]

【0034】

本明細書で開示される組成物及び方法で使用するための他のオリゴヌクレオチド設計としては、以下のものが挙げられる：16量体siRNA（例えば、Nucleic Acids in Chemistry and Biology、Blackburn（編）、Royal Society of Chemistry、2006年を参照）、shRNA（例えば、19bp又はそれよりも短いステムを有する；例えば、Mooreら、Methods Mol. Biol. 2010年；629巻：141～158頁を参照）、平滑末端siRNA（例えば、19bp長の；例えば、Kraynack及びBaker、RNA 12巻、163～176頁（2006年）を参照）、非対称siRNA（aiRNA。例えば、Sunら、Nat. Biotechnol. 26巻、1379～1382頁（2008年）を参照）、非対称短鎖二重鎖siRNA（asymmetric shorter-duplex siRNA）（例えば、Changら、Mol Ther. 2009年4月；17巻（4号）：725～32頁を参照）、フォーク型siRNA（例えば、Hohjoh、FEBS Letters、557巻、1～3号；2004年1月、193～198頁を参照）、一本鎖siRNA（Elsner；Nature Biotechnology 30巻、1063頁（2012年））、ダンベル型環状siRNA（例えば、Abeら、J Am Chem Soc 129巻：15108～15109頁（2007年）を参照）、及び低分子内部セグメント化干渉RNA（small internally segmented interfering RNA）（sisRNA；例えば、Bramsenら、Nucleic Acids Res. 2007年9月；35巻（17号）：5886～5897頁を参照）。上述の参考文献の

各々は、その中の関連開示についてその全体が参照により組み込まれる。CTNNB1の発現を低減又は阻害するために一部の実施形態で使用するオリゴヌクレオチド構造の更なる非限定的な例は、マイクロRNA (miRNA)、短鎖ヘアピンRNA (shRNA)、及び短鎖siRNAである (例えば、Hamiltonら、Embo J、2002年、21巻 (17号) : 4671~4679頁を参照 ; また米国特許出願公開第20090099115号明細書を参照)。

【0035】

a. アンチセンス鎖

一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチドは、最大で40ヌクレオチド長 (例えば、最大で40、最大で35、最大で30、最大で27、最大で25、最大で21、最大で19、最大で17、又は最大で12ヌクレオチド長) のアンチセンス鎖を有してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも12ヌクレオチド長 (例えば、少なくとも12、少なくとも15、少なくとも19、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも25、少なくとも27、少なくとも30、少なくとも35、又は少なくとも38ヌクレオチド長) のアンチセンス鎖を有してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12~40 (例えば、12~40、12~36、12~32、12~28、15~40、15~36、15~32、15~28、17~21、17~25、19~27、19~30、20~40、22~40、25~40、又は32~40) ヌクレオチド長の範囲のアンチセンス鎖を有してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、又は40ヌクレオチド長のアンチセンス鎖を有してもよい。

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖は、「ガイド鎖」と呼ばれる場合がある。例えば、アンチセンス鎖が、RNA誘導サイレンシング複合体 (RISC) と係合し、アルゴノートタンパク質に結合するか、又は1つ若しくは複数の類似因子と係合若しくは結合し、標的遺伝子のサイレンシングを指図することができる場合、それをガイド鎖と呼ぶことができる。一部の実施形態では、ガイド鎖と相補的なセンス鎖は、「パッセンジャー鎖」と呼ばれる場合がある。

【0036】

b. センス鎖

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、最大で40ヌクレオチド長 (例えば、最大で40、最大で36、最大で30、最大で27、最大で25、最大で21、最大で19、最大で17、又は最大で12ヌクレオチド長) のセンス鎖 (又はパッセンジャー鎖) を有してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも12ヌクレオチド長 (例えば、少なくとも12、少なくとも15、少なくとも19、少なくとも21、少なくとも25、少なくとも27、少なくとも30、少なくとも36、又は少なくとも38ヌクレオチド長) のセンス鎖を有してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12~40 (例えば、12~40、12~36、12~32、12~28、15~40、15~36、15~32、15~28、17~21、17~25、19~27、19~30、20~40、22~40、25~40、又は32~40) ヌクレオチド長の範囲のセンス鎖を有してもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、又は40ヌクレオチド長のセンス鎖を有してもよい。

【0037】

一部の実施形態では、センス鎖は、その3'-末端にステムループ構造を含む。一部の実施形態では、センス鎖は、その5'-末端にステムループ構造を含む。一部の実施形態では、ステムは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、又は14塩基対長の二重鎖である。一部の実施形態では、ステムループは、分解 (例えば、酵素的分解) に対するより良好な保護を分子に提供し、標的細胞へと送達するための標的

指向性特徴を促進する。例えば、一部の実施形態では、ループは、オリゴヌクレオチドの遺伝子発現阻害活性に実質的に影響を及ぼさずに修飾を行うことができる追加のヌクレオチドを提供する。ある実施形態では、本明細書には、センス鎖が（例えば、その3'末端に） S_1-L-S_2 として示されるステムループを含み、式中 S_1 は、 S_2 と相補的であり、 L は、 S_1 と S_2 との間に最大で10ヌクレオチド長（例えば、3、4、5、6、7、8、9、又は10ヌクレオチド長）のループを形成するオリゴヌクレオチドが提供される。

一部の実施形態では、ステムループのループ（ L ）は、テトラループである（例えば、ニック付きテトラループ構造内の）。テトラループは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、及びそれらの組合せを含んでもよい。典型的には、テトラループは、4～5個のヌクレオチドを有する。

10

【0038】

c. 二重鎖の長さ

一部の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間に形成される二重鎖は、少なくとも12（例えば、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、又は少なくとも21）ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間に形成される二重鎖は、12～30ヌクレオチド長（例えば、12～30、12～27、12～22、15～25、18～30、18～22、18～25、18～27、18～30、19～30、又は21～30ヌクレオチド長）の範囲である。一部の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間に形成される二重鎖は、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間に形成される二重鎖は、センス鎖及び／又はアンチセンス鎖の長さ全体にはわたっていない。一部の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間の二重鎖は、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかの長さ全体にわたる。ある実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間の二重鎖は、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方の長さ全体にわたる。

20

【0039】

d. オリゴヌクレオチド末端

一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、センス鎖及びアンチセンス鎖を含み、センス鎖若しくはアンチセンス鎖のいずれかに、又はセンス鎖及びアンチセンス鎖の両方に、3'突出が存在する。一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、一方の5'末端が、他方の5'末端と比較して熱力学的により不安定である。一部の実施形態では、センス鎖の3'末端に平滑末端、及びアンチセンス鎖の3'末端に突出を含む非対称オリゴヌクレオチドが提供される。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の3'突出は、1～8ヌクレオチド長（例えば、1、2、3、4、5、6、7、又は8ヌクレオチド長）である。

30

典型的には、RNAiのオリゴヌクレオチドは、アンチセンス（ガイド）鎖の3'末端に2個ヌクレオチドの突出を有する。しかしながら、他の突出が可能である。一部の実施形態では、突出は、1～6個ヌクレオチド、任意選択で1～5、1～4、1～3、1～2、2～6、2～5、2～4、2～3、3～6、3～5、3～4、4～6、4～5、5～6個ヌクレオチド、又は1、2、3、4、5、若しくは6個ヌクレオチドの長さを含む3'突出である。しかしながら、一部の実施形態では、突出は、1～6個ヌクレオチド、任意選択で1～5、1～4、1～3、1～2、2～6、2～5、2～4、2～3、3～6、3～5、3～4、4～6、4～5、5～6個ヌクレオチド、又は1、2、3、4、5、若しくは6個ヌクレオチドの長さを含む5'突出である。

40

一部の実施形態では、センス鎖及び／又はアンチセンス鎖の3'末端又は5'末端の1つ又は複数の（例えば、2、3、4個の）末端ヌクレオチドが修飾されている。例えば、一部の実施形態では、アンチセンス鎖の3'末端の1個又は2個の末端ヌクレオチドが修飾されている。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の3'末端の最後のヌクレオチドが

