

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7066609号**  
**(P7066609)**

(45)発行日 令和4年5月13日(2022.5.13)

(24)登録日 令和4年5月2日(2022.5.2)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 N	5/0793(2010.01)	C 1 2 N	5/0793	Z N A
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	5/0735(2010.01)	C 1 2 N	5/0735	
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)	C 1 2 Q	1/04	

請求項の数 9 (全66頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2018-521433(P2018-521433)	(73)特許権者	591003013
(86)(22)出願日	平成28年11月11日(2016.11.11)		エフ・ホフマン・ラ・ロッシュ・アーゲー
(65)公表番号	特表2019-500851(P2019-500851)		F. HOFFMANN-LA ROCHE
	A)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(43)公表日	平成31年1月17日(2019.1.17)		FT
(86)国際出願番号	PCT/EP2016/077429		スイス・シーエイチ-4070バーゼル
(87)国際公開番号	WO2017/081250		・グレンツアーヘルストラツセ124
(87)国際公開日	平成29年5月18日(2017.5.18)	(74)代理人	100102978
審査請求日	令和1年10月24日(2019.10.24)		弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号	15194367.7	(74)代理人	100102118
(32)優先日	平成27年11月12日(2015.11.12)		弁理士 春名 雅夫
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	100160923
(31)優先権主張番号	16189502.4		弁理士 山口 裕孝
(32)優先日	平成28年9月19日(2016.9.19)	(74)代理人	100119507
	最終頁に続く		弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 瞳長類種に由来する標準化された神経細胞アッセイ

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**

一様に分布した分化神経細胞(NC)の標準化された細胞培養物を2つの瞳長類種から個別に作製するためのインビトロ法であって、第1の瞳長類種がヒト(ホモ・サピエンス)であり、かつ第2の瞳長類種がカニクイザル(マカカ・ファシキュラリス)であり、以下を含む\_方法：

(a) 神経前駆細胞(NPC)を用意する工程であって、前記NPCが人工多能性幹細胞(IPS C)に由来する、工程；

(b) NPCを神経細胞(NC)に分化させる工程であって、以下を含む、工程：

(i) Shh、FGF8およびアスコルビン酸リン酸エステルを含む基本培地で細胞を5~10日間にわたって培養した後、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リン酸エステルを含む基本培地で細胞をさらに15日~35日間にわたって培養する工程；

約20日~約45日の分化後に、分化NCをその支持体から解離する工程；および

(ii) 前記細胞を適切な細胞培養フォーマットで再播種し、約4日~約15日にわたって、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸を補足した基本培地で細胞を培養することによって、NCの分化を継続する工程であって、前記細胞が96ウェルプレートまたは384ウェルプレートに再播種される、工程。

**【請求項2】**

工程(b)(i)が、細胞剥離溶液で細胞を解離することを含む、請求項1記載の方法。

**【請求項3】**

細胞剥離溶液がAccutaseである、請求項2記載の方法。

【請求項4】

分化NCが、細胞核染色で評価した場合に、細胞培養エリア上に本質的に一様に分布している、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

薬物候補の毒性のインビトロ試験のための、請求項1～4のいずれか一項に従って得られた細胞培養物の使用。

【請求項6】

薬物候補の有効性のインビトロ試験のための、請求項1～4のいずれか一項に従って得られた細胞培養物の使用。

10

【請求項7】

さらなる開発のために薬物候補を選択するための、請求項1～4のいずれか一項に従って得られた細胞培養物の使用。

【請求項8】

薬物候補がポリヌクレオチドを含むか、またはポリヌクレオチドの特異的配列を標的とする、請求項5～7のいずれか一項記載の使用のための、請求項1～4のいずれか一項に従つて得られた細胞培養物。

【請求項9】

薬物候補が少なくとも1種類の核酸分子、例えばRNAi作用物質またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、請求項5～7のいずれか一項記載の使用のための、請求項1～4のいずれか一項に従つて得られた細胞培養物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

この特許出願は、例えば薬物候補のハイスループットスクリーニングに適した、標準化されたロバストな神経細胞培養アッセイを靈長類種から作るための方法に関する。本方法は、ヒトおよび/または非ヒト靈長類の神経前駆細胞（NPC）を神経細胞（NC）に分化させる工程、ならびに分化NCに対して行われる解離および再播種工程に基づいて一様なNC培養物を作製することで、特にアンチセンスオリゴヌクレオチドをスクリーニングするための、ハイスループット薬物スクリーニングアッセイに適したロバストな培養物をもたらす工程を含む。

30

【背景技術】

【0002】

発明の背景

中枢神経系（CNS）の疾患を含むさまざまな疾患の病態生理を呈する多様な細胞タイプまたは細胞培養モデルに基づくハイスループットスクリーニングアッセイは、開発の初期に薬物候補の有効性プロファイルおよび毒性プロファイルを評価するために、広く使用されている。限られたタイプの細胞への制約または胚性幹細胞に由来する細胞への制約は、体細胞から多能性細胞を生成させるプロトコールの確立により、過去十年間で克服された。

山中ら（Takahashi, K. & Yamanaka, S. Cell. 2006; 126:663-676（非特許文献1））が体細胞を人工多能性幹細胞（iPSC）へとリプログラムできることを実証して以来、さまざまな細胞供給源から多能性細胞を生成させることができた。線維芽細胞、ケラチノサイト、脂肪細胞および血球を含む、異なるタイプの体細胞がiPSC多能性状態へとリプログラムされている。さらに最近になって、特別な体細胞タイプを、ニューロンなどの全く異なる体細胞タイプへと分化転換することができた。Vierbuchenらは、3つの決定的な遺伝子：Mash1、Brn2およびMyt1lの形質導入による、機能的ニューロンへのマウス線維芽細胞の直接変換を実証した（Vierbuchen et al. Nature. 2010; 463:1035-41（非特許文献2））。注目すべきことに、US2010/0021437（特許文献1）には、線維芽細胞から人工多能性幹細胞を作製し、それらの細胞をNPCに分化誘導するための方法が開示

40

50

されている。さらに最近になって、NPCへの分化体細胞の直接変換が記載されている（W02012/022725（特許文献2））。そのような神経細胞は、さまざまなCNS疾患の病態生理をモデル化するための貴重なツールであると考えられる。

#### 【0003】

NPCは複能性幹細胞であり、特別な条件下で増殖する。NPCは単層接着培養物として成長するか、非接着細胞培養プレート中で浮遊ニューロスフェアとして成長することができる。これら2タイプのNPC培養物（ニューロスフェア、接着培養物）は、完全に相互変換可能であると思われる。NPCは無限に成長させることができ、依然として真に複能性のままであることができる。特殊な条件では、NPCは、成人脳を構成する神経細胞タイプ（分化NCを含む）に分化する。分化NC培養物は、効果的で安全な薬物をスクリーニングするための貴重な疾患モデルである。事実、薬物開発の場において薬物候補の毒性および有効性を評価するために、NC培養物は重要である。

10

#### 【0004】

薬物候補は、ヒト患者に初めて投与されるまでに、まずインビトロ細胞培養系において、次に齧歯類および非ヒト靈長類（NHP）種でのインビボ試験において、十分に評価される必要がある。現在、新規薬物候補の毒性評価および有効性評価は、異なる種に異なるプロトコールを使用して、異なるアッセイフォーマットで行われている。薬物候補のインビトロ試験は、薬物試験のために犠牲にされる実験動物の数を減らすことを可能にするが、結果をインビトロからインビボへ、そしてヒト生理へ変換できるかという課題も提起した。事実、齧歯類種からヒトへ薬物候補の有効性プロファイルおよび毒性プロファイルを変換する能力は、種と種の間の遺伝的関連が近くないことから、難題になりうる。注目すべきことに、マウスゲノムおよびヒトゲノムのタンパク質コーディング領域は約85%同一である。遺伝子構成の相違は、薬物に対する生理学的反応が異なる理由、および毒素または突然変異原に対する耐性が異なる理由になりうる。現在、種と種の間で変換する能力は、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、または遺伝子もしくは遺伝子産物の遺伝子変異体のように、特定のDNA配列もしくはRNA配列をターゲットとする新規薬物クラスでは、その重要性を増している。それゆえに、遺伝的関連性の近さ（>90%）という観点から見て、ヒトにおける奏効率および有害事象率を予測するための有効性データおよび毒性データを生成させるには、NHP種が最も意味のあるモデル系になる。理論に束縛されることは望まないが、最初のヒト治験に先だって行われるNHP種、例えばカニクイザルにおけるインビボ試験は、どの薬物クラスにとっても好ましいものの、所定のヒト遺伝子構成を標的とする薬物クラスにとっては、とりわけ好ましいと考えられる。その反面、創薬におけるNHP種の使用は、依然として、物議を醸す問題である。NHP種が遺伝学的にヒトに近いというまさにその事実が、倫理的問題を生じさせる。それゆえに、カニクイザルなどのNHP実験動物の数は、可能な限り減らすべきである。

20

#### 【0005】

したがって、新規薬物候補の有効性スクリーニングおよび毒性スクリーニングのための理解しやすい仕組みは、NHP種でのインビトロ試験およびインビボ試験の両方、ならびにIPSC由来ヒト細胞を使った並行インビトロ試験を含むべきである。この試験シーケンスは、カニクイザルなどのNHP種におけるインビボ試験に先だつ、NHP種細胞とヒト細胞の両方における並行インビトロ試験を含むべきである。有効性プロファイルおよび/または毒性プロファイルがよくない薬物候補は、NHP種におけるインビボ試験を開始する前に、NHP細胞および/またはヒト細胞でのインビトロ評価後の初期段階で、もはや除外されるべきである。事実、このシーケンスは、NHP実験動物の数が可能な限り低く保たれうることを保証する。

30

#### 【0006】

しかしながら、そのような靈長類種間で移行可能な有効性データおよび毒性データを幹細胞由来分化NCからインビトロで得るには、侮りがたいハードル、すなわち第1に、種特異的な細胞培養プロトコールおよび靈長類種間で細胞培養条件を移行できること、そして第2に、分化中のNPCの不均一な分布（これは、細胞の局所濃度ならびにオートクリンお

40

50

よりパラクリンシグナリングゆえに、最適でない生存条件または分化効果の妨害につながり、それが、薬物効果の表現型評価を困難にする)がある。これは、細胞の所望の分化状態を得るために長期間にわたって培養物を分化させる必要がある場合に、最も顕著になる。最も注目すべきことに、分化霊長類NCは細胞培養条件に対して本質的に感受性であり、苛酷な処理には耐性がなく、それが、これらの細胞で標準化されたアッセイを作製する際についてまわる障害である。

#### 【0007】

したがって、ヒトを含む異なる霊長類種から一様なNCアッセイを実現するための、容易に利用することができて再現性のある技術が、今も必要とされている。

#### 【先行技術文献】

10

#### 【特許文献】

#### 【0008】

#### 【文献】US2010/0021437

WO2012/022725

#### 【非特許文献】

#### 【0009】

#### 【文献】Takahashi, K. & Yamanaka, S. Cell. 2006; 126:663-676

Vierbuchen et al. Nature. 2010; 463:1035-41

#### 【発明の概要】

#### 【0010】

20

本明細書に、一様に分布した分化神経細胞(NC)の標準化された細胞培養物を異なる霊長類種から作製するためのインビトロ法が提供され、該方法は、以下を含む：

(a) 神経前駆細胞(NPC)を用意する工程；

(b) NPCをNCに分化させる工程であって、以下を含む、工程：

(i) 約20日～約45日の分化後に、分化NCをその支持体から解離する工程；および

(ii) 前記細胞を適切な細胞培養フォーマットで再播種し、約4日～約15日にわたってNCの分化を継続する工程。

#### 【0011】

一態様において、霊長類種は、ヒト(ホモ・サピエンス(Homo sapiens))、カニクイザル(マカカ・ファシキュラリス(Macaca fascicularis))およびアカゲザル(マカカ・ムラタ(Macaca mulatta))からなる群より選択される。

30

#### 【0012】

一態様において、霊長類種は、ヒト(ホモ・サピエンス)およびカニクイザル(マカカ・ファシキュラリス)からなる群より選択される。

#### 【0013】

一態様において、分化NCの標準化された細胞培養物は、2つの霊長類種について個別に作製され、第1の霊長類種はヒト(ホモ・サピエンス)であり、第2の霊長類種はカニクイザル(マカカ・ファシキュラリス)である。

#### 【0014】

一態様において、NPCは人工多能性幹細胞(IPSC)に由来する。

40

#### 【0015】

一態様において、工程(b)は、Shh、FGF8、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リン酸エステルからなる群より選択される1種類または複数種類の分化作用物質と共にNPCを培養することを含む。

#### 【0016】

一態様において、工程(b)(i)は、Shh、FGF8およびアスコルビン酸リン酸エステルを含む基本培地内で細胞を約5～約10日間にわたって培養した後、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リン酸エステルを含む基本培地内で細胞をさらに約15日～約35日間にわたって培養してから、分化NCをその支持体から解離することを含む。

#### 【0017】

50

一態様において、基本培地中の前記1種類または複数種類の分化作用物質の濃度は、Shhについて50～500ng/ml、FGF8について25～250ng/ml、BDNFについて1～50ng/ml、GDNFについて1～50ng/ml、cAMPについて0.1～10mM、アスコルビン酸リン酸エステルについて20～200μMである。

【0018】

一態様において、基本培地中の前記1種類または複数種類の分化作用物質の濃度は、Shhについて200ng/ml、FGF8について100ng/ml、BDNFについて20ng/ml、GDNFについて10ng/ml、cAMPについて0.5mM、アスコルビン酸リン酸エステルについて100μMである。

【0019】

一態様において、Shh、FGF8およびアスコルビン酸リン酸エステルとの培養期間は約7日であり、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リン酸エステルとの培養期間は約20～約40日である。

10

【0020】

一態様において、NPCはラミニン521支持体上に用意される。

【0021】

一態様において、工程(b)(i)は、細胞剥離溶液で細胞を解離することを含む。

【0022】

一態様において、細胞剥離溶液はAccutaseである。

【0023】

一態様において、工程(b)(ii)は、ラミニン521支持体上に200000細胞/cm<sup>2</sup>で細胞を再播種することを含む。

20

【0024】

一態様において、細胞は96ウェルプレートまたは384ウェルプレートに再播種される。

【0025】

一態様において、工程(b)(ii)はROCK阻害剤の存在下で細胞を再播種することを含む。

【0026】

一態様において、ROCK阻害剤はY-27632である。

【0027】

一態様において、工程(b)(ii)は、細胞を再播種した後に、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸を補足した基本培地中で細胞を培養することにより、分化を継続することを含む。

30

【0028】

一態様において、分化NCはMAP2を発現する。

【0029】

一態様において、分化NCはMAP2陽性神経突起を含む。

【0030】

一態様において、NPCはニューロン障害を持つ個体に由来する。

【0031】

一態様において、NPCは、健常個体に由来する。

40

【0032】

一態様において、細胞培養物は異なる種について逐次的に作製される。

【0033】

一態様において、細胞は、細胞核染色で評価した場合に、細胞培養エリア上に本質的に一様に分布している。

【0034】

一態様において、細胞の分布は、DNA染色、特にヘキスト(Hoechst)染色によって評価される。

【0035】

50

一態様では、本明細書に記載する方法によって得られる細胞培養系が提供される。

【 0 0 3 6 】

一態様では、薬物候補の毒性のインビトロ試験のための、本明細書記載の方法によって得られる細胞培養物の使用が提供される。

【 0 0 3 7 】

一態様では、薬物候補の有効性のインビトロ試験のための、本明細書記載の方法によって得られる細胞培養物の使用が提供される。

【 0 0 3 8 】

一態様では、ニューロン障害を持つ個体由来の細胞培養物および健常個体由来の細胞培養物において有効性が試験される、薬物候補の有効性のインビトロ試験のための、本明細書記載の方法によって得られる細胞培養物の使用が提供される。 10

【 0 0 3 9 】

一態様では、薬物候補を選択するための、特に、さらなる開発のために薬物候補を選択するための、本明細書記載の方法によって得られる細胞培養物の使用が提供される。

【 0 0 4 0 】

一態様では、薬物候補がポリヌクレオチドを含むか、またはポリヌクレオチドの特異的配列を標的とする、本明細書記載の使用のための細胞培養物が提供される。

【 0 0 4 1 】

一態様では、薬物候補が少なくとも1種類の核酸分子、例えばRNAi作用物質またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、本明細書記載の使用のための細胞培養物が提供される。 20

【 0 0 4 2 】

一態様では、核酸分子が、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸(ANA)、2'-フルオロ-ANA、およびLNAヌクレオシドからなる群より独立して選択される1つまたは複数の2'糖修飾ヌクレオシドを含む、本明細書記載の使用のための細胞培養物が提供される。

【 0 0 4 3 】

一態様では、前記1つまたは複数の2'糖修飾ヌクレオシドがLNAヌクレオシドである、本明細書記載の使用のための細胞培養物が提供される。

【 0 0 4 4 】

一態様では、LNAヌクレオシドが、ベータ-D-オキシ-LNA、アルファ-L-オキシ-LNA、ベータ-D-アミノ-LNA、アルファ-L-アミノ-LNA、ベータ-D-チオ-LNA、アルファ-L-チオ-LNA、(S)cET、(R)cET、ベータ-D-ENAまたはアルファ-L-ENAから選択される、本明細書記載の使用のための細胞培養物が提供される。 30

【 0 0 4 5 】

一態様では、核酸分子が少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間連結を含む、本明細書記載の使用のための細胞培養物が提供される。

【 0 0 4 6 】

一態様では、連続したヌクレオチド配列内のヌクレオシド間連結がホスホロチオエートヌクレオシド間連結である、本明細書記載の使用のための細胞培養物が提供される。 40

【 0 0 4 7 】

一態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドがRNase Hを動員する能力を有する、本明細書記載の使用のための細胞培養物が提供される。

【 0 0 4 8 】

一態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドがギャップマーである、本明細書記載の使用のための細胞培養物が提供される。

【 0 0 4 9 】

一態様では、オリゴヌクレオチドが式5'-F-G-F'-3'のギャップマーであり、領域FおよびF'は、独立して1~7個の修飾ヌクレオシドを含み、Gは、RNaseHを動員する能力を有する6~16ヌクレオシドの領域である、本明細書記載の使用のための細胞培養物が提供される。 50

**【 0 0 5 0 】**

一態様において、本質的に、本明細書に記載するとおりである、方法および使用、が提供される。

**[本発明1001]**

一様に分布した分化神経系細胞（NC）の標準化された細胞培養物を異なる霊長類種から作製するためのインビトロ法であって、以下を含む方法：

(a) 神経前駆細胞（NPC）を用意する工程：

(b) NPCを神経系細胞（NC）に分化させる工程であって、以下を含む、工程：

(i) 約20日～約45日の分化後に、分化NCをその支持体から解離する工程；および

(ii) 前記細胞を適切な細胞培養フォーマットで再播種し、約4日～約15日にわたってNCの分化を継続する工程。

10

**[本発明1002]**

霊長類種が、ヒト（ホモ・サピエンス（Homo sapiens））、カニクイザル（マカカ・ファシキュラリス（Macaca fascicularis））およびアカゲザル（マカカ・ムラタ（Macaca mulatta））からなる群より選択される、本発明1001の方法。