50

修飾されており、例えば2'-修飾、例えば2'-O-メトキシエチルを含む。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の3'末端の最後の1個又は2個の末端ヌクレオチドは、標的と相補的である。一部の実施形態では、アンチセンス鎖の3'末端の最後の1個又は2個のヌクレオチドは、標的と相補的でない。一部の実施形態では、センス鎖又はアンチセンス鎖の5'末端及び／又は3'末端は、逆向きキャップヌクレオチド (inverted cap nucleotide) を有する。

【0040】

e. ミスマッチ

一部の実施形態では、センス鎖とアンチセンス鎖との間には1つ又は複数の（例えば、1、2、3、4、5つの）ミスマッチが存在する。センス鎖とアンチセンス鎖との間に1つよりも多くのミスマッチが存在する場合、それらは、連続的に配置されていてもよく（例えば、2つ、3つ、又はそれよりの多くが連続して）、又は相補性領域の全体にわたって点在していてもよい。一部の実施形態では、センス鎖の3'-末端は、1つ又は複数のミスマッチを含む。一実施形態では、2つのミスマッチが、センス鎖の3'末端に組み込まれている。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドのセンス鎖の3'-末端のセグメントの塩基ミスマッチ又は不安定化は、恐らくはダイサーによるプロセッシングを促進することにより、RNAiにおける合成二重鎖の効力を向上させた。

【0041】

i i i. 一本鎖オリゴヌクレオチド

一部の実施形態では、本明細書に記載のCTNNB1発現を低減するためのオリゴヌクレオチドは、一本鎖である。そのような構造としては、これらに限定されないが、一本鎖RNAiオリゴヌクレオチドを挙げることができる。最近の努力により、一本鎖RNAiオリゴヌクレオチドの活性が実証されている（例えば、Matsuiら（2016年5月）、Molecular Therapy、24巻（5号）、946～955頁を参照）。しかしながら、一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'から3'方向に記載して、特定の核酸の標的とされているセグメントの逆相補体を含み、（例えば、ギャップマー (gapmer) として）細胞でのその標的RNAのRNase H媒介性切断を誘導するように、又は（例えば、ミックスマー (mixmer) として）細胞での標的mRNAの翻訳を阻害するように好適に修飾されている核酸塩基配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドである。本開示で使用するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドの修飾に関するその開示が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,567,587号明細書に示されているものを含む、当該技術分野で公知の任意の好適な様式で修飾することができる（例えば、長さ、核酸塩基（ピリミジン、プリン）の糖部分、及び核酸塩基のヘテロ環部分の変更を含む）。更に、アンチセンス分子は、特定の標的遺伝子の発現を低減させるために、数十年にわたって使用されている（例えば、Bennettら、Pharmacology of Antisense Drugs, Annual Review of Pharmacology and Toxicology、57巻：81～105頁を参照）。

【0042】

i v. オリゴヌクレオチド修飾

オリゴヌクレオチドは、種々の方法で修飾して、特異性、安定性、送達、生物学的利用能、ヌクレアーゼ分解からの耐性、免疫原性、塩基対合特性、RNA分布、及び細胞取り込み、及び治療使用又は研究使用に関連する他の特徴を向上又は制御することができる。例えば、Bramsenら、Nucleic Acids Res.、2009年、37巻、2867～2881頁；Bramsen及びKjems (Frontiers in Genetics、3巻（2012年）：1～22頁)を参照されたい。従って、一部の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の好適な修飾を含んでもよい。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、その塩基（又は核酸塩基）、糖（例えば、リボース、デオキシリボース）、又はホスフェート基に修飾を有する。

オリゴヌクレオチドの修飾の数及びそうしたヌクレオチド修飾の位置は、オリゴヌクレオチドの特性に影響を及ぼす場合がある。例えば、オリゴヌクレオチドは、それらを脂質ナノ粒子 (LNP) 又は類似の担体にコンジュゲートすることにより又は包含させることにより、*in vivo* 送達することができる。しかしながら、オリゴヌクレオチドが LNP 又は類似の担体により保護されていない場合 (例えば、「ネイキッド送達」)、そのヌクレオチドの少なくとも一部を修飾することが有利であり得る。従って、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドのいずれかのある実施形態では、オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの全て又は実質的に全てが修飾されている。ある実施形態では、ヌクレオチドの半分よりも多くが修飾されている。ある実施形態では、ヌクレオチドの半分未満が修飾されている。典型的には、ネイキッド送達の場合、全てのヌクレオチドが、そのヌクレオチドの糖基の 2' 位で修飾されている。こうした修飾は、可逆的であってもよく又は不可逆的であってもよい。典型的には、2' - 位置修飾は、2' - フルオロ、2' - O - メチル等である。一部の実施形態では、本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドは、所望の特徴 (例えば、酵素的分解からの保護、*in vivo* 投与後に所望の細胞を標的とする能力、及び/又は熱力学的安定性) をもたらすのに十分な数及びタイプの修飾ヌクレオチドを有する。

10

【0043】

a. 糖修飾

一部の実施形態では、修飾糖 (本明細書では糖類似体とも呼ばれる) としては、例えば、糖の 2'、3'、4'、及び/又は 5' 炭素位置に 1 つ又は複数の修飾が生じる修飾デオキシリボース又はリボース部分が挙げられる。また、一部の実施形態では、修飾糖は、ロックド核酸 (「LNA」) (例えば、Koshkin ら (1998 年)、Tetrahedron 54 巻、3607~3630 頁を参照)、アンロックド核酸 (「UNA」) (例えば、Snead ら (2013 年)、Molecular Therapy - Nucleic Acids、2 巻、e103 頁を参照)、及び架橋核酸 (「BNA」) (例えば、Imanishi 及び Obika (2002 年)、The Royal Society of Chemistry, Chem. Commun.、1653~1659 頁を参照) に存在するもの等の、非天然代替炭素構造を含んでもよい。Koshkin ら、Snead ら、並びに Imanishi 及び Obika は、糖修飾に関するそれらの開示が参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

一部の実施形態では、糖のヌクレオチド修飾は、2' - 修飾を含む。ある実施形態では、2' - 修飾は、2' - アミノエチル、2' - フルオロ、2' - O - メチル、2' - O - メトキシエチル、又は 2' - デオキシ - 2' - フルオロ - β - d - アラビノ核酸であってもよい。典型的には、修飾は、2' - フルオロ、2' - O - メチル、又は 2' - O - メトキシエチルである。しかしながら、オリゴヌクレオチドに使用するために開発された種々様々な 2' 位修飾を、本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドに使用することができる。例えば、Bramsen ら、Nucleic Acids Res.、2009 年、37 巻、2867~2881 頁を参照されたい。一部の実施形態では、糖の修飾は、糖環の 1 つ又は複数の炭素の修飾を含んでもよい、糖環の修飾を含む。例えば、ヌクレオチドの糖の修飾は、糖の 2' - 炭素と 1' - 炭素又は 4' - 炭素との間の連結を含んでもよい。例えば、連結は、エチレン架橋又はメチレン架橋を含んでもよい。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、2' - 炭素と 3' - 炭素との結合を欠如する非環式糖を有する。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、例えば、糖の 4' 位にチオール基を有する。

40

一部の実施形態では、末端 3' - 末端基 (例えば、3' - ヒドロキシル) は、ホスフェート基、或いは例えば、リンカー、アダプター、若しくは標識を付着させるために、又はオリゴヌクレオチドを別の核酸と直接ライゲーションさせるために使用することができる他の基である。

【0044】

b. 5' 末端ホスフェート

50

オリゴヌクレオチドの5'-末端ホスフェート基は、アルゴノート2との相互作用を増強してもよく又は一部の場合では増強する。しかしながら、5'-ホスフェート基を含むオリゴヌクレオチドは、ホスファターゼ又は他の酵素による分解に感受性であってもよく、それにより *in vivo* でのそれらの生物学的利用能を制限することができる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドとしては、そのような分解に耐性である5'-ホスフェートの類似体が挙げられる。一部の実施形態では、ホスフェート類似体は、オキシメチルホスホネート、ビニルホスホネート、又はマロニルホスホネートであってもよい。ある実施形態では、オリゴヌクレオチド鎖の5'-末端は、天然5'-ホスフェート基の静電的及び立体的特性を模倣する化学部分（「ホスフェート模倣体」）に付着されている（例えば、Prakashら（2015年）、Nucleic Acids Res.、Nucleic Acids Res. 2015年3月31日；43巻（6号）：2993～3011頁を参照。この文献のホスフェート類似体に関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。5'-末端に付着させることができるホスフェート模倣体が数多く開発されている（例えば、米国特許第8,927,513号明細書を参照。この文献のホスフェート類似体に関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。オリゴヌクレオチドの5'-末端のための他の修飾が開発されている（例えば、国際公開第2011/133871号パンフレットを参照。この文献のホスフェート類似体に関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。ある実施形態では、ヒドロキシル基が、オリゴヌクレオチドの5'-末端に付着されている。

10

20

【0045】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、糖の4'-炭素位置にホスフェート類似体を有する（「4'-ホスフェート類似体」と呼ばれる）。例えば、2017年9月1日に出願された国際特許出願PCT/US2017/049909号パンフレット、2016年9月2日に出願された、4'-Phosphate Analogs and Oligonucleotides Comprising the Sameと題する米国特許仮出願第62/383,207号明細書、及び2016年9月12日に出願された、4'-Phosphate Analogs and Oligonucleotides Comprising the Sameと題する第62/393,401号明細書を参照されたい。これらの文献の各々のホスフェート類似体に関する内容は、参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、5'-末端ヌクレオチドに4'-ホスフェート類似体を含む。一部の実施形態では、ホスフェート類似体は、オキシメチル基の酸素原子が糖部分（例えば、その4'-炭素に）又はその類似体に結合されているオキシメチルホスホネートである。他の実施形態では、4'-ホスフェート類似体は、チオメチル基の硫黄原子又はアミノメチル基の窒素原子が糖部分又はその類似体の4'-炭素に結合されているチオメチルホスホネート又はアミノメチルホスホネートである。ある実施形態では、4'-ホスフェート類似体は、オキシメチルホスホネートである。一部の実施形態では、オキシメチルホスホネートは、式 $\text{O}-\text{CH}_2-\text{PO}(\text{OH})_2$ 又は $\text{O}-\text{CH}_2-\text{PO}(\text{OR})_2$ により表され、式中、Rは、独立して、H、 CH_3 、アルキル基、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $\text{CH}_2\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ 、 $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、又は保護基から選択される。ある実施形態では、アルキル基は CH_2CH_3 である。より典型的には、Rは、独立してH、 CH_3 、又は CH_2CH_3 から選択される。

30

40

【0046】

c. 修飾ヌクレオシド間連結

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、修飾ヌクレオシド間連結を含んでいてもよい。一部の実施形態では、ホスフェート修飾又は置換は、少なくとも1つの（例えば、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、又は少なくとも5つの）修飾ヌクレオチド間連結を含むオリゴヌクレオチドをもたらすことができる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドのいずれか1つは、1～10個の（例えば、1～10、2～8、4～6、3～10、5～10、1～5、1～3、又は1～2個の）修飾

50

ヌクレオチド間連結を含む。一部の実施形態では、本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドのいずれか1つは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個の修飾ヌクレオチド間連結を含む。

修飾ヌクレオチド間連結は、ホスホロジチオエート連結、ホスホロチオエート連結、ホスホトリエステル連結、チオノアルキルホスホネート連結、チオノアルキルホスホトリエステル連結、ホスホラミダイト連結、ホスホネート連結、又はボラノホスフェート連結であってもよい。一部の実施形態では、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドのいずれか1つの少なくとも1つの修飾ヌクレオチド間連結は、ホスホロチオエート連結である。

【0047】

d. 塩基修飾

一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の修飾核酸塩基を有する。一部の実施形態では、修飾核酸塩基（本明細書では塩基類似体とも呼ばれる）は、ヌクレオチド糖部分の1'位に連結されている。ある実施形態では、修飾核酸塩基は、窒素含有塩基である。ある実施形態では、修飾核酸塩基は、窒素原子を含んでいない。例えば、米国特許出願公開第20080274462号明細書を参照されたい。一部の実施形態では、修飾ヌクレオチドは、ユニバーサル塩基を含む。しかしながら、ある実施形態では、修飾ヌクレオチドは、核酸塩基を含んでいない（脱塩基）。

一部の実施形態では、ユニバーサル塩基は、修飾ヌクレオチドのヌクレオチド糖部分の1'位に、又は二重鎖に存在する場合、二重鎖の構造を実質的に変更することなく1つよりも多くのタイプの塩基の反対側に配置することができるヌクレオチド糖部分置換の等価位置に位置するヘテロ環式部分である。一部の実施形態では、標的核酸と完全に相補的な参照一本鎖核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）と比較して、ユニバーサル塩基を含む一本鎖核酸は、相補的核酸と形成される二重鎖よりも低い T_m を有する、標的核酸との二重鎖を形成する。しかしながら、一部の実施形態では、ユニバーサル塩基が、単一のミスマッチを生成するように塩基と置き換えられている参照一本鎖核酸と比較して、ユニバーサル塩基を含む一本鎖核酸は、ミスマッチ塩基を含む核酸と形成される二重鎖よりも高い T_m を有する、標的核酸との二重鎖を形成する。

【0048】

ユニバーサル結合ヌクレオチドの非限定的な例としては、イノシン、1- β -D-リボフラノシル-5-ニトロインドール、及び／又は1- β -D-リボフラノシル-3-ニトロピロールが挙げられる（Quayらの米国特許出願公開第20070254362号明細書；Van Aerschotら、*Acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside*、*Nucleic Acids Res.* 1995年11月11日；23巻（21号）：4363～70頁；Loakesら、*3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR*、*Nucleic Acids Res.* 1995年7月11日；23巻（13号）：2361～6頁；Loakes及びBrown、*5-Nitroindole as a universal base analogue*、*Nucleic Acids Res.* 1994年10月11日；22巻（20号）：4039～43頁。上述の文献の各々はそれらの塩基修飾に関する開示について参照により本明細書に組み込まれる）。

【0049】

e. 可逆的修飾

ある修飾をなして、標的細胞に到達する前の*in vivo*環境からオリゴヌクレオチドを保護することができるが、それらは、標的細胞のサイトゾルに到達するとオリゴヌクレオチドの効力又は活性を低減させる場合がある。分子が細胞の外部で望ましい特性を維持するように可逆的修飾をなすことができ、その後、可逆的修飾は、細胞のサイトゾル環境に進入すると除去される。可逆的修飾は、例えば、細胞内酵素の作用により、又は細胞内部の化学条件により（例えば、細胞内グルタチオンによる還元により）除去することが

できる。

一部の実施形態では、可逆的に修飾されたヌクレオチドは、グルタチオン感受性部分を含む。典型的には、核酸分子は、ヌクレオチド間ジホスフェート連結により創出される負電荷を遮蔽し、細胞取り込み及びヌクレアーゼ耐性を向上させるように、環式ジスルフィド部分で化学的に修飾されている。元々は *Traversa Therapeutics, Inc.* 社に帰属する米国特許出願公開第 2011/0294869 号明細書（「*Traversa*」）、*Solstice Biologics, Ltd.* 社の国際公開第 2015/188197 号パンフレット（「*Solstice*」）、*Meade* ら、*Nature Biotechnology*、2014 年、32 巻：1256～1263 頁（「*Meade*」）、*Merck Sharp & Dohme Corp* 社の国際公開第 2014/088920 号パンフレットを参照されたい。これらの文献の各々は、そのような修飾の開示について参照により組み込まれる。ヌクレオチド間ジホスフェート連結のこの可逆的修飾は、サイトゾルの還元環境（例えば、グルタチオン）により細胞内で切断されるように設計されている。より初期の例としては、細胞内部で切断可能であることが報告された中和ホスホトリエステル修飾が挙げられる（*Dellinger* ら、*J. Am. Chem. Soc.* 2003 年、125 巻：940～950 頁）。