**[本発明1003]**

分化NCの標準化された細胞培養物が2つの霊長類種について個別に作製され、第1の霊長類種がヒト（ホモ・サピエンス）であり、第2の霊長類種がカニクイザル（マカカ・ファシキュラリス）である、本発明1001の方法。

**[本発明1004]**

NPCが人工多能性幹細胞（IPSC）に由来する、本発明1001～1003のいずれかの方法。

20

**[本発明1005]**

工程（b）（i）が、Shh、FGF8およびアスコルビン酸リノ酸エステルを含む基本培地中で細胞を約5～約10日間にわたって培養した後、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リノ酸エステルを含む基本培地中で細胞をさらに約15日～約35日間にわたって培養してから、分化NCをその支持体から解離することを含む、本発明1001～1004のいずれかの方法。

**[本発明1006]**

工程（b）（i）が、細胞剥離溶液で細胞を解離することを含む、本発明1001～1005のいずれかの方法。

30

**[本発明1007]**

細胞剥離溶液がAccutaseである、本発明1006の方法。

**[本発明1008]**

前記細胞が96ウェルプレートまたは384ウェルプレートに再播種される、本発明1001～1007のいずれかの方法。

**[本発明1009]**

工程（b）（ii）が、前記細胞を再播種した後に、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸を補足した基本培地中で細胞を培養することによって、分化を継続することを含む、本発明1001～1008のいずれかの方法。

**[本発明1010]**

分化NCが、細胞核染色で評価した場合に、細胞培養エリア上に本質的に一様に分布している、本発明1001～1009のいずれかの方法。

40

**[本発明1011]**

薬物候補の毒性のインビトロ試験のための、本発明1001～1010のいずれかに従って得られた細胞培養物の使用。

**[本発明1012]**

薬物候補の有効性のインビトロ試験のための、本発明1001～1010のいずれかに従って得られた細胞培養物の使用。

**[本発明1013]**

薬物候補を選択するための、特に、さらなる開発のために薬物候補を選択するための、

50

本発明1001～1010のいずれかに従って得られた細胞培養物の使用。

[本発明1014]

薬物候補がオリゴヌクレオチドを含むか、またはオリゴヌクレオチドの特異的配列を標的とする、本発明1011～1013のいずれかの使用のための細胞培養物。

[本発明1015]

薬物候補が少なくとも1種類の核酸分子、例えばRNAi作用物質またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、本発明1011～1013のいずれかの使用のための細胞培養物。

[本発明1016]

本質的に、本明細書に記載するとおりである、方法および使用。

**【図面の簡単な説明】**

10

**【0051】**

(図1) 上側の鎖は、SNHG14転写産物(UBE3A-ATS)のうち、SNORD109B下流の領域を図解しており、黒いボックスは試験したマウスオリゴヌクレオチドの位置を示している。下側の鎖は、UBE3Aコーディング領域を図解しており、黒いボックスはエクソンを示している。エクソン1は160kb付近に位置する。オリゴヌクレオチドは、エクソン9(約97kbに位置する)。エクソン10(約92kbに位置する)、エクソン13(約77kbに位置する)、およびエクソン16の5'端(約60kbに位置する)のアンチセンス領域に配置されている。

(図2) 実施例2で試験したオリゴヌクレオチドの、ヒト神経細胞培養物におけるUBE3Aの再発現を誘発する能力を図示している。ヒトSNHG14長鎖ノンコーディングRNAのうち、SNORD109BとUBE3Aコーディング領域上流の領域との間に位置する領域(SEQ ID NO:1の位置1～55318)に相補的なオリゴヌクレオチドは、

20

●

非オーバーラップで示されている。UBE3AプレmRNAに対してアンチセンスであるヒトSNHG14長鎖ノンコーディングRNAの領域(SEQ ID NO:1の位置55319～141053)に相補的なオリゴヌクレオチドは、

▲

オーバーラップで示されている。ヒトおよびアカゲザルに保存されている表3のオリゴヌクレオチドは、各プロットの下に

30



で示されている。ヒト:アカゲザル:マウス間での保存は



で示されている。オリゴヌクレオチド濃度は、各プロットの右側に示されているとおり、0.2、1および5 μMであった。

(図3) ヒトで薬物有効性を評価する前に、まず靈長類インビトロ細胞培養モデルで、次に靈長類種でのインビオ研究で、薬物候補の有効性を評価するための、スクリーニング戦略の模式図。カニクイザルとヒトのIPSC由来ニューロンを、UBE3Aアンチセンスを標的とするオリゴヌクレオチドのターゲット・エンゲージメントおよび有効性を評価するためのインビトロモデルとして使用する。インビオ研究に先だって、好ましい有効性プロファイルを持つ候補に優先順位を付ける。

40

(図4) カニクイザルIPSCから神経系始原細胞を誘導するために実行されるさまざまな工程の概観。靈長類IPSC株の神経化には二重SMAD阻害プロトコールの変法を使用する。MTはMT培地を指し、N2B27 + SB + LDNはSB-431542およびLDN-193189を補足したN2B27培地を指し、N2B27 + FEBはFGF、EGFおよびBDNFを補足したN2B27培地を指す。

(図5) カニクイザルおよびヒトの神経系前駆体は、Sox2およびネスチンに関して陽性のよく似た染色、およびMap2に関して陽性の各分化ニューロン染色を呈する。

50

(図6) 適用された定方向分化方法は、同等な、異種間でのニューロン分化を誘発する。(図5A) カニクイザルiPSCを、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リン酸エステル(BGAA)を補足した基本培地中で、14日間分化させた。カニクイザルiPSCおよび14日目のNCからRNAを単離し、表示したマーカーの発現をqPCRによって分析した。データをハウスキーピング遺伝子GAPDHに対応させて正規化し、カニクイザルiPSCにおける発現レベルとの比として表す。(図5B)ヒトPSCと、BGAAを補足した基本培地中で14日にわたって分化させたヒトNCとから、RNAを単離し、表示したマーカーの発現をRNAシーケンシングによって分析した。データをRPKM値として表す。(図5C)ヒトPSCと、BGAAを補足した基本培地中で14日間分化させたヒトNCとから、RNAを単離し、表示したマーカーの発現をqPCRによって分析した。データをハウスキーピング遺伝子GAPDHに対応させて正規化し、ヒトPSCにおける発現レベルとの比として表す。(図5D) BGAAを補足した基本培地中で14日間分化させたカニクイザルNC(左パネル)およびヒトNC(右パネル)からRNAを単離し、UBE3A転写産物およびUBE3A-ATS転写産物の発現をqPCRによって分析した。左パネル:データをハウスキーピング遺伝子TBPに対応させて正規化し、カニクイザルiPSCとの比として表す。右パネル:データをハウスキーピング遺伝子GAPDHに対応させて正規化し、ヒトPSCとの比として表す。

(図7) 化合物スクリーニングに適する、カニクイザル神経系前駆体からロバストなニューロン培養物を得るための4つの分化方法(A~D)を比較するための実験レイアウトの模式的描写。MIは有糸分裂阻害剤を指す。

(図8) 図7に記載する4つのニューロン分化方法の画像ベースの比較。分化の35日目にNCを固定し、マゼンタで描写されるSox2(グリアおよびNSCのマーカー)および緑色で描写されるMap2(NCのマーカー)について染色した。

(図9) ヒトiPSC由来分化NCの解離および再播種の実行可能性を試験するために、2つの細胞株を並行して分化させた。それぞれについて、細胞を6週間にわたって直接(すなわち再プレーティングなしで)分化させるか、21日目に解離し、再播種してから、さらに3週間にわたって培養した。ニューロンマーカー(MAP2)およびグリアマーカー(GFAP)に関する免疫蛍光染色は、解離および再播種(再プレーティング)が、細胞の分化能を妨害しないことを示している。

(図10) 解離および再播種(再プレーティング)ありならびになしでの、2つの異なるiPSC由来細胞株における分化の程度の定量。HuC/Dは、ニューロンによって発現されるマーカーであり、これを、合計6週にわたって分化させた培養物において、免疫蛍光染色によって検出し、ハイコンテントイメージングによって定量した。このデータは、再プレーティングがニューロン分化の程度を有意に変化させないことを示している。

(図11) 微小管関連タンパク質タウおよびそのリン酸化型のうちの2つの発現を分析した。2つの細胞株における発現およびリン酸化の程度が再プレーティングの有無によって変化しないことは、再プレーティング(解離および再播種)がヒトiPSC由来NCの細胞骨格特徴を破壊しないことを証明しており、生理学的特徴はNCを解離し再播種することによって改変されないことが示唆される。

(図12) ハイスループットフォーマットにおけるスクリーニングのためのロバストな靈長類ニューロン培養物の安定的な供給を可能にするワークフローの模式的図解。SFAは、Shh、FGF8およびアスコルビン酸リン酸エステルを補足した基本培地を指し、BGAAは、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リン酸エステルを補足した基本培地を指し、矢印は解離および再播種(再プレーティング)を表す。

(図13) ヒトおよびカニクイザルに由来する一様に分布した神経系細胞(NC)の標準化された細胞培養物での、試験した化合物のターゲット・エンゲージメント。ヒトでのターゲット・エンゲージメントが知られているUBE3Aアンチセンス転写産物(アンチセンス)に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを、2つの濃度(低: 0.02 μM; 高: 2 μM)で試験した。AおよびBにおけるカニクイザルに由来するNC培養物は、CおよびDにおけるヒトに由来するNC培養物と比較して同等なターゲット・エンゲージメントを呈する。カニクイザルNCおよびヒトNCを表示の濃度で処理すると、UBE3A転写産物(センス)のアップ

レギュレーションを伴って、UBE3Aアンチセンス転写産物の低減が起こる。細胞培養物は図12に含まれるワークフローに従って作製した。

【発明を実施するための形態】

【0052】

詳細な説明

本明細書において使用される用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、標的核酸にハイブリダイズすることによって、特に標的核酸上の連続した配列にハイブリダイズすることによって、標的遺伝子の発現を調節する能力を有するオリゴヌクレオチドと定義される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは本質的に二本鎖ではなく、それゆえにsiRNAではない。好ましくは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは一本鎖である。

10

【0053】

本明細書において使用される場合、用語「基本培地」は、 $1 \times$  B27 (Gibco, Invitrogen)、 $1 \times$  N2 (Gibco, Invitrogen)、 $0.1 \text{ mM}$  ベータ-メルカプトエタノール (Gibco, Invitrogen) を補足した等体積のDMEM:F12 Glutamax培地およびNeurobasal培地 (Gibco, Invitrogen) で構成される合成培地を指す。用語「BGAA」は、 $20 \text{ ng/ml}$  BDNF (Peprotech)、 $10 \text{ ng/ml}$  GDNF (Peprotech)、 $0.5 \text{ mM}$  cAMP (BIOLOG Life Science)、および $100 \mu \text{M}$  アスコルビン酸リン酸エステル (Sigma) を補足した基本培地を指す。用語「SFA」は、 $200 \text{ ng/ml}$  Shh、 $100 \text{ ng/ml}$  FGF8 および $100 \mu \text{M}$  アスコルビン酸リン酸エステルを補足した基本培地を指す。

20

【0054】

本明細書において使用される用語「連続したヌクレオチド配列」は、標的核酸に相補的なオリゴヌクレオチドの領域を指す。この用語は、本明細書においては、用語「連続した核酸塩基配列」および用語「オリゴヌクレオチドモチーフ配列」と可換的に使用される。いくつかの態様では、オリゴヌクレオチドのヌクレオチドがすべて、連続したヌクレオチド配列中に存在する。いくつかの態様では、オリゴヌクレオチドが連続したヌクレオチド配列を含み、任意で、さらなるヌクレオチド、例えば連続したヌクレオチド配列に機能性基を取り付けるために使用することができるヌクレオチドリンクー領域を含みうる。ヌクレオチドリンクー領域は標的核酸に相補的であっても相補的でなくてもよい。

【0055】

本明細書において使用される場合、用語「合成培地」または「既知組成培地」は、個々の構成成分とそれぞれの濃度とがすべてわかっている細胞培養培地を指す。合成培地は、既知組成の組換え構成成分を含有しうる。

30

【0056】

本明細書において使用される場合、用語「分化する」および「分化」は、分化度の低い細胞を分化度の高い細胞、特に分裂終了後の組織特異的細胞タイプに変換するための、例えばNPCをNCに変換するための、1つまたは複数の工程を指す。NCへのNPCの分化は、とりわけ、細胞培養培地に1種または数種の分化作用物質を加えることによって、誘発することができる。

【0057】

本明細書において使用される場合、用語「有効性プロファイル」または「有効性」は、当業者に広く理解されているとおり、薬物候補への、特に異なる濃度および/または異なる投与経路での、試験系、例えば細胞培養物または生物の曝露と、それに続く、薬物候補の所望の効果と相關する、結果として生じる細胞効果および/または生理学的効果の決定とにに基づく、薬物候補の有効性の評価を含むと定義される。細胞効果および/または生理学的効果を決定するためのパラメータは、各薬物候補との関連において定義され、試験系または生物に対する薬物候補の所望の表現型効果と相關するパラメータを含む。好ましくは、薬物候補の有効性プロファイルを確立するために、限定するわけではないが、生存、細胞生存能力、形態、特別な遺伝子の発現および/または発現レベル、ならびにタンパク質合成を含む、2つ以上のパラメータが記録される。本発明の一局面において、有効性プロファイルを確立する工程は、ターゲット・エンゲージメントを評価する工程を含む。

40

50

**【 0 0 5 8 】**

「発現マーカー」または「マーカー」は、細胞タイプのアイデンティティを決定するために使用することができる。ある特定の、細胞特異的遺伝子のうちの情報価値があるDNA配列は、mRNAに転写され、通常は続いて、細胞中である特定の機能を発揮するタンパク質（その遺伝子産物）へと翻訳される。マーカーの発現は、当技術分野において公知の方法により、RNAレベルまたはタンパク質レベルで検出し、定量することができる。iPSC細胞マーカーは当技術分野において公知であり、TRA-1-60、TRA-1-81、Ecat1、Nanog、Oct4/POU5F1、Sox2、Rex1/Zfp-42およびUTF1、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。NPC細胞マーカーは当技術分野において公知であり、Sox2、ネスチン、Sox1、Pax6、Dach1が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。NC細胞マーカーは当技術分野において公知であり、MAP2、-III-チユーブリン、DCX/ダブルコルチン、SYN1/シナプシン1およびGPHN/ゲフィリンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

10

**【 0 0 5 9 】**

本明細書において使用される場合、用語「遺伝的距離」は、2つの種、2つのゲノムまたは2つの集団間の遺伝的多様性の尺度と理解されるものとする。遺伝的距離は、例えば異なる種間であれば、当技術分野において公知の方法によって、例えば限定するわけではないが、Neiの標準遺伝的距離、Goldstein距離またはRynolds/Weir/Cockerhamの遺伝的距離を決定することなどによって、決定することができる。遺伝的距離は、当技術分野公知のソフトウェア、例えば限定するわけではないが、POPTREE2またはDISPANなどによって計算することができる。遺伝的距離が小さい場合、「遺伝的類似性」は高い。

20

**【 0 0 6 0 】**

本明細書では以下の略号が使用される。線維芽細胞成長因子（FGF）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、上皮成長因子（EGF）、ソニックヘッジホッグ（shh）、線維芽細胞成長因子8（FGF8）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、環状アデノシン一リン酸（cAMP）、Rho関連コイルドコイル形成タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ（ROCK）。

**【 0 0 6 1 】**

本明細書において使用される場合、用語「成長因子」は、細胞増殖を引き起こす生物学的に活性なポリペプチドまたは小分子化合物を意味し、成長因子とそれらの類似体との両方を包含する。

30

**【 0 0 6 2 】**

本明細書にいう「ハイスループットスクリーニング」は、本明細書に記載する新規アッセイを使用して、比較的多数の異なる疾患モデル条件および/または化学的化合物を分析し、比較できることを表すと理解されるものとする。典型的には、そのようなハイスループットスクリーニングは、マルチウェルマイクロタイタープレート、例えば96ウェルプレートまたは384ウェルプレートまたは1536ウェルもしくは3456ウェルのプレートで行われる。

**【 0 0 6 3 】**

「LNAヌクレオシド」は、ヌクレオチドのリボース糖環のC2' と C4' の間にリンカー基（ピラジカルまたはブリッジという）を含む修飾ヌクレオシドである。これらのヌクレオシドは、文献では架橋核酸または二環式核酸（BNA）とも呼ばれている。

40

**【 0 0 6 4 】**

本明細書において使用される場合、用語「一様に分布した」、「一様な分布」または「均一な分布」は、当業者に広く理解されているとおり、一次元空間、二次元空間、または多次元空間における実体の分布、特に、細胞培養支持体の二次元表面での細胞の分布を指す。単位面積あたりの平均細胞数が全細胞培養表面の全体にわたって本質的に不变であるなら、二次元細胞培養表面上で一様な分布が確立される。細胞の分布は、例えば核染色を行い、蛍光顕微鏡を使用して単位面積あたりの細胞核の数を決定することによって、評価することができる。不均一な細胞分布の指標には、例えば細胞塊、有意な数のオーバーラッ

50

とした細胞核、または細胞培養エリアの有意な部分が細胞を欠くことが含まれる。細胞が一様に分布している1つまたは複数の細胞タイプの細胞培養物を、本明細書では「標準化された」という。「標準化された細胞培養物」または「標準化されたNC培養物」は、本発明に従って作製された細胞培養物を指し、ここでは、細胞の分布が本質的に一様であり、すなわち細胞が一様に分布しており、細胞培養物は一様な分布を特徴とし、細胞培養物は、1つまたは複数の細胞タイプを含みうる。したがって、例えば核染色を行い、単位面積あたりの細胞核の数を決定することによって評価した場合に、細胞が均一な分布を呈するのであれば、細胞培養物は標準化されているとみなされる。

#### 【 0 0 6 5 】

本明細書において使用される用語「修飾ヌクレオシド間連結」は、当業者に広く理解されているとあり、2つのヌクレオシドを共有結合で互いにカップリングする、ホスホジエステル(PO)連結以外の連結と定義される。修飾ヌクレオシド間連結を持つヌクレオチドも「修飾ヌクレオチド」と呼ばれる。修飾ヌクレオシド間連結は、ホスホジエステル連結と比較して、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を増加させる。天然オリゴヌクレオチドの場合、ヌクレオシド間連結は、隣接ヌクレオシド間にホスホジエステル結合を作り出すリン酸基を含む。修飾ヌクレオシド間連結は、インビボ使用のためにオリゴヌクレオチドを安定化するのにとりわけ有用であり、修飾ヌクレオシドの領域内ののみならず、本発明のオリゴヌクレオチド中のDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドの領域において、例えばギャップマーオリゴヌクレオチドのギャップ領域内で、ヌクレアーゼ切断から保護するのにも役立つ。