【0050】

一部の実施形態では、そのような可逆的修飾は、オリゴヌクレオチドがヌクレアーゼ及び他の過酷な環境条件（例えば、pH）に曝されることになる *in vivo* 投与中（例えば、血液及び／又は細胞のリソソーム／エンドソームコンパートメントを通過中）の保護を可能にする。グルタチオンのレベルが細胞外空間と比較してより高い細胞のサイトゾルへと放出されると、修飾は、元に戻り、その結果としてオリゴヌクレオチドが切断される。可逆的なグルタチオン感受性部分を使用すると、不可逆的化学修飾を使用する場合に利用可能な選択肢と比較して、立体的により大きな化学基を目的のオリゴヌクレオチドに導入することが可能である。これは、そうしたより大きな化学基は、サイトゾルで除去されることになるため、細胞のサイトゾル内部のオリゴヌクレオチドの生物学的活性を妨害するはずがないからである。結果として、そうしたより大きな化学基を組み込んで、ヌクレアーゼ耐性、親油性、電荷、熱安定性、特異性、及び低免疫原性等の種々の利点をヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドに付与することができる。一部の実施形態では、グルタチオン感受性部分の構造を組み込んで、その放出の動力学を修飾することができる。

【0051】

一部の実施形態では、グルタチオン感受性部分は、ヌクレオチドの糖に付着されている。一部の実施形態では、グルタチオン感受性部分は、修飾ヌクレオチドの糖の 2' 炭素に付着されている。一部の実施形態では、グルタチオン感受性部分は、特に修飾ヌクレオチドがオリゴヌクレオチドの 5' 末端ヌクレオチドである場合、糖の 5' 炭素に位置する。一部の実施形態では、グルタチオン感受性部分は、特に修飾ヌクレオチドがオリゴヌクレオチドの 3' 末端ヌクレオチドである場合、糖の 3' 炭素に位置する。一部の実施形態では、グルタチオン感受性部分は、スルホニル基を含む。例えば、2018 年 3 月 1 日に公開された国際公開第 2018/039364 号パンフレット、及び 2016 年 8 月 23 日に出版された、*Compositions Comprising Reversibly Modified Oligonucleotides and Uses Thereof* と題する米国特許仮出願第 62/378,635 号明細書を参照されたい。これらの文献の内容は、その関連開示について参照により本明細書に組み込まれる。

【0052】

v. 標的指向性リガンド

一部の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドを、1 つ若しくは複数の細胞又は 1 つ若しくは複数の臓器に標的化することが望ましい場合がある。そのような戦略は、他の臓器における望ましくない効果の回避を支援することができるか、又はオリゴヌクレオチドにとって利益とならない可能性がある細胞、組織、若しくは臓器へのオリゴヌクレオチドの過度の喪失を回避することができる。従って、一部の実施形態では、本明細書で開示

されるオリゴヌクレオチドは、特定の組織、細胞、又は臓器の標的化を容易にするように、例えば、肝臓へのオリゴヌクレオチドの送達を容易にするように修飾されていてもよい。ある実施形態では、本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドは、肝臓の肝実質細胞へのオリゴヌクレオチドの送達を容易にするように修飾されていてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の標的指向性リガンドにコンジュゲートされているヌクレオチドを含む。

標的指向性リガンドは、炭水化物、アミノ糖、コレステロール、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質若しくはタンパク質の一部（例えば、抗体又は抗体断片）、又は脂質を含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的指向性リガンドはアプタマーである。例えば、標的指向性リガンドは、腫瘍血管系又は神経膠腫細胞を標的とするために使用される R G D ペプチド、腫瘍血管系若しくはストーマ、トランスフェリン、ラクトフェリンを標的とするための C R E K A ペプチド、又は C N S 血管系で発現されるトランスフェリン受容体を標的とするためのアプタマー、又は神経膠腫細胞上の E G F R を標的とするための抗 E G F R 抗体であってもよい。ある実施形態では、標的指向性リガンドは、1つ又は複数の G a l N A c 部分である。

【0053】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの1個又は複数の（例えば、1、2、3、4、5、又は6個の）ヌクレオチドは各々、別々の標的指向性リガンドにコンジュゲートされている。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの2～4個のヌクレオチドは各々、別々の標的指向性リガンドにコンジュゲートされている。一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、標的指向性リガンドが歯ブラシの毛部分に相似し、オリゴヌクレオチドが歯ブラシに相似するように、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかの末端の2～4個のヌクレオチドにコンジュゲートされている（例えば、リガンドは、センス鎖又はアンチセンス鎖の5'末端又は3'末端の2～4個ヌクレオチドの突出又は伸長部分にコンジュゲートされている）。例えば、オリゴヌクレオチドは、センス鎖の5'末端又は3'末端のいずれかにステムループを含んでいてもよく、ステムのループの1、2、3、又は4個のヌクレオチドは、例えば2016年6月23日に公開された国際公開第2016/100401号パンフレットに記載のような標的指向性リガンドに個々にコンジュゲートされていてもよい。この文献の関連内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0054】

一部の実施形態では、C T N N B 1 の発現を低減するオリゴヌクレオチドを、対象の肝臓の肝実質細胞に標的化することが望ましい、任意の好適な肝実質細胞指向性部分をこの目的に使用することができる。

G a l N A c は、主に肝実質細胞の洞様表面に発現され、末端ガラクトース又はN-アセチルガラクトサミン残基を含む循環性糖タンパク質（アシアロ糖タンパク質）の結合、内部移行、及びその後のクリアランスに主要な役割を有するアシアロ糖タンパク質受容体（A S G P R）に対する高親和性リガンドである。G a l N A c 部分を本開示のオリゴヌクレオチドにコンジュゲーションすることにより（間接的又は直接的のいずれかで）、そうしたオリゴヌクレオチドを、そうした肝実質細胞上に発現されるA S G P Rへと標的化することができる。

一部の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、一価G a l N A c に直接的に又は間接的にコンジュゲートされている。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つよりも多くの一価G a l N A c に直接的に又は間接的にコンジュゲートされている（つまり、2つ、3つ、又は4つの一価G a l N A c 部分にコンジュゲートされており、典型的には3つ又は4つの一価G a l N A c 部分にコンジュゲートされている）。一部の実施形態では、本開示のオリゴヌクレオチドは、1つ又は複数の二価G a l N A c 、三価G a l N A c 、又は四価G a l N A c 部分にコンジュゲートされている。

【0055】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの1個又は複数の（例えば、1、2、3、4、5、又は6個の）ヌクレオチドは各々、G a l N A c 部分にコンジュゲートされている

。一部の実施形態では、ステムループのループ（L）の2～4個のヌクレオチドは各々、別々のG a l N A cにコンジュゲートされている。一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、G a l N A c部分が歯ブラシの毛部分に相似し、オリゴヌクレオチドが歯ブラシに相似するように、センス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかの末端の2～4個のヌクレオチドにコンジュゲートされている（例えば、リガンドは、センス鎖又はアンチセンス鎖の5'末端又は3'末端の2～4個ヌクレオチドの突出又は伸長部分にコンジュゲートされている）。例えば、オリゴヌクレオチドは、センス鎖の5'末端又は3'末端のいずれかにステムループを含んでいてもよく、ステムのループの1、2、3、又は4個のヌクレオチドは、個々にG a l N A c部分にコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、G a l N A c部分は、センス鎖のヌクレオチドにコンジュゲートされている。例えば、各G a l N A c部分が1個のヌクレオチドにコンジュゲートされる場合、4つのG a l N A c部分が、センス鎖のテトラループのヌクレオチドにコンジュゲートされていてもよい。