10

#### 【 0 0 6 6 】

本明細書において使用される場合、用語「MT培地」は、2.5 mM GlutaMAX(商標)、7 μg/mlインスリン、450 μMモノチオグリセロール、1×脂質濃縮物、5 mg/ml BSA、14 ng/ml亜セレン酸ナトリウム、1×非必須アミノ酸、2 mg/mlヘパリン、15 μg/mlトランスフェリン、および220 μMアスコルビン酸-2-リン酸を含む、ハムのF12栄養混合物を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM/F12)を含有する合成培地を指す。

20

#### 【 0 0 6 7 】

本明細書にいう「神経前駆細胞」または「NPC」は、IPSCに由来し、例えばネスチンを含むいくつかの神経系始原細胞マーカーを発現する、複能性細胞のサブセットを指す。NPCは、とりわけ、参照によりそのまま本明細書に組み入れられるCosta et al. Cell Rep 2016; 15:86-95およびDunkley et al. Proteomics Clin Appl 2015; 7-8:684-94に記載の方法に従って、または本明細書に記載の方法に従って、作製することができる。NPCは無限に拡大培養することができ、ニューロンまたはグリア細胞(例えばアストロサイトおよびオリゴデンドロサイト)に分化しうる。用語「患者特異的NPC」は、患者の体細胞からリプログラムされた患者IPSCから得られるNPCを指す。本明細書にいう「健常個体から得たNPC」は、見たところ健康であって何らかの障害または疾患を患っている疑いのない個体の体細胞から得られたIPSCから分化したNPCを指す。

30

#### 【 0 0 6 8 】

本明細書にいう「神経細胞」または「NC」は、ニューロン系譜由来の組織特異的細胞を指す。NCは、特別な細胞培養条件を使用して、例えば、本明細書に記載するように、成長因子の退薬によって、または1つもしくは複数の分化作用物質の添加によって、NPCからインビトロで分化させることができる。

40

#### 【 0 0 6 9 】

本明細書において使用される用語「非ヒト靈長類」または「NHP」は、ホモ・サピエンスを除く、靈長類目に属する種を指す。特に、本発明において開示される方法でのNHP種としては、チンパンジー(*Pan troglodytes*)、ボノボ(*Pan paniscus*)、シロテナガザル(*Hylobates lar*)、ゴリラ(*Gorilla gorilla*)、スマトラオランウータン(*Pongo abelii*)、ボルネオオランウータン(*Pongo pygmaeus*)、ブルーモンキー(*Cercopithecus mitis*)、ブラッザモンキー(*Cercopithicus neglectus*)、サバンナザル(*Chlorocebus aethiops*)、ミドリザル(*Chlorocebus sabaeus*)、アビシニアコロブス(*Colobus*

50

obus guereza)、ロフォセブス・アテリム (*Lophocebus aterrimus*)、ベニガオザル (*Macaca arctoides*)、アッサムモンキー (*Macaca assamensis*)、マカカ・ファシキュラリス (カニクイザル)、ニホンザル (*Macaca fuscata*)、マカカ・ムラタ (アカゲザル)、ブタオザル (*Macaca nemestrina*)、シシオザル (*Macaca silenus*)、ドリル (*Mandrillus leucophaeus*)、マンドリル (*Mandrillus sphinx*)、チベットモンキー (*Macaca thibetana*)、アヌビスヒビ (*Papio anubis*)、キイロヒビ (*Papio cynocephalus*)、マントヒビ (*Papio hamadryas*)、ギニアヒビ (*Papio papio*)、チャクマヒビ (*Papio ursinus*)、ハヌマンラングール (*Presbytis entellus*)、ゲラダヒビ (*Theropithecus gelada*)、アオタス・アザレ (*Aotus azarae*)、アオタス・ナンシマエ (*Aotus nancymaae*)、アオタス・ニグリセプス (*Aotus nigriceps*)、ヨザル (*Aotus trivirgatus*)、アオタス・ボシフェランス (*Aotus vociferans*)、ケナガクモザル (*Ateles belzebuth*)、ブラウンクモザル (*Ateles fusciceps*)、コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*)、ダスキーティティ (*Callicebus moloch*)、ピグミーマーモセット (*Cebuella pygmaea*)、フサオマキザル (*Cebus apella*)、ゴールデンライオンタマリン (*Leontopithecus rosalia*)、シロガオサキ (*Pithecia pithecia*)、セマダラタマリン (*Saguinus fuscicollis*)、ジョフロイタマリン (*Saguinus geoffroyi*)、シロクチタマリン (*Saguinus labiatus*)、クチヒゲタマリン (*Saguinus mystax*)、ワタボウシタマリン (*Saguinus Oedipus*) およびリスザル (*Saimiri sciureus*) が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

## 【0070】

本明細書において使用される用語「cyno」はカニクイザルの略号であり、かつ/またはカニクイザルに由来する材料、例えば限定するわけではないが、細胞、組織、器官、血液またはそれに由来する細胞を指す。

## 【0071】

「ヌクレオチド」は、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドのビルディングブロックであり、本明細書の目的には天然ヌクレオチドと非天然ヌクレオチドの両方を包含する。自然界において、DNAヌクレオチドおよびRNAヌクレオチドなどのヌクレオチドは、リボース糖部分、核酸塩基部分および1つまたは複数のリン酸基（これはヌクレオシドには存在しない）を含む。ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、可換的に、「単位」または「モノマー」ということもできる。

## 【0072】

本明細書において使用される場合、用語「ヒトゲノムに由来するヌクレオチド配列」は、各ヌクレオチド配列がヒトゲノムリファレンスに由来すること、すなわち世界人口の少なくとも部分集団がゲノム中に各ヌクレオチド配列を含むことを意味する。さらにまた、本明細書において使用される用語「ヒトゲノムに由来するヌクレオチド配列」は、NCBI/Bl astデータベースおよびアルゴリズムを使用して最も高い最大スコアでヒトゲノムに割り当てられた配列に使用される (Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000) 「A greedy algorithm for aligning DNA sequences」 J Comput Biol 2000;7 (1-2) :203-14)。理論に束縛されることは望まないが、クエリ配列がヒトゲノムに由来するのであれば、クエリ配列のアラインメントスコアは、非ヒトリファレンス配列と比較して、ヒトリファレンス配列の場合の方が高いと考えられる。

## 【0073】

本明細書において使用される用語「修飾ヌクレオシド」または「ヌクレオシド修飾」は、糖部分または（核酸）塩基部分への1つまたは複数の修飾の導入により、等価なDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドと比較して修飾されているヌクレオシドを指す。好ましい一態様において、修飾ヌクレオシドは修飾糖部分を含む。修飾ヌクレオシドという用語は、本明細書では、用語「ヌクレオシド類似体」または修飾「単位」または修飾「モノマー」と可換的に使用することもできる。

## 【0074】

用語「修飾ヌクレオシド間連結」は、当業者に広く理解されているとおり、2つのヌクレ

10

20

30

40

50

オシドを共有結合で互いにカップリングする、ホスホジエステル(PO)連結以外の連結と定義される。修飾ヌクレオシド間連結を持つヌクレオチドも「修飾ヌクレオチド」と呼ばれる。いくつかの態様において、修飾ヌクレオシド間連結は、ホスホジエステル連結と比較して、オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性を増加させる。天然オリゴヌクレオチドの場合、ヌクレオシド間連結は、隣接ヌクレオシド間にホスホジエステル結合を作り出すリン酸基を含む。修飾ヌクレオシド間連結は、インビボ使用のためにオリゴヌクレオチドを安定化するのにとりわけ有用であり、修飾ヌクレオシドの領域内のみならず、本発明のオリゴヌクレオチド中のDNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドの領域において、例えばギャップマーオリゴヌクレオチドのギャップ領域内で、ヌクレアーゼ切断から保護するのにも役立つ。

10

#### 【0075】

本明細書において使用される場合、用語「N2B27」は、N2およびB27(どちらもGibco, Invitrogen製)を補足した等体積のDMEM:F12(Gibco, Invitrogen)で構成される合成培地を指す。

#### 【0076】

本明細書において使用される用語「オリゴヌクレオチド」は、当業者に広く理解されているとおり、共有結合で連結された2つ以上のヌクレオシドを含む分子と定義される。共有結合されたそのようなヌクレオシドは核酸分子またはオリゴマーともいうことができる。オリゴヌクレオチドは、一般に、固相化学合成とそれに続く精製とによって作られる。オリゴヌクレオチドの配列に言及する場合は、共有結合で連結されたヌクレオチドまたはヌクレオシドの核酸塩基部分またはその修飾の配列または順序に言及する。オリゴヌクレオチドは、1つまたは複数の修飾ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオチドを含みうる。本明細書において使用される用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、標的核酸にハイブリダイズすることによって、特に標的核酸上の連続した配列にハイブリダイズすることによって、標的遺伝子の発現を調節する能力を有するオリゴヌクレオチドと定義される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは本質的に二本鎖ではなく、それゆえにsiRNAではない。好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは一本鎖である。

20

#### 【0077】

本明細書において使用される場合、用語「リプログラミング」は、体細胞を分化度の低い細胞に変換するのに必要な、例えば線維芽細胞、脂肪細胞、ケラチノサイトまたは白血球をNPCに変換するための、1つまたは複数の工程を指す。「リプログラムされた」細胞とは、本明細書に記載するように体細胞をリプログラムすることによって誘導された細胞をいう。

30

#### 【0078】

本明細書において使用される用語「小分子」または「小化合物」または「小分子化合物」は、一般に10,000グラム/モル未満の分子量、任意で5,000グラム/モル未満、任意で2,000グラム/モル未満の分子量を有する、合成されたまたは自然界に見いだされる、有機分子または無機分子を指す。

#### 【0079】

本明細書において使用される用語「体細胞」は、生殖細胞系細胞(例えば精子および卵子、生物がそこから作られる細胞(ガメトサイト))ならびに未分化幹細胞ではない、生物の身体を形成する任意の細胞を指す。

40

#### 【0080】

本明細書において使用される用語「幹細胞」は、自己複製能および分化能を有する細胞を指す。本明細書にいう「未分化幹細胞」は、分化を起こしていない幹細胞を指す。本明細書にいう「多能性幹細胞」または「PSC」は、3つの胚葉(内胚葉、外胚葉、中胚葉)ならびに生殖細胞系の細胞タイプを生じることができる幹細胞を指す。多能性幹細胞(PSC)には、「胚性幹細胞」(「ESC」)および「人工多能性幹細胞」(「iPSC」)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。用語「hIPSC」および「cIPSC」は、それぞれヒト細胞に由来するIPSCおよびカニクイザル細胞に由来するIPSCを指す。

50

**【 0 0 8 1 】**

本明細書において使用される場合、用語「細胞生存能力の実質的喪失」は、所定のプロセスにおける相異なる細胞培養条件の適用または細胞の操作後に起こる、特に細胞培養支持体からの細胞の解離との関連における、細胞生存能力の低減を指す。一態様において、細胞生存能力の実質的喪失とは、細胞の5%超が生存不可能になりかつ/またはアポトーシスを起こすことを意味する。さらなる態様において、細胞生存能力の実質的喪失とは、10%超、15%超、20%超、または25%超の細胞が生存不可能になりかつ/またはアポトーシスを起こすことを意味する。したがって、一態様において、用語「本質的に生存可能なままである」という用語は、95%超の細胞が生存可能なままであることを意味する。さらなる態様において、本質的に生存可能なままであるとは、90%超、85%超、80%超または75%超の細胞が生存可能なままであることを意味する。

10

**【 0 0 8 2 】**

本明細書にいう「適切な分化用培地」は、「分化培地」ともいい、NCへのNPCの分化に有用な任意の既知組成培地を指す。本明細書に記載の分化培地は少なくとも1つの「分化作用物質」を含有する。分化作用物質としては、細胞分化を引き起こす生物学的に活性なポリペプチドまたは小分子化合物が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

**【 0 0 8 3 】**

「標的」とは、調節することが望まれるタンパク質を指す。「標的核酸」は、本発明のオリゴヌクレオチドがそこにハイブリダイズする、意図した標的であり、例えば遺伝子、RNA、ノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、mRNA、およびプレmRNA、成熟mRNAまたはcDNA配列でありうる。いくつかの態様において、標的核酸はノンコーディングRNAもしくは長鎖ノンコーディングRNAまたはそれらの部分配列である。特定のインビオまたはインピトロ応用の場合、本発明のオリゴヌクレオチドは、SNORD10B下流のSNHG14転写産物のレベルを減少させ、それによって、意図した標的細胞における父性UBE3A転写産物の抑制を軽減する能力を有する。本発明のオリゴヌクレオチドの核酸塩基の連続した配列は、オリゴヌクレオチドの長さにわたって測定した場合に、任意で1つまたは2つのミスマッチを例外として、また任意でオリゴヌクレオチドをコンジュゲートなどの随意の機能性基に連結しうるヌクレオチドベースのリンカー領域を除いて、標的核酸に相補的である。本オリゴヌクレオチドは、標的核酸分子の部分配列に相補的な、または標的核酸分子の部分配列にハイブリダイズする、連続したヌクレオチド配列を含む。

20

**【 0 0 8 4 】**

本明細書において使用される用語「標的配列」は、本発明のオリゴヌクレオチドに相補的な核酸塩基配列を含む、標的核酸中に存在するヌクレオチドの配列を指す。いくつかの態様において、標的配列は、本発明のオリゴヌクレオチドの連続したヌクレオチド配列に相補的な、標的核酸上の領域からなる。いくつかの態様において、標的配列は、單一オリゴヌクレオチドの相補的配列よりも長く、例えば数個の本発明のオリゴヌクレオチドの標的となりうる核酸配列の好ましい領域に相当しうる。本発明のオリゴヌクレオチドは、標的配列などの標的核酸に相補的な連続したヌクレオチド配列を含む。本オリゴヌクレオチドは、標的核酸分子中に存在する標的配列に相補的なまたはハイブリダイズする少なくとも8ヌクレオチドの連続したヌクレオチド配列を含む。連続したヌクレオチド配列（それゆえに標的配列）は、少なくとも8個の連続したヌクレオチド、例えば9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個の連続したヌクレオチド、例えば12～25個、例えば14～18個の連続したヌクレオチドを含む。

40

**【 0 0 8 5 】**

本明細書において使用される用語「標的細胞」は、標的核酸を発現している細胞を指す。いくつかの態様において、標的細胞はインビオまたはインピトロでありうる。いくつかの態様において、標的細胞は、哺乳動物細胞、例えば齧歯類細胞、例えばマウス細胞もしくはラット細胞、または靈長類細胞、例えばサル細胞もしくはヒト細胞である。一態様において、標的細胞は神経細胞（NC）である。

50

## 【0086】

本明細書において使用される場合、用語「毒性プロファイル」または「毒性」は、当技術分野において広く理解されているとおり、潜在的有害または非有害物質への、特に異なる濃度および/または異なる投与経路での、試験系、例えば細胞培養物または生物の曝露と、それに続く、結果として生じる細胞効果および/または生理学的效果、例えば細胞の生存または健康状態の決定とに基づく、潜在的有害または非有害物質の毒生物学的評価を含むと定義される。細胞効果および/または生理学的效果を決定するためのパラメータは当技術分野において周知であって、生存、細胞生存能力、形態、ある特定の遺伝子の発現および/または発現レベル、ならびにタンパク質合成を含むが、それらに限定されるわけではない。好ましくは、毒性未知の物質の毒性プロファイルを確立するために、2つ以上のパラメータが記録される。薬物候補の毒性プロファイルは、当技術分野では、例えば靈長類またはヒトでのインビトロ試験など、さらなる開発のための薬物候補を選択するために使用される。

10

## 【0087】

本発明は、薬物候補のインビトロハイスループット試験に使用することができる、再現性のある標準化された分化NC培養物を、ヒトを含む異なる靈長類種から作製するための新規方法を提供する。本方法は、靈長類NPCを用意する工程、NPCをNCに分化させる工程、および分化靈長類NCを解離し、細胞生存能力の有意な喪失を伴うことなく、適切な細胞培養フォーマットで細胞を再播種し、NCの分化を続けることによって、薬物候補のハイスループットスクリーニングを行う能力を細胞培養物に与える工程を含む。靈長類NPCは、IPSCまたは分化転換細胞に由来することができ、どちらも体細胞から生成させることができる。好ましくは、該体細胞はヒト体細胞を含む靈長類細胞である。

20

## 【0088】

一態様において、一様に分布した分化神経細胞（NC）の細胞培養物を異なる靈長類種から作製するためのインビトロ法が提供され、該方法は、以下の工程を含む：

- (a) 神経前駆細胞（NPC）を用意する工程、ならびに
- (b) 以下を含む、NPCをNCに分化させる工程：
  - (i) 分化の20日目と45日目との間に分化NCをその支持体から解離させる工程、および
  - (ii) 細胞を適切な細胞培養フォーマットで再播種し、4～15日にわたってNCの分化を継続する工程。

30

## 【0089】

本明細書に記載する本発明の方法を達成するために、NC培養物の既存の制約の一部を回避する必要があった。接着培養または浮遊培養のいずれかとして無限に拡大培養することができるNPCとは対照的に、分化中のNCが、通常は細胞培養プレートの生体高分子コーティングからなるマトリックスとの相互作用に決定的に依存することは、広く受け入れられている。さらにまた、分化NCは細胞ストレスに敏感になり、それゆえに分化細胞の継代は、該細胞にとって有害であるとみなされている。本発明の画期的方法は、異なる靈長類種から一様なNC培養物を作製することができる細胞培養条件を開示し、ここでは、分化の10日目と40日目との間にNCが、生存能力の実質的喪失を伴わずに、その支持体から解離される。NCは、適切な細胞培養フォーマットで再播種し、分化を継続することができる。解離および再播種は、細胞培養エリア上に分化NCの均一な分布をもたらす。さらにまた、本発明の方法は、NC分化の後期において細胞培養フォーマットを変えることを可能にする。さらなる態様において、工程(b)(i)は、分化のおよそ25日目とおよそ40日目との間、およそ28日目とおよそ30日目との間、およそ28日目またはおよそ30日目に、分化NCをその支持体から解離する工程を含む。

40

## 【0090】

したがって、本発明の一局面は、一様な分化NC培養物を作製するための、本明細書に記載する方法である。一態様において、工程(b)は、(i)分化の20日目と45日目との間に分化NCをその支持体から解離する工程、および(ii)細胞を適切な細胞培養フォーマットで再播種し、4～10日にわたってNCの分化を継続する工程を含み、NCは本質的に生存可能なままである、NPCを神経系細胞（NC）に分化させる工程を含む。該解離および再播種

50

工程は、細胞培養ウェルなどの細胞培養表面のエリアにわたって分化霊長類NCの一樣な分布を得るため、および/または生存能力の実質的喪失を伴わずに分化霊長類NCを収集するために、重要である。結果として、本発明によって作製される分化霊長類NC培養アッセイは、解離および再播種なしで作製された細胞培養物と比較して、より均等に分布した細胞を呈し、ハイスループットアッセイにより適している。重要なことに、細胞培養フォーマットは、NC分化の後期において変化させることができる。これは、最終培養フォーマットを初期の時点で使用する必要がある当技術分野の方法とは対照的である。事実、細胞培養フォーマットを変えうることは、調達面でかなりの融通性を可能にする。

#### 【0091】

この再現性の高い霊長類NCの細胞培養物は十分に標準化されており、限定するわけではないが薬物候補のインビトロ有効性評価などといった化合物スクリーニングアッセイに使用することができる。さらにまた、本明細書に記載する細胞培養物は、薬物候補を選択するために、特に本明細書に記載するようにさらなる開発のための薬物候補を選択するために、使用することもできる。一態様において、本発明の細胞培養物は、本明細書に記載するように、薬物候補のインビトロ有効性プロファイルを決定するために使用される。さらなる一態様では、本明細書に記載するように、インビトロ有効性プロファイルの決定に先だって、薬物候補のインビトロ有効性プロファイルが決定される。さらなる一態様において、本発明の細胞培養物は、本明細書に記載するように薬物候補のインビトロ毒性プロファイルを決定するために使用される。

10

#### 【0092】

したがって一態様では、分化霊長類NCを細胞培養容器から解離するが、この際、NCは本質的に生存可能なままである。解離したNCは、所与の細胞培養アッセイの必要性に合わせて最適化された細胞密度で、所望の細胞培養フォーマットで再播種することができる。一態様において、本発明において記載する解離および再播種条件は、異なる霊長類種に適用することができる。一態様において、本発明の方法は、薬物候補の有効性プロファイルの種間比較に使用することができ、ここで、細胞培養物は、少なくとも2つの種の細胞から個別に作製され、すべての種についての培養に本質的に同じ条件が適用され、有効性プロファイルは、すべての種について決定されて比較される。本質的に同じ細胞培養条件を使用して、少なくとも1つの霊長類種、少なくとも2つの霊長類種、または少なくとも3つの霊長類種に由来する標準化された細胞培養アッセイを作製し、少なくとも1つの薬物候補の包括的有効性プロファイルを決定するために、アッセイリードアウトによって決定される結果を比較し、統合することは、本発明の範囲内である。

20

#### 【0093】

一態様では、リプログラムされた体細胞に由来するIPSCから、NPCを作製する。IPSCへの体細胞のリプログラミングは、IPSC特性の維持に関する特別な遺伝子を導入することによって、達成することができる。IPSCへの体細胞のリプログラミングに適した遺伝子として、Oct4、Sox2、Klf4およびC-Mycならびにそれらの組み合わせが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。一態様では、リプログラミングのための遺伝子は、Oct4、Sox2、Klf4およびC-Mycである。

30

#### 【0094】

体細胞をNPCに分化転換するための遺伝子の組み合わせは、参照により本明細書に包含されるWO2012/022725に記載されている。

40

#### 【0095】

内臓、皮膚、骨、血液および結合組織はすべて体細胞で構成されている。IPSCを作製するために使用される体細胞は、例えば線維芽細胞、脂肪細胞およびケラチノサイトであるが、それらに限定されるわけではなく、皮膚生検から得ることができる。他の適切な体細胞は、血液試料から得られる白血球、赤芽球細胞、または血液もしくは尿試料から得られる上皮細胞もしくは他の細胞であり、これらは当技術分野において公知の方法より、本明細書に記載するように、IPSCにリプログラムされる。体細胞は健常個体または罹患個体から得ることができる。本明細書に記載するリプログラミングのための遺伝子は、当技術分野

50

において公知の方法により、リプログラミングベクターによる細胞への送達によって、または小分子による該遺伝子の活性化によって、体細胞中に導入される。リプログラミングのための方法は、とりわけ、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、プラスミドおよびトランスポゾン、マイクロRNA、小分子、修飾RNAおよび組換えタンパク質を含む。一態様では、本明細書に記載する遺伝子を送達するために、レンチウイルスが使用される。別の一態様では、Oct4、Sox2、Klf4およびC-Mycが、センダイウイルス粒子を使用して体細胞に送達される。加えて、体細胞を少なくとも1つの小分子の存在下で培養することができる。一態様において、該小分子は、プロテインキナーゼのRho関連コイルドコイル形成タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ(ROCK)ファミリーの阻害剤を含む。ROCK阻害剤の非限定的な例には、ファスジル(1-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジン)、チアゾビピン(N-ベンジル-2-(ピリミジン-4-イルアミノ)チアゾール-4-カルボキサミド)およびY-27632((+)-(R)-trans-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロ-ヘキサンカルボキサミド二塩酸塩)などがある。結果として生じるIPSCはNPCに分化するように誘導することができる。一態様では、NPCに分化するようにIPSCを誘導する。

#### 【0096】

一態様では、二重SMAD阻害によってIPSCから靈長類NPCを作製する。一態様では、細胞をSB-431542(Calbiochem)およびLDN-193189(Calbiochem)と接触させることによって、IPSCからNPCを作製する。一特定態様では、細胞を5ng/ml FGF(Peprotech)、10μM SB-431542(Calbiochem)および100nM LDN-193189(Calbiochem)と接触させることによって、IPSCからNPCを作製する。結果として生じた靈長類NPCは、FGF、EGFおよびBDNFを補足した基本培地中で拡大培養することができる。一態様では、10ng/ml FGF(Peprotech)、10ng/ml EGF(RnD)、および20ng/ml BDNF(Peprotech)を補足した基本培地中でNPCを拡大培養する。FGF、EGFおよびBDNFを補足した基本培地における継代の継続は、安定神経系始原細胞株(NPC株)をもたらす。安定NPC株は、その自己複製能ならびに発生段階特異的マーカーSox2およびネスチンの発現によって定義される。したがって、一態様において、靈長類NPCはSox2およびネスチンを発現する。

#### 【0097】

NPCの増殖を高めるために、成長因子類を補足した無血清培地を含む拡大培地中で細胞を成長させる。一態様において、該成長因子は、FGF、BDNFおよびEGFを含む。したがって一態様において、本方法は、工程(a)の細胞をNPCの増殖に適した条件下で、例えば単位面積あたりの細胞が所定の数に達するまで、インキュベートする工程を、さらに含む。拡大培地の非限定的な例は本明細書に記載する。一態様では、10~50ng/ml FGF、10~50ng/ml EGFおよび1~20ng/ml BDNFが拡大培地に補足される。一特定態様において、NPC拡大培地は、10ng/ml FGF2、10ng/ml EGFおよび20ng/ml BDNFを補足した基本培地である。NPCは、量的には無制限に作製することができるので、多数のアッセイプレートを必要とするハイスループット細胞培養アッセイに最も適している。培養することは当業者の能力内である。

#### 【0098】

一態様では、分化を開始させる前に、死細胞をすべて除去するために、靈長類NPCを適切な緩衝液または培地で洗浄する。好ましくは、細胞培養プロトコールの各工程間で培地を変える。例えば、培地を吸引によって、または細胞を遠心分離して上清を捨てることによって除去した後、後続工程において使用する培地を細胞に加える。一態様では、後続工程の培地を加える前に、死細胞をすべて除去し、先の工程において適用した培地または成長因子もしくはサイトカインの残留分をすべて除去するために、適切な緩衝液または培地で細胞を洗浄する。細胞の洗浄に有用な緩衝液または培地は当技術分野において公知である。細胞を洗浄するための適切な緩衝液の一例はリン酸緩衝食塩水(PBS)である。

#### 【0099】

一態様では、靈長類NPC培養物が約5000細胞/cm<sup>2</sup>~約100000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で用意

10

20

30

40

50

される。さらなる態様では、靈長類NPC培養物が約10000細胞/cm<sup>2</sup>～約50000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で用意される。一態様では、接着靈長類NPC培養物が約20000細胞/cm<sup>2</sup>～約40000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で用意される。一態様では、接着靈長類NPC培養物が約30000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で用意される。一態様では、接着靈長類NPC培養物がラミニン521支持体上に用意される。

#### 【0100】

一態様では、当技術分野において公知の方法によって本明細書に記載するように得られる靈長類NPCは、次の工程において、細胞をShh(ソニックヘッジホッグ)、FGF8(線維芽細胞成長因子8)およびアスコルビン酸リン酸エステルと接触させることにより、NCに分化するように誘導される。一態様では、NPCを、Shh、FGF8およびアスコルビン酸リン酸エステルを含む本明細書に記載する既知組成培地と共にインキュベートする。一態様では、50～1000ng/ml Shh、25～500ng/ml FGF8および20～200μMアスコルビン酸リン酸エステルが培地に補足される。さらなる態様では、細胞を、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約8日、約9日または約10日にわたって、Shh、FGF8およびアスコルビン酸リン酸エステルと接触させる。さらなる一態様では、細胞を、約5日～約10日にわたって、Shh、FGF8およびアスコルビン酸リン酸エステルと接触させる。一特定態様では、200ng/ml Shh、100ng/ml FGF8および100μMアスコルビン酸リン酸エステルを補足した基本培地中で、約7日にわたって、靈長類NPCを培養する。

10

#### 【0101】

一態様では、ニューロン分化の誘導後に、約10000細胞/cm<sup>2</sup>～約80000細胞/cm<sup>2</sup>、約20000細胞/cm<sup>2</sup>～約70000細胞/cm<sup>2</sup>、約30000細胞/cm<sup>2</sup>～約60000細胞/cm<sup>2</sup>、または約40000細胞/cm<sup>2</sup>～約50000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で、細胞を再プレーティングする。一特定態様では、ニューロン分化の誘導後に、約45000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で、細胞を再プレーティングする。

20

#### 【0102】

一態様では、ニューロン分化するように誘導された細胞を、次の工程では、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リン酸エステルを補足した基本培地中で、さらに約15日、さらに約16日、さらに約17日、さらに約18日、さらに約19日、さらに約20日、さらに約21日、さらに約22日、さらに約23日、さらに約24日、さらに約25日、さらに約26日、さらに約27日、さらに約28日、さらに約29日、さらに約30日、さらに約31日、さらに約32日、さらに約33日、さらに約34日、またはさらに約35日にわたって、分化させる。一特定態様では、20ng/ml BDNF(Peprotech)、10ng/ml GDNF(Peprotech)、0.5mM cAMP(BIOLLOG Life Science)、および100μMアスコルビン酸リン酸エステル(Sigma)を補足した基本培地中で、さらに約19日～約35日にわたって細胞を培養する。

30

#### 【0103】

一態様において、本発明によれば、分化NCをその支持体から解離し、本明細書に記載するように適切な細胞培養フォーマットで再播種する。さらなる態様では、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸を補足した基本培地中で、少なくとも約10日、少なくとも約11日、少なくとも約12日、少なくとも約13日、少なくとも約14日、少なくとも約15日、少なくとも約16日、少なくとも約17日、少なくとも約18日、少なくとも約19日、少なくとも約20日、少なくとも約21日、少なくとも約22日、少なくとも約23日、少なくとも約24日、少なくとも約25日、少なくとも約26日、少なくとも約27日、または少なくとも約28日にわたって、NCを分化させてから、解離し、適切な細胞培養アッセイフォーマットで再播種する。さらなる態様では、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸を補足した基本培地中で、約15～約30日、約20～約25日、約21～約23日にわたって、靈長類NCを分化させてから、解離し、適切な細胞培養アッセイフォーマットで再播種する。

40

#### 【0104】

本発明の一局面では、本明細書に記載する方法によって得られた分化NCを細胞培養基質から解離するが、細胞生存能力の実質的喪失は起こらない。したがって、一態様では、細胞

50

生存能力の実質的相違を伴うことなく分化NCが収集される。細胞数は、当技術分野において使用されている従来の方法に従って、例えば限定するわけではないが、血球計数器における細胞数の計数によって、またはフローサイトメトリーを使用して、決定することができる。細胞生存能力は、従来の方法に従って、例えば限定するわけではないが、トリパンブルー染色およびエリスロシンB染色によって、決定することができる。解離後に、NCに基づく所望のアッセイの特別な必要性または実験パラメータに応じて、適切な細胞培養ウェルに適切な細胞密度で細胞を再播種することができる。

#### 【 0 1 0 5 】

したがって一態様では、細胞剥離溶液を利用して細胞培養表面から分化NCを分離する。一態様では、分化NCをその支持体から解離し、適切な細胞培養フォーマットで再播種する。さらなる一態様では、分化のおよそ20日目とおよそ45日目との間に、分化NCをその支持体から解離する。分化の日数は、例えばShh、FGF8およびアスコルビン酸リン酸エステルと共にインキュベートする分化の開始日から数え、その場合は、Shh、FGF8およびアスコルビン酸を添加した日を0日目と数える。さらなる態様では、およそ15日目とおよそ50日目との間、およそ28日目とおよそ30日目との間、分化のおよそ25日目、分化のおよそ26日目、分化のおよそ27日目、分化のおよそ28日目、分化のおよそ29日目、分化のおよそ30日目、分化のおよそ31日目、分化のおよそ32日目、分化のおよそ33日目、または分化のおよそ34日目に分化NCをその支持体から解離する。一態様では、細胞を細胞剥離溶液と共にインキュベートすることによって、分化NCをその支持体から解離する。一態様において、細胞剥離溶液はAccutaseである。Accutaseは、タンパク質分解活性およびコラーゲン分解活性を持つ海洋由来の酵素である。一態様では、細胞剥離溶液を分化NC培養物に加え、1～5分、2～4分、優先的には3分にわたってインキュベートする。このインキュベーション時間の完了後に、Accutase溶液を培地、特に基本培地で希釈する。再播種前に、Accutase含有培地を除去し、本明細書に記載するように成長因子を補足した新鮮な基本培地を補充する。

#### 【 0 1 0 6 】

剥離後に、霊長類NCは、例えば細胞培養ウェルなどの新しい細胞培養格納器に、適切なプレートフォーマットで再播種することができる。NCは、低密度、中密度および高密度を含む、任意の所望の密度で再播種することができる。したがって、一様に分布した分化NCの培養物は、低密度、中密度および高密度を含む所定かつ所望の密度で生成させることができる。これは、細胞密度が培養の初めに固定され、細胞の増殖または細胞死ゆえに細胞密度がやがてはかなり変化しうる従来の細胞培養法とは、対照的である。一態様では、NCを高密度で再播種する。さらなる態様では、NCを、約50000細胞/cm<sup>2</sup>～約500000細胞/cm<sup>2</sup>の密度、約75000細胞/cm<sup>2</sup>～約400000細胞/cm<sup>2</sup>の密度、または約100000細胞/cm<sup>2</sup>～約300000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で再播種する。一特定態様では、工程(b)(ii)において、分化NCを、約200000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で再播種する。一態様では、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リン酸エステルによる分化後に、細胞を解離し、約50000細胞/cm<sup>2</sup>～約500000細胞/cm<sup>2</sup>、約75000細胞/cm<sup>2</sup>～約400000細胞/cm<sup>2</sup>、または約100000細胞/cm<sup>2</sup>～約300000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で再播種する。一特定態様では、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リン酸エステルの分化後に、細胞を解離し、約20000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で再播種する。解離および再播種(再プレーティング)後に、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸を補足した基本培地中で、さらに約1日、さらに約2日、さらに約3日、さらに約4日、さらに約5日、さらに約6日、さらに約7日、さらに約8日、さらに約9日、さらに約10日、さらに約11日、さらに約12日、さらに約13日、さらに約14日、またはさらに約15日にわたって、細胞をさらに分化させる。

#### 【 0 1 0 7 】

解離し再播種した分化NC培養物は、薬物候補の有効性を試験するために、本発明に従って使用することができる。一特定態様では、細胞を、20ng/ml BDNF(Peprotech)、10ng/ml GDNF(Peprotech)、0.5mM cAMP(BIOLOG Life Science)、および100μMアスコルビン酸リン酸エステル(Sigma)を補足した基本培地中で、約7日にわたつ

10

20

30

40

50

てさらに分化させてから、細胞に薬物候補を適用する。したがってNC細胞は、約10日～約50日、約15日～約45日、約30～約40日、約35日または約37日の全分化期間後に、薬物候補をスクリーニングする準備が整う。一特定態様において、NCは、約30～約40日の全分化期間後に、オリゴヌクレオチド候補をスクリーニングする準備が整う。

#### 【0108】

さらなる態様において、分化NC培養物は、約28日、約29日、約30日、約31日、約32日、約33日、約34日、約35日、約36日、約37日、約38日、約39日、約40日、約41日、約42日、約43日、約44日、約45日、約46日、約47日、約48日、約49日、約50日、約51日、約52日、約53日、約54日、または約55日の全分化期間後に、薬物候補による処理の準備が整う。さらなる一態様において、薬物候補による処理は、本明細書に記載する細胞培養プロトコールの任意の工程において行われる。10

#### 【0109】

一特定態様では、20ng/ml BDNF、10ng/ml GDNF、0.5mM cAMPおよび100μMアスコルビン酸リン酸エステルを含む無血清分化培地で、約21～約23日にわたって靈長類NPCをNCに分化させてから、解離および再播種を行う。さらなる一態様では、本明細書に記載するように再播種した後、分化NCを、本明細書に記載する分化培地と共に、さらに約1日、さらに約2日、さらに約3日、さらに約4日、さらに約5日、さらに約6日、さらに約7日、さらに約8日、さらに約9日、さらに約10日、さらに約11日、さらに約12日、さらに約13日、さらに約14日、またはさらに約15日にわたってインキュベートする。一特定態様では、再播種後に、20ng/ml BDNF、10ng/ml GDNF、0.5mM cAMPおよび100μMアスコルビン酸リン酸エステルを含む無血清分化培地で、約7日にわたって分化NCをインキュベートする。その後、分化NCは、薬物候補による処理の準備が整う。20

#### 【0110】

本発明の一局面では、細胞培養培地に薬物候補を添加する前に、解離し再播種したNCの分化を継続する。したがって、さらなる態様では、再播種されたNCを、本明細書に記載する分化培地で、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約8日、約9日、約10日、約11日、約12日、約13日、約14日、または約15日にわたってインキュベートしてから、薬物候補を加える。さらなる態様において、工程(b)(ii)は、再播種後、薬物候補を加える前に、1～50ng/ml BDNF、1～50ng/ml GDNFおよび0.1～10mM cAMPおよび20～200μMアスコルビン酸リン酸エステルを含む基本培地と共に、さらに約1～約20日、さらに約5～約10日、約7日にわたってNCを分化させる工程を含む。一特定態様では、工程(b)(ii)は、再播種後、薬物候補を加える前に、20ng/ml BDNF、10ng/ml GDNFおよび0.5mM cAMPおよび100μMアスコルビン酸リン酸エステルを含む基本培地と共に、さらに約7日にわたってNCを分化させる工程を含む。30

#### 【0111】

一態様では、分化NCを解離し再播種した後に、薬物候補を細胞培養培地に加える。さらなる態様では、分化NCを再播種した約1日～約15日後、約5日～約10日後、または約7日後に、薬物候補を細胞培養培地に加える。一特定態様では、分化NCを再播種した約7日後に、薬物候補を細胞培養培地に加える。

#### 【0112】

一態様では、本明細書に記載する方法に従って靈長類NPCをNCに分化させる。一態様では、ニューロンの細胞機能および/または代謝機能と関連する発現マーカーにより、ニューロンアイデンティティを評価する。典型的ニューロンマーカーとしてMAP2、HuC/D、ネスチン、-III-チューブリン、DCX/ダブルコルチン、SYN1/シナプシン1およびGPHN/ゲフィリンが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。ニューロンアイデンティティと関連する発現マーカーは、初代ニューロンまたは神経系組織における発現レベルと比較して、NPCに由来するNCでは低レベルに発現する場合がある。NSC由来NCにおけるニューロン発現マーカーの正規化された発現レベルは、初代ニューロンまたは神経系組織における各マーカーの発現レベルと比較して、10000分の1、または1000分の1、または100分の1、または10分の1、または2分の1である場合がある。NPC由来NCと初代ニュー40  
50