10

【0056】

適切な方法又は化学（例えば、クリック化学）を使用して、標的指向性リガンドをヌクレオチドに連結することができる。一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、クリックリンカーを使用してヌクレオチドにコンジュゲートされている。一部の実施形態では、標的指向性リガンドは、アセタールに基づくリンカーを使用して、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれか1つのヌクレオチドにコンジュゲートされている。アセタールに基づくリンカーは、例えば、2016年6月23日に公開された国際公開第2016100401号A1パンフレットに開示されている。そのようなリンカーに関するこの文献の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、リンカーは不安定リンカーである。しかしながら、他の実施形態では、リンカーは、かなり安定である。一部の実施形態では、二重鎖伸長部分（最大で3、4、5、又は6塩基対長）が、標的指向性リガンド（例えば、G a l N A c部分）と二本鎖オリゴヌクレオチドとの間に提供されている。

20

【0057】

I I I . 製剤

オリゴヌクレオチドの使用を容易にするための種々の製剤が開発されている。例えば、オリゴヌクレオチドは、分解を最小限に抑えるか、送達及び／若しくは取り込みを容易にするか、又は製剤中のオリゴヌクレオチドに別の有益な特性を提供する製剤を使用して、対象又は細胞環境に送達することができる。一部の実施形態では、本明細書には、C T N N B 1の発現を低減させるオリゴヌクレオチド（例えば、一本鎖又は二本鎖オリゴヌクレオチド）を含む組成物が提供される。そのような組成物は、標的細胞の直近環境に又は全身性のいずれかで対象に投与されると、十分な割合のオリゴヌクレオチドが細胞に進入して、C T N N B 1発現を低減するように好適に製剤化することができる。様々な好適なオリゴヌクレオチド製剤のいずれかを使用して、本明細書で開示されるC T N N B 1を低減するためのオリゴヌクレオチドを送達することができる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リン酸緩衝生理食塩溶液等の緩衝溶液、リボソーム、ミセル構造、及びカプシドで製剤化される。一部の実施形態では、ネイキッドオリゴヌクレオチド又はそれらのコンジュゲートは、水又は水溶液（例えば、pH調整剤を有する水）で製剤化される。一部の実施形態では、ネイキッドオリゴヌクレオチド又はそれらのコンジュゲートは、塩基性緩衝水溶液（例えば、P B S）で製剤化される。

30

40

【0058】

カチオン性脂質を有するオリゴヌクレオチドの製剤を使用して、細胞へのオリゴヌクレオチドのトランスフェクションを容易にすることができる。例えば、リポフェクチン、カチオン性グリセロール誘導体、及びポリカチオン性分子（例えば、ポリリシン）等のカチオン性脂質を使用することができる。好適な脂質としては、オリゴフェクタミン、リポフェクタミン（L i f e T e c h n o l o g i e s 社）、N C 3 8 8（R i b o z y m e P h a r m a c e u t i c a l s , I n c . 社、ボールダー、コロラド州）、又はF u

50

Gene 6 (Roche 社) が挙げられ、これらは全て製造業者の使用説明書に従って使用することができる。

従って、一部の実施形態では、製剤は、脂質ナノ粒子を含む。一部の実施形態では、賦形剤は、リポソーム、脂質、脂質複合体、マイクロスフェア、マイクロ粒子、ナノスフェア、若しくはナノ粒子を含むか、又はそうでなければそれを必要とする対象の細胞、組織、臓器、若しくは体内に投与するために製剤化することができる（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第22版、Pharmaceutical Press、2013年を参照）。

【0059】

一部の実施形態では、本明細書で開示される製剤は、賦形剤を含む。一部の実施形態では、賦形剤は、組成物に、安定性の向上、吸収の向上、溶解性の向上、及び／又は活性成分の治療増強を付与する。一部の実施形態では、賦形剤は、緩衝剤（例えば、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、トリス塩基、又は水酸化ナトリウム）又はビヒクル（例えば、緩衝溶液、ペトロラタム、ジメチルスルホキシド、又は鉱物油）である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、その保管寿命を延長するために凍結乾燥され、その後使用（例えば、対象への投与）前に溶液にされる。従って、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドのいずれか1つを含む組成物中の賦形剤は、凍結乾燥保護剤（例えば、マンニトール、ラクトース、ポリエチレングリコール、又はポリビニルピロリドン）、又は崩壊温度調節剤（例えば、デキストラン、フィコール、又はゼラチン）であってもよい。

一部の実施形態では、医薬組成物は、その意図されている投与経路と適合するように製剤化される。投与経路の例としては、非経口投与、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）、経粘膜、及び直腸内投与が挙げられる。典型的には、投与経路は、静脈内又は皮下である。

【0060】

注射使用に好適な医薬組成物としては、無菌水溶液（水溶性の場合）又は分散物、及び無菌注射溶液又は分散物の即時調製用の無菌粉末が挙げられる。静脈内投与又は皮下投与の場合、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF社、パーシッパニー、ニュージャージー州）、又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が挙げられる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）、及びそれらの好適な混合物を含む溶媒又は分散媒であってもよい。多くの場合、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトール等の多価アルコール、及び塩化ナトリウムを組成物中に含むことが望ましいだろう。無菌注射溶液は、必要とされる量のオリゴヌクレオチドを、上記に列挙されている成分の1つ又は組合せを有する選択された溶媒に組み込み、必要に応じて、その後濾過滅菌することにより調製することができる。

一部の実施形態では、組成物は、少なくとも約0.1%又はそれよりも多くの治療剤（例えば、CTNNB1発現を低減するためのオリゴヌクレオチド）を含んでいてもよいが、活性成分のパーセンテージは、全組成物の質量又は容積の約1%～約80%又はそれよりも大きくてもよい。溶解性、生物学的利用能、生物学的半減期、投与経路、製品保管寿命等の要因、並びに他の薬学的考慮要因が、そのような医薬製剤を調製する当業者により企図されることになり、従って様々な投薬量及び治療レジメンが望ましい場合がある。

幾つかの実施形態は、本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドのいずれかの肝臓標的送達に関するが、他の組織標的化も企図される。

【0061】

IV. 使用の方法

i. 細胞におけるCTNNB1発現の低減

一部の実施形態では、細胞でのCTNNB1の発現を低減させるための本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドのいずれか1つの有効量を細胞に送達するための方法が提供される。本明細書で提供される方法は、任意の適切な細胞タイプに有用である。一部の実施形態では、細胞は、CTNNB1を発現するあらゆる細胞（例えば、肝実質細胞、マクロ

ファージ、単球由来細胞、前立腺がん細胞、脳、内分泌組織、骨髄、リンパ節、肺、胆嚢、肝臓、十二指腸、小腸、膵臓、腎臓、胃腸管、膀胱、脂肪及び柔組織、並びに皮膚の細胞)である。一部の実施形態では、細胞は、対象から得られたものであり、細胞が実質的にその天然表現型特性を維持するように、継代の回数が限定的であってもよい初代細胞である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドが送達される細胞は、*ex vivo*であってもよく又は*in vitro*であってもよい(つまり、培養中の細胞に、又は細胞が存在する生物に送達することができる)。具体的な実施形態では、肝実質細胞においてのみCTNNB1の発現を低減させるための本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドのいずれか1つの有効量を細胞に送達するための方法が提供される。

【0062】

一部の実施形態では、本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドを含む溶液を注射すること、オリゴヌクレオチドで覆われている粒子で衝撃すること、オリゴヌクレオチドを含む溶液を細胞又は生物と接触させること、又はオリゴヌクレオチドの存在下で細胞膜をエレクトロポレーションすることを含む、適切な核酸送達方法を使用して導入することができる。脂質媒介性担体輸送、化学媒介性輸送、及びリン酸カルシウム等のカチオン性リポソームトランスフェクション等の、オリゴヌクレオチドを細胞に送達するための他の適切な方法を使用することができる。