ロンとの間でのニューロン発現マーカーの発現レベルの倍率変化は、発現マーカーが異なれば異なりうる。正規化は、所与のマーカーの絶対発現レベルを適切なハウスキーピング遺伝子、例えばGAPDHまたはTBPと関係づけることによって達成することができる。

#### 【 0 1 1 3 】

一態様において、本発明の画期的方法は、ヒト（ホモ・サピエンス）、カニクイザル（マカカ・ファシキュラリス）およびアカゲザル（マカカ・ムラタ）を含むがそれらに限定されるわけではない異なる霊長類種について、均一なNC分布を持つロバストな分化NC培養物を生成させるために使用される。本質的に同じ細胞培養条件をすべての霊長類種に適用することができる。

#### 【 0 1 1 4 】

理論に束縛されることは望まないが、本発明は、NPCおよび分化NCである、多能性幹細胞から完全に分化したNCまでの軸に沿った細胞の2つの異なる段階を識別する。多能性NPCは本明細書に開示するように得ることができ、例えば望ましいフォーマットの細胞培養アッセイのために、任意の適切な細胞数まで拡大培養することができる。健常個体および患者の特異的NPCアリコートは凍結融解することが可能である。したがって、該NPCを適切な細胞数まで拡大培養し、貯蔵のために凍結するか、直接分化させて、本発明のロバストな分化NC培養アッセイを作製することができる。意外なことに、本発明者らは、本願において開示する特別な条件を使用すれば、分化霊長類NCを収集し、固定されたニューロンアイデンティティを持つ細胞の供給源として使用できることを見いだした。分化霊長類NCは、分化の後期において、生存能力の実質的喪失を伴わずに、細胞培養マトリックスから剥離することができる。収集された分化霊長類NCは、所定のアッセイフォーマットで再播種することができ、そこでは、細胞が細胞培養支持体に付着し、試験しようとする薬物候補を適用する前に、またはそれと並行して、分化を継続することができる。本発明の方法は、異なる霊長類種に由来するNC培養物の非一様性という課題を解決する。したがって、本明細書に記載する方法で得られる霊長類NC培養物は、効果的で安全な薬物をスクリーニングするための、およびさまざまな神経系疾患の新しい治療薬を創出するための、有益なモデルである。

#### 【 0 1 1 5 】

したがって、本発明のさらなる一局面において、本発明に従って作製されたNC培養物は、少なくとも1つの薬物候補の有効性を試験するために使用される。薬物候補は、本発明の方法の任意の段階で、細胞培養培地に加えることができる。一態様では、薬物候補を分化NCに加える。一態様では、薬物候補の有効性プロファイルを決定するために、解離し再播種した分化NCに、薬物候補を加える。さらなる態様では、分化のおよそ1日目、およそ2日目、およそ3日目、およそ4日目、およそ5日目、およそ6日目、およそ7日目、およそ8日目、およそ9日目、およそ10日目、およそ11日目、およそ12日目、およそ13日目、およそ14日目、およそ15日目、およそ16日目、およそ17日目、およそ18日目、およそ19日目、およそ20日目、およそ21日目、およそ22日目、およそ23日目、およそ24日目、およそ25日目、およそ26日目、およそ27日目、およそ28日目、およそ29日目、およそ30日目、およそ31日目、およそ32日目、およそ33日目、およそ34日目、およそ35日目、およそ36日目、およそ37日目、およそ38日目、およそ39日目、またはおよそ40日目に、薬物候補を細胞培養培地に加える。

#### 【 0 1 1 6 】

一特定態様において、工程（b）（i）は、このシーケンスにおいて、およそ28日目～およそ30日目の後に、分化NCをその支持体から解離する工程を含み、工程（b）（ii）は、細胞を適切な細胞培養フォーマットで再播種し、NCの分化を約7日にわたって継続し、細胞培養培地に薬物候補を加え、NCの分化をさらに約5日にわたって継続し、薬物候補の有効性プロファイルを評価する工程を含む。

#### 【 0 1 1 7 】

本発明の霊長類NC培養物は一様な細胞分布を特徴とし、それゆえに新規薬物候補の有効性の試験は、端的であり、十分に標準化されている。薬物候補の有効性は、当技術分野公知

10

20

30

40

50

の方法によって、例えば限定するわけではないが、薬物候補の有効性と相關する表現型マークターを測定すること、例えばマークターの発現を測定することによって、決定することができる。一態様において、薬物候補の有効性は、疾患関連マークターの発現を決定することによって試験される。一態様において、薬物候補の有効性は、疾患関連タンパク質の発現を決定することによって試験される。一態様において、薬物候補の有効性は、定量リアルタイムPCRによって関連タンパク質の発現を決定することによって試験される。有効性の決定は、薬物候補の添加後、所定の時点で行われる。さらなる態様において、有効性の決定は、薬物候補の添加後、およそ1日目、およそ2日目、およそ3日目、およそ4日目、およそ5日目、およそ6日目、およそ7日目、およそ8日目、およそ9日目、およそ10日目、およそ11日目、およそ12日目、およそ13日目、またはおよそ14日目に行われる。一特定態様において、工程(b)(ii)は、解離および再播種後、およそ7日目に、薬物候補を細胞培養培地に加える工程、および細胞培養培地への薬物候補の添加後、およそ5日目に、薬物候補の有効性を決定する工程を含む。本発明のロバストで一様な分化NC培養物は、異なる靈長類種について作製することができ、薬物候補の有効性プロファイルを試験するために使用することができる。一態様において、本方法は、靈長類種間での、特にNHP種ヒトとの間での、有効性の種間比較に適している。

#### 【0118】

本発明のさらなる一局面は、本明細書に記載する方法によって得られる一様に分布した分化靈長類NCの使用である。好ましい一態様において、本発明の方法によって得られる分化靈長類NCは、CNS疾患の病態生理を研究するためのインビトロモデルとして使用される。例えば、本発明の方法によって得られる分化靈長類NCは、神経学的疾患を反転させ、阻害し、または防止する化合物のスクリーニングに使用することができる。一態様において、一様に分布した分化靈長類NCは、医薬、例えば糖尿病医薬の神經副作用を反転させ、阻害し、または防止する化合物のスクリーニングに使用される。

#### 【0119】

一態様において、工程(a)～(b)による一様に分布した分化靈長類NCは、小分子、タンパク質、ペプチド、および核酸からなる群より選択される化合物および/または薬物候補のハイスクループットスクリーニングに使用される。さらなる一態様において、本発明の分化NCは、RNAi作用物質またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの核酸分子のハイスクループットスクリーニングに使用される。

#### 【0120】

一特定態様では、さらなる開発のために少なくとも1つの薬物候補を選択するためのインビトロ法であって、以下を含む方法が提供される：

一様に分布した分化ニューロンの細胞培養物をヒト（ホモ・サピエンス）およびカニクイザル（マカカ・ファシキュラリス）から個別に作製する工程であって、以下を含む、工程：(a) ヒトおよびカニクイザルの両方について個別に、IPSCに由来する神經前駆細胞（NPC）を、約30000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で用意する工程；

(b) 前記NPCを神經系細胞（NC）に分化させる工程であって、以下を含む、工程：

(i) 前記NPCを、Shh、FGF8およびアスコルビン酸リン酸エステルを補足した基本培地と共に、約7日にわたってインキュベートし、前記細胞を約45000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で再プレーティングし、再プレーティングされた細胞を、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リン酸エステルを補足した基本培地と共に、約21日～約23日にわたってインキュベートした後、分化NCをその支持体から解離する工程、および

(ii) 前記細胞を、約200000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で、個別に、適切な細胞培養フォーマットで再播種し、細胞をBDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸を補足した基本培地と共にインキュベートすることによりNCの分化を約7日にわたって継続した後、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸を補足した基本培地に加えた薬物候補と共に細胞を約5日にわたってインキュベートする工程；ならびに

ヒトおよびカニクイザルの両方で薬物候補の有効性プロファイルを確立する工程；ならびに有効性プロファイルが好ましければ、さらなる開発のために薬物候補を選択する工程。

10

20

30

40

50

一態様において、有効性プロファイルを確立する工程は、ターゲット・エンゲージメントを評価する工程を含む。一態様において、さらなる開発は、NHP種における薬物候補のインビオ試験および/またはヒトにおけるインビオ試験を含む。

#### 【 0 1 2 1 】

一態様では、前記方法のいずれかによって作製される分化霊長類NCの集団が提供される。一態様では、分化霊長類NCを解離し、再播種し、さらに分化させて、分化NCの一様な標準化された培養物を得る。一態様において、霊長類NCは、健常個体に由来する。別の一態様では、患者由来霊長類NCを使用して、CNS疾患の病態生理を研究するための疾患関連インビトロモデルを作製する。患者特異的体細胞の分化NCへの変換は、疾患モデリングまたは化合物スクリーニングのためのハイスループット細胞アッセイ用に患者特異的NCの供給源を生成させるための、容易に利用できる再現性のある技術になる。10

#### 【 0 1 2 2 】

一態様では、アンジェルマン症候群患者に由来する体細胞を使用してNPCを作製する。アンジェルマン症候群を患っている1人または数人の患者に由来するNPCは、アンジェルマン症候群の疾患モデルを作製するために使用することができる。ヒト単一遺伝子疾患モデルは、当技術分野公知の方法で病因遺伝子突然変異を各NHPゲノムに導入することにより、例えはNHP NPCに各突然変異を導入することにより、NHP種において再現することができる。

#### 【 0 1 2 3 】

さらなる一態様において、本発明の細胞アッセイを使用して生成するデータは、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS/ルー・ゲーリング病）卒中、および脊髄損傷などの神経変性疾患のような神経疾患に対処することを目指す研究目的のためのデータ、または該神経学的疾患の治療のためのデータである。重要なことに、本発明は、一貫した再現性のある細胞培養アッセイをもたらす。事実、霊長類幹細胞から導かれる以前の細胞培養アッセイの大きな短所は、細胞培養エリアの表面での分化中の細胞の不均一な分布である。本発明は、解離および再播種工程を導入することによって、この問題を解決する。驚いたことに、この工程に対し、分化中の霊長類NCは耐性を示し、該細胞は依然として生存可能であり、所定の一様な細胞密度で細胞培養アッセイを播種するのに適している。所与の細胞培養格納器の表面での均一な細胞分布は、改良された、再現性の向上した、細胞培養アッセイをもたらす。したがって、標準化された霊長類NC培養アッセイを生成させるための方法が提供され、ここで、工程（a）～（b）によって得られた分化NC培養物は、均一な細胞分布、ハイスループットプレートウェルにおける均等に分布した細胞、低減したクラスター形成および/またはクランプ形成、ならびにより等しい細胞分布を特徴とする。それゆえに、結果として得られるアッセイは、ロバストネスの向上、均一性の向上、およびアッセイレプリケート間のばらつきの減少を呈する。一態様において、細胞は、特に細胞核染色で評価した場合に、細胞培養エリア上に一様に分布する。2030

#### 【 0 1 2 4 】

一態様は、薬物候補の有効性を決定するための、本発明の方法によって得られる標準化されたNC培養物の使用である。本発明のさらなる一局面において、標準化された霊長類NC培養物は、薬物候補の毒性のインビトロ試験に使用される。本発明のさらなる一局面において、標準化された霊長類NC培養物は薬物候補の有効性のインビトロ試験に使用される。培養物は、健常個体および/または罹患個体に由来することができ、疾患および/または治療に関する薬物候補の生理学的效果を予測するために、有効性および/または毒性の結果が統合される。一態様では、薬物候補のインビトロ有効性プロファイルが評価され、好ましい有効性プロファイルを持つ薬物候補がさらなる開発のために選択される。さらなる開発は、NHP種における薬物候補のインビオ試験および/またはヒトにおけるインビオ試験を含みうる。40

#### 【 0 1 2 5 】

一特定態様では、少なくとも2つの霊長類種に由来する一様に分布した分化神経系細胞（N

10

20

30

40

50

C) の標準化された細胞培養物を使用して薬物候補のインビトロ有効性プロファイルを決定するための方法が提供され、分化NC培養物は、ハイスループットスクリーニングに適格であり、該方法は、以下の工程を含む：

- (a) 約20日間～約45日間の分化後に、分化NCをその支持体から解離し、該分化NCをハイスループット細胞培養フォーマットで再播種する工程、
- (b) 再播種されたNCを分化培地内でインキュベートする工程；
- (c) 再播種されたNCを薬物候補と接触させる工程；および
- (d) 薬物候補のインビトロ有効性プロファイルを決定する工程。

#### 【0126】

NHP種とヒトとの遺伝的距離は小さいので、ヒトでのインビオ試験に先だつNHP種でのインビトロおよび/またはインビオ有効性データの評価は、確定的である。これは、例えばNHP種と比較してヒトとの距離が遺伝学的に遠い齧歯類種とは対照的である。NHP種とヒトとの間の小さな遺伝的距離は、ヒトポリヌクレオチド配列を標的とする薬物候補を評価する場合、または薬物候補そのものがヒトゲノムに由来する配列を持つまたはそれに近いポリヌクレオチドを含む場合には、とりわけ重要である。一態様では、本明細書に記載する方法であって、薬物候補の、決定されたインビトロ有効性プロファイルが、薬物候補の有効性プロファイルの種間比較に使用され、細胞培養物が少なくとも2つの靈長類種の細胞から個別に作製され、本質的に同じ条件がすべての靈長類種についての培養に適用され、すべての靈長類種について有効性プロファイルが決定されて比較される、前記方法が提供される。一態様では、(i) 本明細書に記載する方法に従って、第1の種および第2の種について、薬物候補のインビトロ有効性プロファイルを決定する工程、ならびに(ii) 薬物候補の有効性プロファイルが好ましいものであれば、さらなる開発のために該薬物候補を選択する工程を含む、さらなる開発のために薬物候補を選択するための方法が提供される。一態様では、第1の種と第2の種との間のタンパク質コーディング領域の遺伝的類似性が高い。一態様では、第1の種と第2の種との間のタンパク質コーディング領域の遺伝的類似性が、ヒト(ホモ・サピエンス)とマウス(ムス・ムスキュラス(Mus musculus))との間よりも高い。さらなる態様において、第1の種と第2の種との間のタンパク質コーディング領域の遺伝的類似性は、85%超、90%超または95%超である。一態様において、第1の種と第2の種との間のタンパク質コーディング領域の遺伝的類似性は90%超である。一特定態様において、第1の種はカニクイザル(マカカ・ファシキュラリス)であり、第2の種はヒト(ホモ・サピエンス)である。本発明の分化NC培養物は、異なる種について逐次的に作製されうる。

#### 【0127】

したがって一態様において、本発明による1つまたは複数の靈長類種に由来する分化NCの標準化された細胞培養物は、薬物候補のインビトロ有効性試験に使用され、ここで薬物候補は、ヒトゲノムに由来するポリヌクレオチドを含むか、ヒトゲノムに由来するポリヌクレオチドの特異的配列を標的とする。さらなる一態様において、薬物候補は、RNAi作用物質またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの核酸分子を含む。

#### 【0128】

本発明のさらなる一態様では、インビトロ有効性試験および/またはインビトロ毒性試験において評価される薬物候補が、1つまたは複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。さらなる態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、ヒトゲノムに由来する配列に対して少なくとも90%の同一性、好ましくは100%の同一性を持つ10～30ヌクレオチド長を含むか、そのような10～30ヌクレオチド長からなる。アンチセンスオリゴヌクレオチド配列(モチーフ配列)は、例えばヌクレアーゼ耐性および/または標的核酸への結合アフィニティーを増加させるために、修飾することができると理解される。一局面において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは糖修飾ヌクレオシドを含み、DNAヌクレオシドまたはRNAヌクレオシドも含みうる。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは糖修飾ヌクレオシドおよびDNAヌクレオシドを含む。別の局面において、オリゴヌクレオチドへの修飾ヌクレオチドの組込みは、標的核酸に対するオリゴヌクレオチドのアフィニティ

10

20

30

40

50

ーを高める。その場合は、その修飾ヌクレオシドをアフィニティー強化修飾ヌクレオチドということができる。

#### 【 0 1 2 9 】

一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシド、例えば少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、または少なくとも16個の修飾ヌクレオシドを含む。ある態様において、オリゴヌクレオチドは、1～10個の修飾ヌクレオシド、例えば2～9個の修飾ヌクレオシド、例えば3～8個の修飾ヌクレオシド、例えば4～7個の修飾ヌクレオシド、例えば6個または7個の修飾ヌクレオシドを含む。いくつかの態様では、修飾ヌクレオシドのうちの少なくとも1つが、ロットクト核酸（LNA）であり、例えば修飾ヌクレオシドのうちの少なくとも2つ、例えば少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、または少なくとも8つが、LNAである。さらに別の一態様では、すべての修飾ヌクレオシドがLNAである。

10

#### 【 0 1 3 0 】

一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、これら3つのタイプの修飾（修飾糖、修飾核酸塩基および修飾ヌクレオシド間連結）またはそれらの組み合わせから独立して選択される修飾を含む。好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数の糖修飾ヌクレオシド、例えば2'糖修飾ヌクレオシドを含む。好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸（ANA）、2'-フルオロ-ANA、およびLNAヌクレオシドからなる群より独立して選択される1つまたは複数の2'糖修飾ヌクレオシドを含む。より一層好ましくは、前記1つまたは複数の修飾ヌクレオシドはLNAである。

20

#### 【 0 1 3 1 】

さらなる一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間連結を含む。好ましい一態様では、連続したヌクレオチド配列内のヌクレオシド間連結が、ホスホロチオエートヌクレオシド間連結またはボラノホスフェートヌクレオシド間連結である。

30

#### 【 0 1 3 2 】

いくつかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、2'-MOE-RNAである少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含み、例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10個の2'-MOE-RNAヌクレオシド単位を含む。いくつかの態様では、該修飾ヌクレオシドのうちの少なくとも1つが2'-フルオロDNA、例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10個の2'-フルオロ-DNAヌクレオシド単位である。

#### 【 0 1 3 3 】

いくつかの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのLNA単位、例えば1、2、3、4、5、6、7、または8個のLNA単位、例えば2～6個のLNA単位、例えば3～7個のLNA単位、4～8個のLNA単位、または3、4、5、6もしくは7個のLNA単位を含む。いくつかの態様では、すべての修飾ヌクレオシドがLNAヌクレオシドである。さらなる一態様において、オリゴヌクレオチドは、ベータ-D-オキシ-LNAと、以下のLNA単位のうちの1つまたは複数との両方を含みうる：ベータ-D立体配置またはアルファ-L立体配置のいずれかであるチオ-LNA、アミノ-LNA、オキシ-LNA、および/もしくはENA、またはそれらの組み合わせ。さらなる一態様では、すべてのLNAシトシン単位が5-メチル-シトシンである。好ましい一態様において、オリゴヌクレオチドまたは連続したヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の5'端に少なくとも1つのLNA単位を有し、3'端に少なくとも2つのLNA単位を有する。