阻害の結果は、細胞又は対象の1つ又は複数の特性を評価するための適切なアッセイにより、又はCTNNB1発現を示す分子(例えば、RNA、タンパク質)を評価する生化学的技法により確認することができる。一部の実施形態では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドが、CTNNB1の発現レベルを低減する程度は、発現レベル(例えば、CTNNB1のmRNAレベル又はタンパク質レベル)を適切な対照(例えば、オリゴヌクレオチドが送達されていないか又は陰性対照が送達されている細胞又は細胞集団でのCTNNB1発現のレベル)と比較することにより評価される。一部の実施形態では、CTNNB1発現の適切な対照レベルは、対照レベルを毎回測定しなくともよいように、所定のレベル又は値であってもよい。所定のレベル又は値は、様々な形態をとることができる。一部の実施形態では、所定のレベル又は値は、中央値又は平均値等の、単一のカットオフ値であってもよい。

【0063】

一部の実施形態では、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドの投与は、細胞でのCTNNB1発現のレベルの低減をもたらす。一部の実施形態では、CTNNB1発現レベルの低減は、CTNNB1の適切な対照レベルと比較して、1%若しくはそれよりも低い、5%若しくはそれよりも低い、10%若しくはそれよりも低い、15%若しくはそれよりも低い、20%若しくはそれよりも低い、25%若しくはそれよりも低い、30%若しくはそれよりも低い、35%若しくはそれよりも低い、40%若しくはそれよりも低い、45%若しくはそれよりも低い、50%若しくはそれよりも低い、55%若しくはそれよりも低い、60%若しくはそれよりも低い、70%若しくはそれよりも低い、80%若しくはそれよりも低い、又は90%若しくはそれよりも低い低減であってもよい。適切な対照レベルは、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドと接触していない細胞又は細胞集団でのCTNNB1発現レベルであってもよい。一部の実施形態では、本明細書で開示される方法による、細胞へのオリゴヌクレオチド送達の効果は、有限期間後に評価される。例えば、CTNNB1のレベルは、オリゴヌクレオチドを細胞内に導入した少なくとも8時間後、12時間後、18時間後、24時間後に、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、又は14日後に、細胞で分析することができる。

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、細胞でオリゴヌクレオチド(例えば、そのセンス鎖及びアンチセンス鎖)を発現するように遺伝子操作されている導入遺伝子の形態で送達される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、本明細書で開示される任意のオリゴヌクレオチドを発現するように遺伝子操作されている導入遺伝子を使用して送達される。導入遺伝子は、ウイルスベクター(例えば、アデノウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、アデノ随伴ウイルス、又は単純ヘルペスウイ

10

20

30

40

50

ルス)又は非ウイルスベクター(例えば、プラスミド又は合成mRNA)を使用して送達してもよい。一部の実施形態では、導入遺伝子は、対象に直接注射してもよい。

【0064】

i i. 治療方法

本開示の態様は、対象の胆管減少症を治療するためにCTNNB1発現を低減するための方法に関する。一部の実施形態では、本方法は、それを必要とする対象に本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドのいずれか1つの有効量を投与することを含んでいてもよい。そのような治療を使用して、例えば、対象の胆管及び/又は再生を促進し、それにより胆汁酸の排出を促進することができる。また、本治療は、例えば、対象の胆汁酸合成を阻害し、それにより肝臓損傷を低減するために使用することができる。本開示は、胆管減少症及び/又は胆管減少症に関連する疾患若しくは障害(例えば、アラジール症候群及び胆道閉鎖症を含む)のリスクがある(影響を受け易い)対象を治療するための予防法及び治療法の両方を提供する。

10

【0065】

ある態様では、本開示は、対象に治療剤(例えば、オリゴヌクレオチド又はそれをコードするベクター若しくは導入遺伝子)を投与することにより、本明細書に記載のような疾患又は障害を対象において予防するための方法を提供する。一部の実施形態では、治療しようとする対象は、例えば、肝臓における β -カテニンタンパク質の量の低減から治療的に利益を得ることになる対象である。

本明細書に記載の方法は、典型的には、有効量の、すなわち望ましい治療結果をもたらすことが可能な量のオリゴヌクレオチドを対象に投与することを含む。治療的に許容される量は、疾患又は障害を治療することが可能な量であってもよい。任意の1つの対象にとって適切な投薬量は、対象のサイズ、体表面積、年齢、投与しようとする特定の組成物、組成物中の活性成分、投与の時間及び経路、全体的な健康、並びに同時に投与されている他の薬物を含むある要因に依存することになる。

20

【0066】

一部の実施形態では、対象には、本明細書で開示される組成物のいずれか1つが、経腸的に(例えば、経口的に、経胃栄養チューブにより、十二指腸栄養チューブにより、胃瘻により、又は直腸的に)、非経口的に(例えば、皮下注射、静脈内注射又は注入、動脈内注射又は注入、筋肉内注射)、局所的に(例えば、上皮に、吸入により、目薬により、又は粘膜を介して)、又は標的臓器(例えば、対象の肝臓)への直接注射により投与される。典型的には、本明細書で開示されるオリゴヌクレオチドは、静脈内に又は皮下に投与される。

30

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、 $0.1\text{ mg/kg} \sim 25\text{ mg/kg}$ (例えば、 $1\text{ mg/kg} \sim 5\text{ mg/kg}$)の範囲の用量で投与される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、 $0.1\text{ mg/kg} \sim 5\text{ mg/kg}$ の範囲の、又は $0.5\text{ mg/kg} \sim 5\text{ mg/kg}$ の範囲の用量で投与される。

非限定的なセットの例として、本開示のオリゴヌクレオチドは、典型的には、1年に1回、1年に2回、四半期毎に(3か月毎に1回)、2か月に1回(2か月毎に1回)、毎月、又は毎週投与されるだろう。

40

一部の実施形態では、治療しようとする対象は、ヒト又は非ヒト霊長類又は他の哺乳動物対象である。他の例示的な対象としては、イヌ及びネコ等の飼育動物;ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、及びニワトリ等の家畜;並びにマウス、ラット、モルモット、及びハムスター等の動物が挙げられる。

【実施例】

【0067】

実施例1:3, 5-ジエトキシカルボニル-1, 4-ジヒドロコリジン(DDC)を給餌した胆管損傷マウスモデルにおけるCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチド処置の評価

胆管上皮細胞分化に対するCTNNB1標的効果を決定するために、Swiss We

50

b s t e rマウスに、0.1%の3, 5-ジエトキシカルボニル-1, 4-ジヒドロコリジン (DDC) を給餌し、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチド (配列番号1に示されているセンス鎖配列及び配列番号2に示されているアンチセンス鎖配列を有する) で処置した。RNAiオリゴヌクレオチドは、そのセンス鎖にあるテトラループ (—G A A A—) の4個ヌクレオチドの各々にコンジュゲートされた単一の価G a l N a c部分、及びそのアンチセンス鎖の5'末端にホスフェート類似体を含むニック付きテトラループ構造を含んでいた。対照として、DDC給餌マウスをPBSで処置した。PBS又はCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで処置したDDC給餌マウスに由来する肝臓切片に対して、胆管上皮マーカーCK19 (図1及び図2) に対するウサギモノクローナル抗体 (カタログ番号: a b 5 2 6 2 5、A b c a m社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州) を使用して、免疫組織化学染色を実施した。図2では、PBS又はCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで処置した通常餌のマウスに由来する肝臓切片も評価した。図2に示されているように、マウスに、週1回投薬し (0、7、14、21、28、35日目)、投薬3日後に犠牲にした。レジンキャストを使用して、対照PBS又はCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで処置したDDC給餌マウスの胆管アーキテクチャーを可視化した (図5)。