40

#### 【 0 1 3 4 】

いくつかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのLNA单

50

位と少なくとも1つの2'置換修飾ヌクレオシドとを含む。

【0135】

本発明のいくつかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは2'糖修飾ヌクレオシドおよびDNA単位を含む。好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドはLNA単位とDNA単位をどちらも含む。好ましくは、LNA単位とDNA単位とを合わせた総数は8~30、例えば10~25、好ましくは12~22、例えば12~18、より好ましくは11~16である。

本発明のいくつかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列、例えば連続したヌクレオチド配列は、少なくとも1つまたは2つのLNA単位からなり、残りのヌクレオチド単位はDNA単位である。いくつかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、LNAヌクレオシドおよび天然ヌクレオシド（RNAヌクレオシドまたはDNAヌクレオシドなど、最も好ましくはDNAヌクレオシド）だけを含み、任意でホスホロチオエートなどの修飾ヌクレオシド間連結を持つ。

10

【0136】

本発明の一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、RNase Hを動員する能力を有する。

【0137】

好ましい一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本明細書では単に「ギャップマー」ともいうギャップマーデザインまたはギャップマー構造を有する。ギャップマー構造では、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、'5' 3'向きに、少なくとも3つの相異なる構造領域、すなわち5'-フランク、ギャップ、および3'-フランク、F-G-F'を含む。このデザインにおいて、隣接領域FおよびF'（ウイング領域とも呼ばれる）は、標的核酸に相補的な一連の修飾ヌクレオシドを含み、一方、ギャップ領域Gは、アンチセンスオリゴヌクレオチドが標的化核酸との二重鎖の状態にある時に、ヌクレアーゼ、好ましくはRNaseなどのエンドヌクレアーゼ、例えばRNase Hを動員する能力を有する一連のヌクレオチドを含む。ヌクレアーゼ、特にRNase Hを動員する能力を有するヌクレオシドは、DNA、アルファ-L-オキシ-LNA、2'-フルオロ-ANAおよびUNAからなる群より選択することができる。領域Gの5'端および3'端に隣接している領域FおよびF'は、好ましくは、非ヌクレアーゼ動員ヌクレオシド（3'エンド構造を持つヌクレオシド）、より好ましくは1つまたは複数のアフィニティー強化修飾ヌクレオシドを含む。いくつかの態様において、3'フランクは、少なくとも1つのLNAヌクレオシド、好ましくは少なくとも2つのLNAヌクレオシドを含む。いくつかの態様において、5'フランクは少なくとも1つのLNAヌクレオシドを含む。いくつかの態様において、5'および3'隣接領域はどちらもLNAヌクレオシドを含む。いくつかの態様では、隣接領域中のすべてのヌクレオシドがLNAヌクレオシドである。別の態様において、隣接領域はLNAヌクレオシドと、他のヌクレオシド、例えばDNAヌクレオシドおよび/または非LNA修飾ヌクレオシド、例えば2'置換ヌクレオシドとを、どちらも含みうる（混合フランク）。この場合、ギャップは、5'端および3'端にアフィニティー強化修飾ヌクレオシド、好ましくはLNA、例えばベータ-D-オキシ-LNAが隣接している、少なくとも5つのRNase H動員ヌクレオシド（2'エンド構造を持つヌクレオシド、好ましくはDNA）の連続した配列と定義される。それゆえに、ギャップ領域に隣接する5'隣接領域および3'隣接領域のヌクレオシドは、修飾ヌクレオシド、好ましくは非ヌクレアーゼ動員ヌクレオシドである。

20

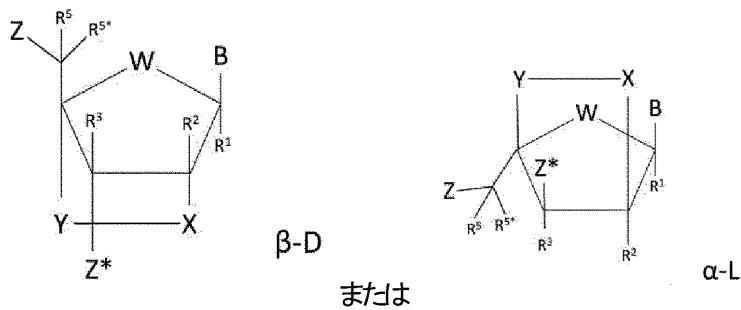
【0138】

いくつかの態様において、本発明のオリゴマーの修飾ヌクレオシドまたはLNAヌクレオシドは、式IまたはIIの一般構造を有する：

30

40

50



式 I

式 II

式中、

Wは、-O-、-S-、-N( $R^a$ )-、-C( $R^aR^b$ )-から選択され、例えばいくつかの態様では-O-であり；

Bは、核酸塩基部分または修飾核酸塩基部分を示し；

Zは、隣接ヌクレオシドへのヌクレオシド間連結、または5'末基を示し；

$Z^*$ は、隣接ヌクレオシドへのヌクレオシド間連結または3'末基を示し；

Xは、-C( $R^aR^b$ )-、-C( $R^a$ )=C( $R^b$ )-、-( $R^a$ )=N-、-O-、-Si( $R^a$ )<sub>2</sub>-、-S-、-SO<sub>2</sub>-、-N( $R^a$ )-、および>C=Zからなるリストより選択される基を示す。

【0139】

いくつかの態様において、Xは、-O-、-S-、NH-、NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>、-CH<sub>2</sub>-、CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>、-C(=CH<sub>2</sub>)-、および-C(=CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-からなる群より選択される。

【0140】

いくつかの態様において、Xは-O-であり、Yは、-C( $R^aR^b$ )-、-C( $R^a$ )=C( $R^b$ )-、-C( $R^a$ )=N-、-O-、-Si( $R^a$ )<sub>2</sub>-、-S-、-SO<sub>2</sub>-、-N( $R^a$ )-、および>C=Zからなる群より選択される基を示す。

【0141】

いくつかの態様において、Yは、-CH<sub>2</sub>-、-C( $R^aR^b$ )-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-C( $R^aR^b$ )=C( $R^a$ )-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-C( $R^aR^b$ )=C( $R^aR^b$ )-、-C( $R^a$ )=C( $R^b$ )-、および-C( $R^a$ )=N-からなる群より選択される。

【0142】

いくつかの態様において、Yは、-CH<sub>2</sub>-、-CH<sup>a</sup>-、-CHCH<sub>3</sub>-、CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-からなる群より選択されるか、または-X-Y-は、全体として、二価リンカー基（ラジカルともいう）を示し、全体として、-C( $R^aR^b$ )-、-C( $R^a$ )=C( $R^b$ )-、-C( $R^a$ )=N-、-O-、-Si( $R^a$ )<sub>2</sub>-、-S-、-SO<sub>2</sub>-、-N( $R^a$ )-、および>C=Zからなる群より選択される1、2、3または4つの基/原子からなる二価リンカー基を示す。いくつかの態様において、-X-Y-は、-X-CH<sub>2</sub>-、-X-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-、-X-CH<sup>a</sup>-、-X-C(HCH<sub>3</sub>)-、-O-Y-、-O-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>-、-O-CHCH<sub>3</sub>-、-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>、-O-CH(CH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>)-、-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-、-O-NCH<sub>2</sub>-、-C(=CH<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-、-NR<sup>a</sup>-CH<sub>2</sub>-、N-O-CH<sub>2</sub>-、-S-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-、および-S-CH<sup>a</sup>-からなる群より選択されるビラジカルを示す。

【0143】

いくつかの態様において、-X-Y-は、-O-CH<sub>2</sub>-または-O-CH(CH<sub>3</sub>)-を示し、Zは、-O-、-S-、およびN( $R^a$ )-から選択され、R<sup>a</sup>、そして存在する場合のR<sup>b</sup>は、それぞれ独立して、水素、置換されてもよいC<sub>1-6</sub>-アルキル、置換されてもよいC<sub>2-6</sub>-アルケニル、置換されてもよいC<sub>2-6</sub>-アルキニル、ヒドロキシリ、置換されてもよいC<sub>1-6</sub>-アルコキシ、C<sub>2-6</sub>-アルコキシアルキル、C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、カルボキシ、C<sub>1-6</sub>-アルコキシカルボニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシ-カルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ-カルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノおよびジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)-アミノ-カルボニル、ア

10

20

30

40

50

ミノ-C<sub>1-6</sub>-アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ-C<sub>1-6</sub>-アルキル-アミノカルボニル、C<sub>1-6</sub>-アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、C<sub>1-6</sub>-アルカノイルオキシ、スルホノ、C<sub>1-6</sub>-アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファンイル、C<sub>1-6</sub>-アルキルチオ、ハロゲンから選択され、ここでアリールおよびヘテロアリールは置換されてもよく、2つのジェミナル置換基R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>は、全体として、置換されてもよいメチレン(=CH<sub>2</sub>)を示してもよく、すべてのキラル中心について、不斉基はR配向またはS配向のいずれかで見いだされてよく、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>は、水素、置換されてもよいC<sub>1-6</sub>-アルキル、置換されてもよいC<sub>2-6</sub>-アルケニル、置換されてもよいC<sub>2-6</sub>-アルキニル、ヒドロキシ、C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、C<sub>2-6</sub>-アルコキシアルキル、C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、カルボキシ、C<sub>1-6</sub>-アルコキシカルボニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシ-カルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ-カルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノおよびジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)-アミノ-カルボニル、アミノ-C<sub>1-6</sub>-アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ-C<sub>1-6</sub>-アルキル-アミノカルボニル、C<sub>1-6</sub>-アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、C<sub>1-6</sub>-アルカノイルオキシ、スルホノ、C<sub>1-6</sub>-アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファンイル、C<sub>1-6</sub>-アルキルチオ、ハロゲンからなる群より独立して選択され、ここでアリールおよびヘテロアリールは置換されてもよく、2つのジェミナル置換基は、全体として、オキソ、チオキソ、イミノ、または置換されてもよいメチレンを示しうる。

## 【0144】

いくつかの態様において、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>は、C<sub>1-6</sub>アルキル、例えばメチル、および水素から独立して選択される。

## 【0145】

いくつかの態様において、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>はすべて水素である。

## 【0146】

いくつかの態様において、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>はすべて水素であり、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>のうちのどちらか一つも水素であり、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>のうちの他方は水素以外、例えばメチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキルである。

## 【0147】

いくつかの態様において、R<sup>a</sup>は水素またはメチルである。いくつかの態様において、存在する場合のR<sup>b</sup>は水素またはメチルのどちらかである。

## 【0148】

いくつかの態様では、R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>の一方または両方が水素である。

## 【0149】

いくつかの態様では、R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>の一方が水素であり、他方が水素以外である。

## 【0150】

いくつかの態様では、R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>の一方がメチルであり、他方が水素である。

## 【0151】

いくつかの態様では、R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>の両方がメチルである。

## 【0152】

いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-O-CH<sub>2</sub>-であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>のすべてが、いずれも水素である。そのようなLNAヌクレオシドは、いずれも参照により本明細書に組み入れられるWO99/014226、WO00/66604、WO98/039352およびWO2004/046160に開示されており、ベータ-D-オキシLNAヌクレオシドおよびアルファ-L-オキシLNAヌクレオシドとして一般に公知であるものを包含する。

## 【0153】

いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-S-CH<sub>2</sub>-であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>のすべてが、いずれも水素である。そのようなチオLNAヌクレオシドは参照により本明細書に組み入れられるWO99/014226およびWO2004/046160に開示さ

10

20

30

40

50

れている。

**【 0 1 5 4 】**

いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-NH-CH<sub>2</sub>-であり、WはOであり、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>5</sub>およびR<sub>5</sub>\*のすべてが、いずれも水素である。そのようなアミノLNAヌクレオシドは、参照により本明細書に組み入れられるWO99/014226およびWO2004/046160に開示されている。

**【 0 1 5 5 】**

いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-または-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-であり、WはOであり、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>5</sub>およびR<sub>5</sub>\*のすべてが、いずれも水素である。そのようなLNAヌクレオシドは、参照により本明細書に組み入れられるWO00/047599およびMorita et al, Bioorganic & Med. Chem. Lett. 12 73-76に開示されており、2'-O-4'C-エチレン架橋核酸(ENA)として一般に公知であるものを包含する。10

**【 0 1 5 6 】**

いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-O-CH<sub>2</sub>-であり、WはOであり、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>のすべて、ならびにR<sub>5</sub>およびR<sub>5</sub>\*のうちの一方が水素であり、R<sub>5</sub>およびR<sub>5</sub>\*のうちの他方が水素以外、例えばメチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキルである。そのような5'置換LNAヌクレオシドは、参照により本明細書に組み入れられるWO2007/134181に開示されている。

**【 0 1 5 7 】**

いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-であり、ここではR<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>の一方または両方が水素以外、例えばメチルであり、WはOであり、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>のすべて、ならびにR<sub>5</sub>およびR<sub>5</sub>\*のうちの一方が水素であり、R<sub>5</sub>およびR<sub>5</sub>\*のうちの他方が水素以外、例えばメチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキルである。そのようなビス修飾LNAヌクレオシドは、参照により本明細書に組み入れられるWO2010/077578に開示されている。20

**【 0 1 5 8 】**

いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は、二価リンカー基-O-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-(2'O-メトキシエチル二環式核酸-Seth et al., 2010, J. Org. Chem. Vol 75 (5) pp. 1569-81)である。いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は、二価リンカー基-O-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-(2'O-エチル二環式核酸-Seth et al., 2010, J. Org. Chem. Vol 75 (5) pp. 1569-81)を示す。いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-O-CH<sup>a</sup>-であり、WはOであり、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>5</sub>およびR<sub>5</sub>\*のすべてが、いずれも水素である。そのような6'置換LNAヌクレオシドは、どちらも参照により本明細書に組み入れられるWO10036698およびWO07090071に開示されている。30

**【 0 1 5 9 】**

いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-O-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-であり、WはOであり、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>5</sub>およびR<sub>5</sub>\*のすべてが、いずれも水素である。そのようなLNAヌクレオシドは、当技術分野では環状MOE(cMOE)としても公知であり、WO07090071に開示されている。

**【 0 1 6 0 】**

いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は、R配置またはS配置のいずれかである二価リンカー基-O-CH(CH<sub>3</sub>)-を示す。いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は、全体として、二価リンカー基-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-を示す(Seth et al., 2010, J. Org. Chem.)。いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-O-CH(CH<sub>3</sub>)-であり、WはOであり、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>5</sub>およびR<sub>5</sub>\*のすべてが、いずれも水素である。そのような6'メチルLNAヌクレオシドは、当技術分野ではcETヌクレオシドとして公知であり、どちらも参照により本明細書に組み入れられるWO07090071(ベータ-D)およびWO2010/036698(アルファ-L)に開示されているとおり、(S)cET立体異性体または(R)cET立体異性体のどちらかであります。40

**【 0 1 6 1 】**

いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-であり、ここでR<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>はどちらも水素ではなく、WはOであり、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>5</sub>およびR<sub>5</sub>\*のすべてが、いずれも

10

20

30

40

50

水素である。いくつかの態様において、R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>はどちらもメチルである。そのような6'二置換LNAヌクレオシドは、参照により本明細書に組み入れられるWO 2009006478に開示されている。

#### 【0162】

いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-S-CHR<sup>a</sup>-であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>のすべてが、いずれも水素である。そのような6'置換チオLNAヌクレオシドは、参照により本明細書に組み入れられるWO11156202に開示されている。いくつかの6'置換チオLNA態様において、R<sup>a</sup>はメチルである。

#### 【0163】

いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-C(=CH<sub>2</sub>)-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、例えば-C(=CH<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-、または-C(=CH<sub>2</sub>)-CH(CH<sub>3</sub>)-であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>のすべてが、いずれも水素である。そのようなビニルカルボLNAヌクレオシドは、どちらも参照により本明細書に組み入れられるWO08154401およびWO09067647に開示されている。

10

#### 【0164】

いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-N(-OR<sup>a</sup>)-であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>のすべてが、いずれも水素である。いくつかの態様において、R<sup>a</sup>は、メチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキルである。そのようなLNAヌクレオシドはN置換LNAとしても公知であり、参照により本明細書に組み入れられるWO2008/150729に開示されている。いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は、全体として、二価リンカー基-O-NR<sup>a</sup>-CH<sub>3</sub>-を示す(Seth et al., 2010, J. Org. Chem.)。いくつかの態様において、ビラジカル-X-Y-は-N(R<sup>a</sup>)-であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>のすべてが、いずれも水素である。いくつかの態様において、R<sup>a</sup>は、メチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキルである。

20

#### 【0165】

いくつかの態様では、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>の一方または両方が水素であり、置換されている場合は、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>の他方が、メチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキルである。そのような一態様において、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>はすべて水素ことができ、ビラジカル-X-Y-は-O-CH<sub>2</sub>-または-O-C(HCRA)-、例えば-O-C(HCH<sub>3</sub>)-から選択することができる。

#### 【0166】

いくつかの態様において、ビラジカルは-CRA<sub>a</sub>R<sub>b</sub>-O-CRA<sub>a</sub>R<sub>b</sub>-、例えばCH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>のすべてが、いずれも水素である。いくつかの態様において、R<sup>a</sup>は、メチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキルである。そのようなLNAヌクレオシドはコンフォメーションが束縛された(conformationally restricted)ヌクレオチド(CRN)としても公知であり、参照により本明細書に組み入れられるWO2013036868に開示されている。

30

#### 【0167】

いくつかの態様において、ビラジカルは-O-CRA<sub>a</sub>R<sub>b</sub>-O-CRA<sub>a</sub>R<sub>b</sub>-、例えばO-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-であり、WはOであり、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>のすべてが、いずれも水素である。いくつかの態様において、R<sup>a</sup>は、メチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキルである。そのようなLNAヌクレオシドはCOCヌクレオチドとしても公知であり、参照により本明細書に組み入れられるMitsuoka et al., Nucleic Acids Research 2009 37 (4), 1225-1238に開示されている。

40

#### 【0168】

指定がある場合を除き、LNAヌクレオシドはベータ-D立体異性体であってもアルファ-L立体異性体であってもよいことが、認識されるであろう。

#### 【0169】

さらなるギャップマーデザインは、WO2004/046160、WO2007/146511に開示されており、参照により組み入れられる。

#### 【0170】

本発明の一局面は、ブタ、靈長類またはヒトUBE3Aタンパク質発現のレベルを調節するこ

50

と、特に、神経細胞における、特にヒト神経系細胞における、父性UBE3A発現の発現を増加させることである。ヒトUBE3Aタンパク質は、Uniprot番号Q05086に列挙されている数種類のアイソフォームで存在する。母性UBE3A遺伝子中のいくつかの突然変異は、アンジェルマン症候群をもたらしうる。

#### 【0171】

本発明のこの局面のオリゴヌクレオチドにとっての標的核酸はRNA、特に長鎖ノンコーディングRNAである。本発明のオリゴヌクレオチドが標的とする長鎖ノンコーディングRNAはヒトSNHG14である(UBE3A-ATSとしても公知であり、Ensemblエントリー番号はENSG00000224078、バージョンGRCh38.p2である)。特に、標的核酸は、15番染色体上の位置25278410～25419462(SEQ ID NO:1)に対応するSNORD109B下流の領域である。アカゲザル(マカカ・ムラタ)において、UBE3Aサプレッサーは、EnsemblアセンブリMMUL1.0を使用して7番染色体上の位置4222848～4373084(フォワード鎖)(SEQ ID NO:2)に対応するSNORD109A下流の領域と定義される。10

#### 【0172】

いくつかの態様において、標的核酸はSEQ ID NO:1であるか、その天然変異体である。ある特定の態様において、標的核酸は、ヒト(SEQ ID NO:1)とアカゲザル(SEQ ID NO:2)との間で保存されている領域に対応する。ある特定の態様において、標的核酸は、ヒト(SEQ ID NO:1)、アカゲザル(SEQ ID NO:2)およびマウス(SEQ ID NO:3)間で保存されている領域に対応する。

#### 【0173】

ある特定の態様において、標的核酸は、UBE3Aプレ-mRNAに対してアンチセンスである領域であり、この領域はSEQ ID NO:1の位置55319～141053に対応する。20

#### 【0174】

いくつかの態様において、標的核酸は、哺乳動物細胞、特にインビトロまたはインビボのヒト細胞などの細胞(標的細胞)中に存在する。ある特定の態様において、標的細胞はニューロン、好ましくはヒト神経細胞である。

#### 【0175】

標的配列は標的核酸の部分配列でありうる。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、UBE3Aのエクソン9、エクソン10、エクソン13、エクソン14、イントロン14、エクソン15、イントロン15、およびエクソン16のアンチセンス領域からなる群より選択される部分配列を標的とする。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドまたは連続したヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:1の位置55319～76274、77483～77573、92157～93403、および97056～97354からなる群より選択される一本鎖核酸分子にハイブリダイズするか、または相補的である。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドまたは連続したヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:1の位置60821～60849、77567～77583、92323～92339、および97156～97172からなる群より選択される一本鎖核酸分子にハイブリダイズするか、または相補的である。30

#### 【0176】

##### 特定の態様

1. 一様に分布した分化神経系細胞(NC)の標準化された細胞培養物を異なる靈長類種から作製するためのインビトロ法であって、以下を含む、方法：40

(a) 神経前駆細胞(NPC)を用意する工程；

(b) NPCを神経系細胞(NC)に分化させる工程であって、以下を含む、工程：

(i) 約20日～約45日の分化後に、分化NCをその支持体から解離する工程；および

(ii) 前記細胞を適切な細胞培養フォーマットで再播種し、約4日～約15日にわたってNCの分化を継続する工程。

2. 灵長類種が、ヒト(ホモ・サピエンス)、カニクイザル(マカカ・ファシキュラリス)およびアカゲザル(マカカ・ムラタ)からなる群より選択される、態様1の方法。

3. 灵長類種が、ヒト(ホモ・サピエンス)およびカニクイザル(マカカ・ファシキュラリス)からなる群より選択される、態様1の方法。

10

20

30

40

50

4. 分化NCの標準化された細胞培養物が2つの靈長類種について個別に作製され、第1の靈長類種がヒト（ホモ・サピエンス）であり、第2の靈長類種がカニクイザル（マカカ・ファシキュラリス）である、態様1の方法。

5. NPCが人工多能性幹細胞（IPSC）に由来する、態様1～4のいずれか一態様の方法。

6. 工程（b）が、Shh、FGF8、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リン酸エステルからなる群より選択される1種類または複数種類の分化作用物質と共にNPCを培養することを含む、態様1～5のいずれか一態様の方法。

7. 工程（b）（i）が、Shh、FGF8およびアスコルビン酸リン酸エステルを含む基本培地中で細胞を約5～約10日間にわたって培養した後、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リン酸エステルを含む基本培地中で細胞をさらに約15日～約35日間にわたって培養してから、分化NCをその支持体から解離することを含む、態様1～6のいずれか一態様の方法。  
10

8. 基本培地中の前記1種類または複数種類の分化作用物質の濃度が、Shhについて50～500ng/ml、FGF8について25～250ng/ml、BDNFについて1～50ng/ml、GDNFについて1～50ng/ml、cAMPについて0.1～10mM、およびアスコルビン酸リン酸エステルについて20～200μMである、態様6または7の方法。

9. 基本培地中の前記1種類または複数種類の分化作用物質の濃度が、Shhについて200ng/ml、FGF8について100ng/ml、BDNFについて20ng/ml、GDNFについて10ng/ml、cAMPについて0.5mM、およびアスコルビン酸リン酸エステルについて100μMである、態様6～8のいずれか一態様の方法。  
20

10. Shh、FGF8およびアスコルビン酸リン酸エステルとの培養期間が約7日であり、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸リン酸エステルとの培養期間が約20～約40日である、態様6～9のいずれか一態様の方法。

11. NPCがラミニン521支持体上に用意される、態様1～10のいずれか一態様の方法。

12. 工程（b）（i）が、細胞剥離溶液で細胞を解離することを含む、態様1～11のいずれか一態様の方法。

13. 細胞剥離溶液がAccutaseである、態様12の方法。

14. 工程（b）（ii）が、ラミニン521支持体上に200000細胞/cm<sup>2</sup>で細胞を再播種することを含む、態様1～13のいずれか一態様の方法。

15. 前記細胞が96ウェルプレートまたは384ウェルプレートに再播種される、態様1～14のいずれか一態様の方法。  
30

16. 工程（b）（ii）がROCK阻害剤の存在下で細胞を再播種することを含む、態様1～15のいずれか一態様の方法。

17. ROCK阻害剤がY-27632である、態様16の方法。

18. 工程（b）（ii）が、細胞を再播種した後に、BDNF、GDNF、cAMPおよびアスコルビン酸を補足した基本培地中で細胞を培養することによって、分化を継続することを含む、態様1～17のいずれか一態様の方法。

19. 分化NCがMAP2を発現する、態様1～18のいずれか一態様の方法。

20. 分化NCがMAP2陽性神経突起を含む、態様1～19のいずれか一態様の方法。

21. NPCがニューロン障害を持つ個体に由来する、態様1～20のいずれか一態様の方法。  
40

22. NPCが健常個体に由来する、態様1～21のいずれか一態様の方法。

23. 細胞培養物が異なる種から逐次的に作製される、態様1～22のいずれか一態様の方法。  
。

24. 前記細胞が、細胞核染色で評価した場合に、細胞培養エリア上に本質的に一様に分布している、態様1～23のいずれか一態様の方法。

25. 細胞の分布がDNA染色、特にヘキスト染色によって評価される、態様1～24のいずれか一態様の方法。

26. 態様1～25のいずれか一態様の方法によって得られる細胞培養系。

27. 薬物候補の毒性のインビトロ試験のため、態様1～26のいずれか一態様に従って得られた細胞培養物の使用。  
50

28. 薬物候補の有効性のインビトロ試験のための、態様1～27のいずれか一態様に従って得られた細胞培養物の使用。

29. 前記有効性が、態様21の方法に由来する細胞培養物および態様22の方法に由来する細胞培養物において試験される、態様28の使用。

30. 薬物候補を選択するための、特に、さらなる開発のために薬物候補を選択するための、態様1～25のいずれか一態様に従って得られた細胞培養物の使用。

31. 薬物候補がオリゴヌクレオチドを含むか、またはオリゴヌクレオチドの特異的配列を標的とする、態様27～30のいずれか一態様の使用のための細胞培養物。

32. 薬物候補が少なくとも1種類の核酸分子、例えばRNAi作用物質またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、態様27～31のいずれか一態様の使用のための細胞培養物。 10

33. 前記核酸分子が、2'-O-アルキル-RNA、2'-O-メチル-RNA、2'-アルコキシ-RNA、2'-O-メトキシエチル-RNA、2'-アミノ-DNA、2'-フルオロ-DNA、アラビノ核酸(ANA)、2'-フルオロ-ANA、およびLNAヌクレオシドからなる群より独立して選択される1つまたは複数の2'糖修飾ヌクレオシドを含む、態様32の使用のための細胞培養物。

34. 前記1つまたは複数の2'糖修飾ヌクレオシドがLNAヌクレオシドである、態様33の使用のための細胞培養物。

35. LNAヌクレオシドが、ベータ-D-オキシ-LNA、アルファ-L-オキシ-LNA、ベータ-D-アミノ-LNA、アルファ-L-アミノ-LNA、ベータ-D-チオ-LNA、アルファ-L-チオ-LNA、(S)cET、(R)cET、ベータ-D-ENAまたはアルファ-L-ENAから選択される、態様34の使用のための細胞培養物。 20

36. 前記核酸分子が少なくとも1つの修飾ヌクレオシド間連結を含む、態様32～35のいずれか一態様の使用のための細胞培養物。

37. 連続したヌクレオチド配列内のヌクレオシド間連結がホスホロチオエートヌクレオシド間連結である、態様36の使用のための細胞培養物。

38. アンチセンスオリゴヌクレオチドがRNase Hを動員する能力を有する、態様32～37のいずれか一態様の使用のための細胞培養物。

39. アンチセンスオリゴヌクレオチドがギャップマーである、態様32～38のいずれか一態様の使用のための細胞培養物。

40. 前記オリゴヌクレオチドが式5'-F-G-F'-3'のギャップマーであり、式中、領域FおよびF'は、独立して1～7個の修飾ヌクレオシドを含み、Gは、RNaseHを動員する能力を有する6～16ヌクレオシドの領域である、態様38または39の使用のための細胞培養物。 30

41. 本質的に、本明細書に記載するとおりである、方法および使用。

#### 【0177】

本明細書に記載する態様はいずれも、単独でまたは組み合わせて使用することができる。以下の実施例では本発明をさらに詳しく説明する。以下の調製物および実施例は、当業者が本発明をより明確に理解し、本発明を実施することができるよう記載する。しかしながら、本発明は、本発明の単一の局面を例証する意図しかない例示の態様によって範囲を限定されることはなく、機能的に等価な方法は、本発明の範囲内である。事実、本明細書に開示するものに加えて、本発明のさまざまな変更態様は、上記の説明および添付の図面から当業者には明白になるであろう。そのような変更態様は、添付の特許請求の範囲に包含されるものとする。 40

#### 【実施例】

#### 【0178】

材料および方法

#### 【0179】

(表3) SEQ ID NO:1に相補的なオリゴヌクレオチドまたは連続した核酸塩基配列 (SEQ ID NOで示されるモチーフ配列)、それらから作られたオリゴヌクレオチドデザイン、ならびにモチーフ配列に基づいてデザインされた具体的オリゴヌクレオチド化合物 (CMP ID NOで示されるもの)

Seq ID NO	モチーフ	デザイン	化合物	CMP ID NO	$\Delta G^\circ$	開始位置 SEQ ID NO 1
4	AACTTCATCAATATTTCCC	3-13-3	AACTtcatcaataatttCCC	4_1	-23,36	1677
4	AACTTCATCAATATTTCCC	2-15-2	AActtcatcaatatttcCC	4_2	-19,60	1677
5	ACTTCATCAATATTTCCC	3-12-3	ACTTcatcaataatttCCC	5_1	-23,80	1677
5	ACTTCATCAATATTTCCC	2-14-2	ACttcatcaatatttcCC	5_2	-20,24	1677
6	CAACTTCATCAATATTTCCC	2-14-4	CAacttcatcaataatttCCC	6_1	-25,64	1677
6	CAACTTCATCAATATTTCCC	2-16-2	CAacttcatcaatatttcCC	6_2	-22,28	1677
7	CAACTTCATCAATATTTCC	4-13-2	CAACttcatcaataatttCC	7_1	-21,47	1678
7	CAACTTCATCAATATTTCC	2-15-2	CAacttcatcaatatttCC	7_2	-19,46	1678
8	CCAACCTTCATCAATATTTCC	3-14-3	CCAacttcatcaataattTCC	8_1	-25,64	1678
9	CCCAACCTTCATCAATATTT	4-14-2	CCCAacttcatcaataattTC	9_1	-25,64	1679
10	ACCCAACCTTCATCAATATTT	2-16-2	ACccaaacttcatcaataatTT	10_1	-20,05	1680
11	CCCAACCTTCATCAATATTT	4-13-2	CCCAacttcatcaataatTT	11_1	-23,96	1680
11	CCCAACCTTCATCAATATTT	2-15-2	CCcaacttcatcaataatTT	11_2	-20,28	1680
12	ACCCAACCTTCATCAATATT	4-13-2	ACCCaaacttcatcaataTT	12_1	-23,64	1681
12	ACCCAACCTTCATCAATATT	2-15-2	ACccaaacttcatcaataTT	12_2	-19,18	1681
13	CCCAACCTTCATCAATATT	4-12-2	CCCAacttcatcaataTT	13_1	-23,09	1681
13	CCCAACCTTCATCAATATT	2-14-2	CCcaacttcatcaataTT	13_2	-19,41	1681
14	TACCCAACTTCATCAATAT	2-15-2	TAcccaacttcatcaatAT	14_1	-19,31	1682
15	TACCCAACTTCATCAATA	2-14-2	TAcccaacttcatcaaTA	15_1	-19,14	1683
16	TTACCCAACTTCATCAATA	2-15-2	TTacccaaacttcatcaaTA	16_1	-19,74	1683
17	TTTACCCAACTTCATCAAT	4-13-2	TTTAcccaacttcatcaAT	17_1	-21,68	1684
17	TTTACCCAACTTCATCAAT	2-15-2	TTtacccaaacttcatcaAT	17_2	-19,22	1684
18	ATACTTACCCAACTTCAT	3-13-3	ATActttacccaaacttCAT	18_1	-23,44	1688
18	ATACTTACCCAACTTCAT	2-15-2	ATactttacccaaacttcAT	18_2	-20,13	1688
19	TACTTACCCAACTTCAT	3-12-3	TACttacccaaacttCAT	19_1	-22,78	1688
19	TACTTACCCAACTTCAT	2-14-2	TActttacccaaacttcAT	19_2	-19,30	1688
20	TTATACTTACCCAACTTCA	2-16-2	TTatactttacccaaacttCA	20_1	-21,40	1689
21	TCACTGTTCTGACTTT	3-10-3	TCActgttctgacTTT	21_1	-19,11	1712
22	TTCAATCTCTATCTCATCAT	2-16-2	TTcaatctctatctcatcAT	22_1	-19,42	4169
23	CTTCAATCTCTATCTCATCA	4-14-2	CTTCAatctctatctcatCA	23_1	-24,21	4170
23	CTTCAATCTCTATCTCATCA	2-16-2	CTtcaatctctatctcatCA	23_2	-22,04	4170
24	TTCAATCTCTATCTCATCA	2-15-2	TTcaatctctatctcatCA	24_1	-19,44	4170

10

20

30

40

50

Seq ID NO	モチーフ	デザイン	化合物	CMP ID NO	ΔG°	開始位置 SEQ ID NO 1
25	CTTCAATCTCTATCTCATC	2-15-2	CTtcaatcttatctcaTC	25_1	-19,87	4171
26	ACTTCAATCTCTATCTCAT	3-13-3	ACTtcaatcttatctCAT	26_1	-22,36	4172
26	ACTTCAATCTCTATCTCAT	2-15-2	ACttcaatcttatcttcAT	26_2	-19,08	4172
27	CACTTCAATCTCTATCTCAT	2-16-2	CAActtcaatcttatcttcAT	27_1	-20,98	4172
28	ACTTCAATCTCTATCTCA	2-12-4	ACttcaatcttatCTCA	28_1	-21,96	4173
28	ACTTCAATCTCTATCTCA	2-14-2	ACttcaatcttatctCA	28_2	-19,10	4173
29	CACTTCAATCTCTATCTCA	2-13-4	CAActtcaatcttatCTCA	29_1	-23,86	4173
29	CACTTCAATCTCTATCTCA	2-15-2	CAActtcaatcttatctCA	29_2	-21,00	4173
30	ACACTTCAATCTCTATCTC	2-15-2	ACacttcaatcttatTC	30_1	-19,38	4174
31	TACACTTCAATCTCTATCTC	2-14-4	TAacacttcaatcttaTCTC	31_1	-23,31	4174
31	TACACTTCAATCTCTATCTC	2-16-2	TAacacttcaatcttatTC	31_2	-20,53	4174
32	TACACTTCAATCTCTATCT	4-13-2	TACActtcaatcttatCT	32_1	-22,34	4175
33	CTTTGTCTCTTTACT	2-13-2	CTttgtctctttaCT	33_1	-19,36	4374
34	TATAACCTTCTTAACCC	3-12-3	TATacccttcttaaCCC	34_1	-24,89	8118
34	TATAACCTTCTTAACCC	2-14-2	TAtacccttcttaacCC	34_2	-20,83	8118
35	TGTTTATACCCCTTCC	2-12-2	TGtttatacccttCC	35_1	-20,33	9212
36	TCTCCTTATGACTCC	2-10-4	TCtcctttatgaCTCC	36_1	-23,29	10839
37	CTTCTCCTTATGACTC	2-13-2	CTtctcctttatgacTC	37_1	-19,26	10840
38	CCATTATTCCATTATT	4-13-2	CCATTattttccatttaTT	38_1	-22,32	15567
38	CCATTATTCCATTATT	2-15-2	CCattttattccatttaTT	38_2	-19,61	15567
39	CTTCCATTATTCCATT	2-14-4	CTttccattttatccATT	39_1	-23,14	15570
40	TCTTCCATTATTCCATT	2-14-4	TCttccattttatccCATT	40_1	-24,62	15571
41	ATTACCCATCCGTTCT	2-12-2	ATtaccatccgttCT	41_1	-21,15	21965
42	GCATTAGGCACATTACAT	3-12-3	GCAttaggcacattaCAT	42_1	-23,96	22211
43	ATTATTATTTAACCTTCATA	2-16-2	ATtattttaaaccttccTA	43_1	-19,28	30451
44	ACATTATTATTTAACCTTCC	4-14-2	ACATtattttaaaccttCC	44_1	-22,84	30453
44	ACATTATTATTTAACCTTCC	2-16-2	ACattttttaaaccttCC	44_2	-20,13	30453
45	CATTATTATTTAACCTTCC	4-13-2	CATTattttaaaccttCC	45_1	-22,04	30453
45	CATTATTATTTAACCTTCC	2-15-2	CAttattttaaaccttCC	45_2	-19,55	30453
46	CCTCTGCTTATAACTTT	2-13-2	CCtctgottataactTT	46_1	-19,15	30699
47	CTACTATACTTCCCT	2-11-4	CTacttatacttcCTCT	47_1	-22,32	30711
48	GTTCTACTATACTTCC	4-11-2	GTTCtacttatacttCC	48_1	-21,69	30714
48	GTTCTACTATACTTCC	2-13-2	GTtctacttatacttCC	48_2	-19,21	30714
49	CACCTGATAACAGACCCCT	3-12-3	CACctgataacagacCCT	49_1	-26,38	36068
50	CACCTGATAACAGACC	3-10-3	CACctgataacagACC	50_1	-21,10	36070
51	CCCACCAAAGGATATATT	3-12-3	CCCaacaaaggatatATT	51_1	-23,47	37208
52	ACCAGCTACAGGAACCTC	3-12-3	ACCagctacaggaacCTC	52_1	-26,57	46132
53	CTATATCTCACTCCTATT	4-13-2	CTATatctactcctatTT	53_1	-23,07	48143
53	CTATATCTCACTCCTATT	2-13-4	CTatatctactcctATT	53_2	-22,12	48143
54	CTATATCTCACTCCTATT	2-14-2	CTatatctactcctaTT	54_1	-19,40	48144