【0068】

図1に示されているように、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチド (配列番号1に示されているセンス鎖配列及び配列番号2に示されているアンチセンス鎖配列を有する) で24日間処置したDDC給餌マウスに由来する肝臓切片は、PBSで処置した対照DDCマウスと比較して、CK19陽性細胞数の増加を示した。同様の結果が、図2に示されている経時的研究で見出された。DDC給餌は、CK19染色の数の増加をもたらし、これは、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドの第1の用量の10日後、24日後、及び38日後に、PBSで処置したDDC給餌マウスに由来する肝臓切片と比較して、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチド (配列番号1に示されているセンス鎖配列及び配列番号2に示されているアンチセンス鎖配列を有する) で処置したDDC給餌マウスに由来する肝臓切片で更に増加する (図2)。また、PBSを受け取った対照マウスと比較して、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドを受け取ったDDC給餌マウスで、より多くの小さな胆管が観察された (図5)。更に、CK19陽性染色細胞の共局在化により明らかなように、新しい小さな胆管が十分に形成され、胆管系に接続しており、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで処置したDDC給餌マウスの総胆管にインク注入されている (図6)。従って、こうした結果は、CTNNB1 mRNAを標的とするRNAiオリゴヌクレオチドが、DDC給餌肝損傷マウスモデルにおいて胆管上皮細胞分化を誘導し、胆管再生を促進することを示唆する。

【0069】

実施例2: M d r 2^{-/-}胆管損傷マウスモデルにおけるCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチド処置の評価

CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチド (配列番号1に示されているセンス鎖配列及び配列番号2に示されているアンチセンス鎖配列) を、別の胆管損傷マウスモデルでも試験した (M d r 2^{-/-}マウス)。M d r 2^{-/-}マウスを、PBS又はCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで66日間処置した。処置したマウスに由来する肝臓切片を、胆管上皮マーカーCK19について染色した。PBSで処置したM d r 2^{+/+}マウスに由来する肝臓切片も分析した。

【0070】

図3に示されているように、M d r 2^{-/-}マウスは、M d r 2^{+/+}マウスと比較して、CK19染色の増加を示した。PBSで処置したM d r 2^{-/-}マウスと比較して、CK19陽性細胞数の更なる増加が、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで処置したM d r 2^{-/-}マウスに由来する肝臓切片で検出された (図3)。従って、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドは、M d r 2^{-/-}マウスにおいても潜在的に胆管上皮細胞分化を誘導する。

【0071】

実施例3：通常餌を給餌した野生型マウスにおけるCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチド処置の評価。

胆管上皮細胞分化に対するCTNNB1標的化の効果を、野生型マウスでも評価した。CD-1マウスを、対照PBS、10mg/kgのCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチド、又は100mg/kgのCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで6週間にわたって週1回処置した(Q1W×6)。その後、処置動物に由来する肝臓切片を、導管上皮マーカーCK19を認識する抗体で染色した。

図4に示されているように、PBS処置マウスと比較して、10mg/kg又は100mg/kgのCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで処置した野生型マウスに由来する肝臓切片で、CK19陽性細胞数の増加が観察された。こうした結果は、CTNNB1 mRNAのRNA標的化が、野生型マウスにおいて潜在的に胆管上皮細胞分化を誘導することを示す。

10

【0072】

実施例4：DDC給餌胆管損傷マウスモデルにおける、胆汁合成に対するCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチド処置の評価

胆汁合成に対するCTNNB1 mRNA標的化の効果を、DDC給餌胆管損傷マウスモデルで特徴付けた。Swiss Webster雌マウスを、3つの処置条件の1つに無作為化した。第1の群では、マウスに对照餌を給餌し、PBSで処置した。第2の群では、マウスに0.1%DDC餌を給餌し、PBSで処置した。第3の群では、マウスに0.1%DDC餌を給餌し、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで処置した。各処置群の肝臓での総胆汁酸濃度(図7A)、胆汁流速(図7B)、及びmRNA発現(図7C)を評価した。特に、CTNNB1、Cyp7a1、Cyp27a、Cyp8B1、及びShp mRNAのレベルを測定した(図7C)。

20

図7Aに示されているように、PBS又はCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドで処置したDDC給餌マウスは、对照餌を給餌したマウスと比較して、より低い胆汁酸濃度を有していた。総胆汁酸濃度が低減される傾向が、DDC給餌マウスのCTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチド処置で観察された。図7Bに示されているように、胆汁流速は、对照餌を給餌したマウスと比較して、DDC給餌マウスで増加した。β-カテニンRNAiオリゴヌクレオチドによる処置は、DDC給餌誘導性胆汁流速増加を部分的に正常化した。顕著には、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドによるDDC給餌マウスの処置は、Cyp7a1及びCyp27aの発現を低減した(図7C)。こうした結果は、胆管損傷マウスモデルにおいて、CTNNB1 RNAiオリゴヌクレオチドが胆汁酸合成を低減することを示す。

30

【0073】

本明細書にて適切に例示的に記載されている本開示は、本明細書で具体的に開示されていない任意の1つ若しくは複数の要素、1つ若しくは複数の限定の非存在下で実施することができる。従って、例えば、本明細書中の各出現において、「含む(comprising)」、「から本質的になる(consisting essentially of)」、及び「からなる(consisting of)」という用語はいずれも、他の2つの用語のいずれかと置き換えることができる。使用されている用語及び表現は、説明のために使用されており、限定のためではない。そのような用語及び表現の使用において、図示及び説明されている特徴又はそれら部分のいかなる均等物も除外する意図はなく、特許請求されている本発明の範囲内で様々な変更が可能であることが認識される。従って、本発明は好ましい実施形態により具体的に開示されているが、当業者であれば、本明細書に開示されている概念の任意選択の特徴、改変、及び変異を実施することができ、そのような改変及び変異は、本明細書及び添付の特許請求の範囲により画定されている本発明の範囲内にあるとみなされることが理解されるべきである。

40

加えて、本発明の特徴又は態様が、マーカッシュ群又は選択肢の他のグループ化として記載されている場合、当業者であれば、本発明は、それによりマーカッシュ群又は他の群

50

の任意の個々のメンバー又はメンバーの部分群としても記載されていることを認識するだろう。

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド又は他の核酸の構造を説明する際に、配列表に示されている配列を参照することができることが認識されるべきである。そのような実施形態では、実際のオリゴヌクレオチド又は他の核酸は、指定の配列と比較して、1つ若しくは複数の代替ヌクレオチド（例えば、DNAヌクレオチドのRNA相当物又はRNAヌクレオチドのDNA相当物）、及び／又は1つ若しくは複数の修飾ヌクレオチド、及び／又は1つ若しくは複数の修飾ヌクレオチド間連結、及び／又は1つ若しくは複数の他の修飾を有していてもよいが、指定の配列と本質的に同じ又は同様の相補性特性を維持する。

10

【0074】

本発明の説明の状況における（特に以下の特許請求の範囲の状況における）用語「a」及び「an」及び「the」及び類似の指示物の使用は、本明細書に別様の指定がない限り又は状況により明らかに矛盾しない限り、単数及び複数の両方を包含すると解釈されるものとする。用語「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」、及び「含有する（containing）」は、別様の記載のない限り、非限定的用語として解釈されるものとする（つまり、「含むが、それに限定されない」ことを意味する）。本明細書中の値の範囲の記載は、本明細書に別様の指定がない限り、その範囲内に入る各個別の値を個々に参照するための簡略的方法としての役割を果たすことが意図されているに過ぎず、各個別の値は、それが個々に本明細書に記載されているかの如く、本明細書に組み込まれる。本明細書に記載されている方法は全て、本明細書に別様の指定がない限り又は状況により明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実施することができる。本明細書で提供されるありとあらゆる例又は例示的文言（例えば、「等」）の使用は、本発明をより良好に説明することが意図されているに過ぎず、別様に特許請求されていない限り、本発明の範囲に限定を課すものではない。本明細書中の文言が、任意の特許請求されていない要素を、本発明の実施に不可欠であるものとして示していると解釈されるべきでない。

20

【0075】

本発明の実施形態が本明細書に記載されている。そうした実施形態の変異は、当業者であれば、上述の説明を読むと明白になる場合がある。

30

本発明者らは、当業者がそのような変異を必要に応じて使用することを予想しており、本発明者らは、本発明が、本明細書に具体的に記載されているものとは別様に実施されることになることを意図している。従って、本発明は、準拠法により許容される、本明細書に添付されている特許請求の範囲に記載されている主題の改変及び均等物を全て含む。更に、それらの全ての考え得る変異における上記に記載の要素の任意の組合せは、本明細書に別様の指定がない限り又は状況により明らかに矛盾しない限り、本発明により包含される。当業者であれば、日常的なものを超える実験作業を使用することなく、本明細書に記載されている本発明の具体的な実施形態の多数の均等物を認識することになるか又は確認することができるだろう。そのような均等物は、以下の特許請求の範囲により包含されることが意図されている。

40

【図 5】

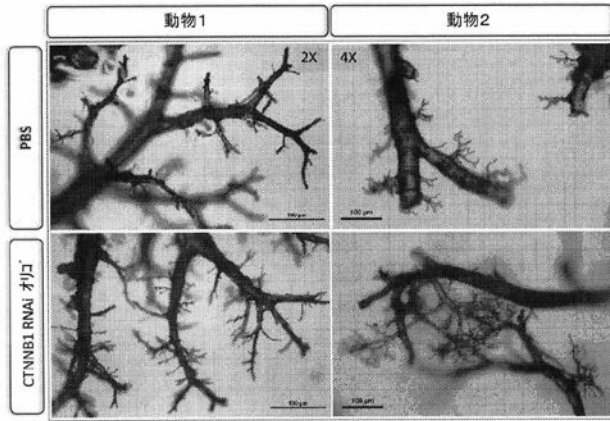


FIG. 5

【図 6】

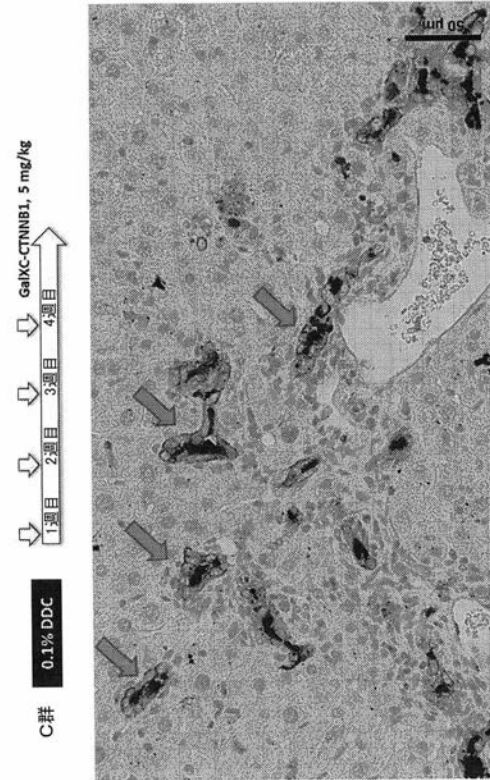


FIG. 6

【図 7 A】

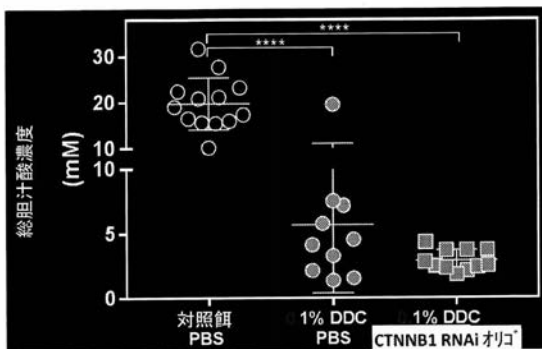


FIG. 7A

【図 7 B】

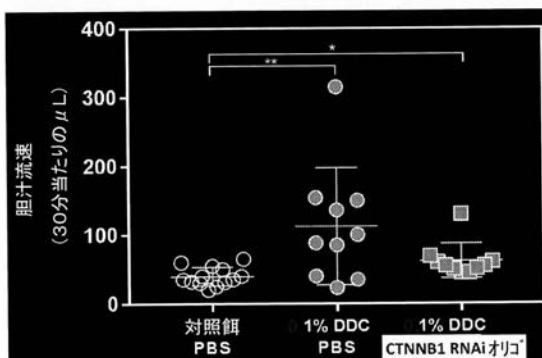


FIG. 7B

【図 7 C】

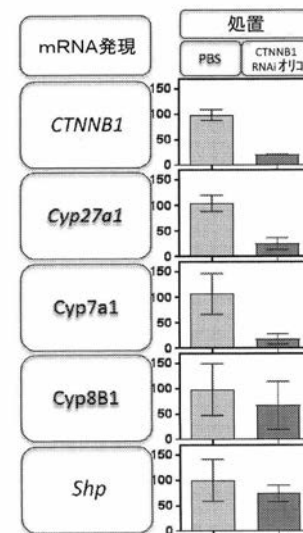


FIG. 7C

【配列表】

2021517909000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. - - - - -

PCT/US 19/18184

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 48/00; C12N 15/11; A61K 9/127; A61K 9/66; C12N 15/00; C07H 21/04 (2019.01)

CPC - A61K 48/00; C12N 15/113; A61K 9/127; A61K 9/08; A61K 9/0019; C12N 15/00; C12N 15/86; C12N 15/867; C12N 15/861; C12N 15/8695; C12N 15/863; C12N 2310/14; C12N 2310/141

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History Document

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

See Search History Document

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

See Search History Document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2013/0109740 A1 (DICERNA PHARMACEUTICALS, INC.) 02 May 2013 (02.05.2013), para [0005], [0043], [0090], [0100], [0124], [0133], [0324], and [0377]	1-3
Y	US 2014/0079680 A1 (ALPINI et al.) 20 March 2014 (20.03.2014), para [0006], [0008], [0068], [0073], [0074], [0077], and [0085]	1-3
A	BOULTER et al., WNT signaling drives cholangiocarcinoma growth and can be pharmacologically inhibited. J Clin Invest. 2015, Vol. 125(3), p. 1269-85. Entire documentation, especially Abstract; pg 1269, col 2, top para; pg 1271, col 2, top para; pg 1279, lower para; and pg 1281, para 2	1-3
A	DELGADO et al., COMPLETE RESPONSE OF CTNNB1-MUTATED TUMORS TO Beta-CATENIN SUPPRESSION BY LOCKED NUCLEIC ANTISENSE IN MOUSE HEPATOCARCINOGENESIS MODEL. J Hepatol. 2015, Vol. 62(2), p.380-387. PDF File: pg 1-20. Entire documentation, especially Abstract	1-3
A	SHEN et al., Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling downregulates P-glycoprotein and reverses multi-drug resistance of cholangiocarcinoma. Cancer Sci. 2013, Vol. 104(10), p. 1303-8. Entire documentation, especially Abstract; pg 1303, col 2, para 3; and pg 1306, col 2, last para and Fig 3	1-3

☐ 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

"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

15 April 2019

Date of mailing of the international search report

14 MAY 2019

Name and mailing address of the ISA/US

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

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US 19/18184

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.: 4-43
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:

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.:

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.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	1 0 1	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K 31/712 (2006.01)	A 6 1 K	31/713		
A 6 1 K 31/7125 (2006.01)	A 6 1 K	31/712		
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K	31/7125		
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	A 6 1 K	47/54		
	C 1 2 N	5/10		

(81)指定国・地域 AP(BW, 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, MC, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信

(74)代理人 100183379
弁理士 藤代 昌彦

(72)発明者 パーセル ナタリー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 2 1 レキシントン ヘイデン アベニュー 3 3

(72)発明者 ライ チェン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 2 1 レキシントン ヘイデン アベニュー 3 3

Fターム(参考) 4B065 AB01 BA01
4C076 AA95 CC16 CC29 CC41 DD67 EE59
4C084 AA13 NA13 NA14 ZA761 ZA762 ZB211 ZB212
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA13 NA14 ZA76 ZB21