10

20

30

40

50

Seq ID NO	モチーフ	デザイン	化合物	CMP ID NO	ΔG°	開始位置 SEQ ID NO 1
54	CTATATCTCACTCCTATT	2-12-4	CTatatctcactccTATT	54_2	-22,28	48144
54	CTATATCTCACTCCTATT	3-12-3	CTAtatctcactcctATT	54_3	-21,44	48144
55	CTACTATATCTCACTCCTAT	2-16-2	CTactatatctcactcctAT	55_1	-22,00	48145
55	CTACTATATCTCACTCCTAT	2-14-4	CTactatatctcactcCTAT	55_2	-25,54	48145
56	TACTATATCTCACTCCTAT	2-13-4	TActatatctcactcCTAT	56_1	-23,29	48145
57	CTACTATATCTCACTCCTA	2-15-2	CTactatatctcactcCTA	57_1	-21,91	48146
58	TACTATATCTCACTCCTA	2-14-2	TActatatctcactcCTA	58_1	-19,66	48146
58	TACTATATCTCACTCCTA	2-12-4	TActatatctcactcCTA	58_2	-23,59	48146
58	TACTATATCTCACTCCTA	3-12-3	TACtatatctcactcCTA	58_3	-22,62	48146
59	CTACTATATCTCACTCCT	2-14-2	CTactatatctcactcCT	59_1	-21,25	48147
59	CTACTATATCTCACTCCT	4-12-2	CTACtatatctcactcCT	59_2	-23,87	48147
60	CTACTATATCTCACTCC	2-13-2	CTactatatctcactCC	60_1	-20,13	48148
60	CTACTATATCTCACTCC	2-11-4	CTactatatctcaCTCC	60_2	-23,00	48148
60	CTACTATATCTCACTCC	3-11-3	CTActatatctcacTCC	60_3	-22,56	48148
61	CCTACTATATCTCACTC	2-11-4	CCtactatatctcACTC	61_1	-21,93	48149
62	CTCCTACTATATCTCACTC	4-13-2	CTCCtactatatctcacTC	62_1	-25,69	48149
63	TCCTACTATATCTCACTC	3-12-3	TCCtactatatctcaCTC	63_1	-23,88	48149
64	CTCCTACTATATCTCACT	4-12-2	CTCCtactatatctcact	64_1	-24,87	48150
64	CTCCTACTATATCTCACT	3-12-3	CTCtactatatctcACT	64_2	-22,93	48150
65	TTT CCTCTCCTACTATATC	2-15-2	TTtcctctcactataTC	65_1	-21,23	48155
66	ATCCATATCCTTTCC	3-10-3	ATCcataatcccttCCT	66_1	-24,02	48168
67	CATCCATATCCTTTCC	4-11-2	CATCcatatcccttCT	67_1	-24,94	48168
68	ATCATCCATATCCTTTCC	4-12-2	ATCAccataatcccttCC	68_1	-25,69	48169
69	CATCATCCATATCCTTTC	4-12-2	CATCatccataatccTT	69_1	-23,32	48170
69	CATCATCCATATCCTTTC	2-14-2	CAtcatccataatccTT	69_2	-20,72	48170
69	CATCATCCATATCCTTTC	2-12-4	CAtcatccataatccTTTC	69_3	-22,56	48170
70	TACATCATCCATATCCTTC	2-16-2	TAcatcatccataatccTT	70_1	-22,45	48170
70	TACATCATCCATATCCTTC	4-14-2	TACATcatccataatccTT	70_2	-25,00	48170
70	TACATCATCCATATCCTTC	2-14-4	TAcatcatccataatccTTTC	70_3	-24,29	48170
71	ACATCATCCATATCCTT	3-12-3	ACAtcatccataatccTT	71_1	-22,11	48171
72	CATCATCCATATCCTT	2-13-2	CAtcatccataatccTT	72_1	-19,04	48171
72	CATCATCCATATCCTT	4-11-2	CATCatccataatccTT	72_2	-21,64	48171
73	TACATCATCCATATCCTT	2-15-2	TAcatcatccataatccTT	73_1	-20,76	48171
73	TACATCATCCATATCCTT	2-13-4	TAcatcatccataatccTTT	73_2	-23,36	48171
73	TACATCATCCATATCCTT	3-13-3	TACatcatccataatccTTT	73_3	-22,88	48171
74	ATACATCATCCATATCCTT	2-15-2	ATacatcatccataatccTT	74_1	-20,80	48172
74	ATACATCATCCATATCCTT	4-13-2	ATACatcatccataatccTT	74_2	-23,12	48172
75	TACATCATCCATATCCTT	2-14-2	TAcatcatccataatccTT	75_1	-19,97	48172
75	TACATCATCCATATCCTT	4-12-2	TACATcatccataatccTT	75_2	-22,52	48172
76	TATACATCATCCATATCCTT	2-16-2	TAtacatcatccataatccTT	76_1	-21,36	48172

10

20

30

40

50

Seq ID NO	モチーフ	デザイン	化合物	CMP ID NO	ΔG°	開始位置 SEQ ID NO 1
77	ATACATCATCCATATCCT	3-12-3	ATAcatcatccatatCCT	77_1	-24,15	48173
77	ATACATCATCCATATCCT	2-14-2	ATacatcatccatatCCT	77_2	-20,55	48173
77	ATACATCATCCATATCCT	2-13-3	ATacatcatccatatCCT	77_3	-22,92	48173
78	ATATACATCATCCATATCCT	2-16-2	ATatacatcatccatatCCT	78_1	-22,04	48173
79	TACATCATCCATATCCT	2-11-4	TAcatcatccataTCCT	79_1	-23,21	48173
79	TACATCATCCATATCCT	2-13-2	TAcatcatccatatCT	79_2	-19,71	48173
79	TACATCATCCATATCCT	4-11-2	TACAtcatccatatCT	79_3	-22,27	48173
80	TATACATCATCCATATCCT	2-15-2	TAtacatcatccatatCT	80_1	-21,11	48173
80	TATACATCATCCATATCCT	3-13-3	TATacatcatccatatCCT	80_2	-25,15	48173
80	TATACATCATCCATATCCT	4-13-2	TATAcatcatccatatCT	80_3	-24,01	48173
81	ATACATCATCCATATCC	3-11-3	ATAcatcatccataTCC	81_1	-21,79	48174
82	ATATACATCATCCATATCC	4-13-2	ATATAcatcatccatatCC	82_1	-23,73	48174
82	ATATACATCATCCATATCC	2-15-2	ATatacatcatccatatCC	82_2	-20,93	48174
83	TATACATCATCCATATCC	2-14-2	TAtacatcatccatatCC	83_1	-20,00	48174
83	TATACATCATCCATATCC	4-12-2	TATAcatcatccatatCC	83_2	-22,90	48174
84	TATATACATCATCCATATCC	2-16-2	TAtatacatcatccatatCC	84_1	-21,49	48174
84	TATATACATCATCCATATCC	4-14-2	TATAtacatcatccatatCC	84_2	-24,29	48174
85	GCTTCATATTCTCCA	2-12-2	GCttcatatttctcCA	85_1	-20,44	49345
86	CATCTGTCTTACCT	2-13-2	CAtcgttcttacCT	86_1	-19,67	49581
87	TATATTCAACCATTGCC	2-10-4	TAtttcaccaTGCC	87_1	-22,70	49724
88	CCTTATATTCAACCATTG	2-13-2	CCttatattcaccaTG	88_1	-19,44	49726
88	CCTTATATTCAACCATTG	2-11-4	CCttatattcaccaTTG	88_2	-21,25	49726
89	CCTCCTTATATTCACC	4-10-2	CCTCttatattcaCC	89_1	-24,64	49730
90	CCCTTCCTTATTCAA	3-10-3	CCCttccatttattCAA	90_1	-23,86	50189
91	CCTTACTGTTAACATCCT	2-13-2	CCttactgttaatCT	91_1	-19,81	50475
92	CAGGCAGATAACCTCCAA	3-12-3	CAGgcagataaacctcCAA	92_1	-25,31	52419
93	CAGCAGGCAGATAACCTC	3-12-3	CAGcaggcagataaacCTC	93_1	-25,88	52422
94	CGAATCTTGACATACAGG	3-12-3	CGAatcttgacatacAGG	94_1	-21,47	53955
95	CTCATACTTGCTTAAT	4-11-2	CTCAtactgcttaAT	95_1	-19,10	60821
95	CTCATACTTGCTTAAT	2-13-2	CTcatactgcttaAT	95_2	-16,35	60821
96	ACATCTCATACTTGCTT	2-11-4	ACatctcatacttGCTT	96_1	-21,31	60825
96	ACATCTCATACTTGCTT	2-13-2	ACatctcatacttgCTT	96_2	-17,66	60825
96	ACATCTCATACTTGCTT	2-12-3	ACatctcatacttgCTT	96_3	-19,52	60825
97	ACATCTCATACTTGCT	2-10-4	ACatctcatactTGCT	97_1	-21,18	60826
97	ACATCTCATACTTGCT	2-12-2	ACatctcatacttgCT	97_2	-17,70	60826
97	ACATCTCATACTTGCT	2-11-3	ACatctcatacttgGCT	97_3	-19,49	60826
97	ACATCTCATACTTGCT	4-10-2	ACATctcatacttgCT	97_4	-20,48	60826
98	TACATCTCATACTTGCT	2-11-4	TAcatctcatactTGCT	98_1	-22,33	60826
98	TACATCTCATACTTGCT	2-13-2	TAcatctcatacttgCT	98_2	-18,85	60826
98	TACATCTCATACTTGCT	4-11-2	TACAtctcatacttgCT	98_3	-21,40	60826

10

20

30

40

50

Seq ID NO	モチーフ	デザイン	化合物	CMP ID NO	ΔG°	開始位置 SEQ ID NO 1
99	CCTACATCTCATACTTGC	3-12-3	CCTacatctcatactTGC	99_1	-26,29	60827
99	CCTACATCTCATACTTGC	2-14-2	CCtacatctcatacttGC	99_2	-22,98	60827
99	CCTACATCTCATACTTGC	2-13-3	CCtacatctcatactTGC	99_3	-24,67	60827
99	CCTACATCTCATACTTGC	2-12-4	CCtacatctcatactTG	99_4	-25,70	60827
100	CTACATCTCATACTTGC	3-11-3	CTAcatctcatactTGC	100_1	-22,33	60827
100	CTACATCTCATACTTGC	2-13-2	CTacatctcatacttGC	100_2	-19,41	60827
100	CTACATCTCATACTTGC	2-12-3	CTacatctcatactTGC	100_3	-21,10	60827
101	TACATCTCATACTTGC	3-10-3	TACatctcatactTGC	101_1	-19,94	60827
101	TACATCTCATACTTGC	2-12-2	TAcatctcatacttGC	101_2	-17,15	60827
101	TACATCTCATACTTGC	2-11-3	TAcatctcatactTGC	101_3	-18,85	60827
101	TACATCTCATACTTGC	4-10-2	TACAtctcatacttGC	101_4	-19,71	60827
102	CCTACATCTCATACTTG	4-11-2	CCTAcatctcatactTG	102_1	-22,52	60828
102	CCTACATCTCATACTTG	2-13-2	CCtacatctcatactTG	102_2	-19,67	60828
102	CCTACATCTCATACTTG	3-12-2	CCTacatctcatactTG	102_3	-21,29	60828
102	CCTACATCTCATACTTG	3-11-3	CCTacatctcatactTG	102_4	-22,31	60828
103	ACCTACATCTCATACTT	3-11-3	ACCtacatctcataCTT	103_1	-21,93	60829
103	ACCTACATCTCATACTT	2-13-2	ACctacatctcataCTT	103_2	-17,76	60829
103	ACCTACATCTCATACTT	2-11-4	ACctacatctcatACTT	103_3	-20,03	60829
103	ACCTACATCTCATACTT	3-12-2	ACCtacatctcataCTT	103_4	-20,26	60829
104	CCTACATCTCATACTT	3-10-3	CCTacatctcataCTT	104_1	-21,50	60829
104	CCTACATCTCATACTT	2-12-2	CCtacatctcataCTT	104_2	-18,21	60829
104	CCTACATCTCATACTT	2-10-4	CCtacatctcatACTT	104_3	-20,48	60829
105	TACCTACATCTCATACTT	4-12-2	TACCTacatctcataCTT	105_1	-22,49	60829
105	TACCTACATCTCATACTT	2-14-2	TAccatcatctcataCTT	105_2	-18,81	60829
105	TACCTACATCTCATACTT	2-13-3	TAccatcatctcataCTT	105_3	-20,48	60829
105	TACCTACATCTCATACTT	2-12-4	TAccatcatctcatACTT	105_4	-21,08	60829
106	TTACCTACATCTCATACTT	3-13-3	TTAccatcatctcataCTT	106_1	-22,30	60829
106	TTACCTACATCTCATACTT	2-15-2	TTaccatcatctcataCTT	106_2	-19,40	60829
106	TTACCTACATCTCATACTT	2-14-3	TTaccatcatctcataCTT	106_3	-21,08	60829
106	TTACCTACATCTCATACTT	2-13-4	TTaccatcatctcatACTT	106_4	-21,67	60829
107	ACCTACATCTCATACT	4-10-2	ACCTacatctcataCT	107_1	-21,72	60830
107	ACCTACATCTCATACT	2-12-2	ACctacatctcataCT	107_2	-17,61	60830
107	ACCTACATCTCATACT	3-11-2	ACCtacatctcataCT	107_3	-20,10	60830
107	ACCTACATCTCATACT	2-10-4	ACctacatctcaTACT	107_4	-20,11	60830
108	TACCTACATCTCATACT	4-11-2	TACCTacatctcataCT	108_1	-22,34	60830
108	TACCTACATCTCATACT	2-13-2	TAccatcatctcataCT	108_2	-18,66	60830
108	TACCTACATCTCATACT	3-12-2	TACctacatctcataCT	108_3	-19,85	60830
108	TACCTACATCTCATACT	3-11-3	TACctacatctcatACT	108_4	-20,44	60830
109	TTACCTACATCTCATACT	2-12-4	TTaccatcatctcaTACT	109_1	-21,75	60830
109	TTACCTACATCTCATACT	2-14-2	TTaccatcatctcataCT	109_2	-19,25	60830

10

20

30

40

50

Seq ID NO	モチーフ	デザイン	化合物	CMP ID NO	ΔG°	開始位置 SEQ ID NO 1
109	TTACCTACATCTCATACT	3-13-2	TTAActacatctcatcaCT	109_3	-20,48	60830
109	TTACCTACATCTCATACT	3-12-3	TTAActacatctcatACT	109_4	-21,08	60830
110	TTACCTACATCTCATAC	3-11-3	TTAActacatctcaTAC	110_1	-19,50	60831
110	TTACCTACATCTCATAC	2-13-2	TTAcctacatctcatAC	110_2	-16,37	60831
111	GTTACCTACATCTCATA	2-11-4	GTtacctacatctCATA	111_1	-21,69	60832
111	GTTACCTACATCTCATA	2-13-2	GTtacctacatctcaTA	111_2	-18,74	60832
111	GTTACCTACATCTCATA	3-12-2	GTTAcctacatctcaTA	111_3	-19,98	60832
112	GTTACCTACATCTCAT	3-10-3	GTTAcctacatctCAT	112_1	-20,69	60833
112	GTTACCTACATCTCAT	2-12-2	GTtacctacatctcAT	112_2	-17,37	60833
113	ATATACCCAAAGGCACCT	3-12-3	ATAtacccaaaggcaCCT	113_1	-25,99	62200
114	TCTACTCATCCTTAACTCA	2-14-4	TCtactcatccttaaCTCA	114_1	-25,63	62251
115	CCTTAATCTGTATCACT	2-13-2	CCtaatctgtatcaCT	115_1	-19,58	62286
116	CCATACACAGCACATA	2-12-2	CCatcacagcacata	116_1	-19,04	62424
117	CTCCATACACAGCACAT	2-13-2	CTccatamacagcacAT	117_1	-20,08	62425
118	CAGAATAATTCTCCTCC	2-13-2	CAgataattctccCT	118_1	-19,86	62441
119	GTCCTACATATATACC	4-10-2	GTCCTacatataCC	119_1	-22,09	66380
120	TGCTTCCTTACTAACCC	4-10-2	TGCTtcctactaaCC	120_1	-23,93	66701
120	TGCTTCCTTACTAACCC	2-12-2	TGcttcctactaaCC	120_2	-20,10	66701
121	CCCTTTGTAATCATCT	4-10-2	CCCTTgtaatcatCT	121_1	-23,44	66838
122	TCCCTTTGTAATCATCT	2-13-2	TCccttgtaatcatCT	122_1	-19,97	66838
123	CTGCCATCAATACCAT	2-12-2	CTgccatcaataccAT	123_1	-19,14	68918
124	TCACTGCCATCAATACC	2-13-2	TCactgccatcaataCC	124_1	-21,35	68920
125	ATTCTTACTTTATTCCTCA	2-15-2	ATtcttactttatccCA	125_1	-20,16	70033
126	TCACTTCCAGATATCA	4-11-2	TCACttccagatatCA	126_1	-21,61	77567
126	TCACTTCCAGATATCA	2-13-2	TCacttccagatatCA	126_2	-18,65	77567
127	TCCTTCAAATTCACATAC	3-13-3	TCCttcaaattccacataTAC	127_1	-24,09	82053
128	ACATGTCCCTTATATT	4-11-2	ACATgtcccttataTT	128_1	-20,87	92323
128	ACATGTCCCTTATATT	2-13-2	ACatgtcccttataTT	128_2	-17,66	92323
128	ACATGTCCCTTATATT	3-12-2	ACAtgtcccttataTT	128_3	-19,13	92323
128	ACATGTCCCTTATATT	3-11-3	ACAtgtcccttataTT	128_4	-20,03	92323
129	ACATGTCCCTTATAT	3-10-3	ACAtgtcccttataTAT	129_1	-20,11	92324
129	ACATGTCCCTTATAT	2-12-2	ACatgtcccttataAT	129_2	-16,74	92324
130	CCAAGAAAGGAGCAAGCT	3-12-3	CCAagaaaaggagcaaGCT	130_1	-25,26	97146
131	TCCAAGAAAGGAGCAAGC	3-12-3	TCCaagaaaaggagcaAGC	131_1	-24,12	97147
132	CTCATCCCTCCAAGAAA	4-11-2	CTCATccctccaagaAA	132_1	-22,58	97156
132	CTCATCCCTCCAAGAAA	2-13-2	CTcatccctccaagaAA	132_2	-19,83	97156
132	CTCATCCCTCCAAGAAA	3-12-2	CTCatccctccaagaAA	132_3	-21,11	97156
133	TCATCCCTCCAAGAAA	4-10-2	TCATccctccaagaAA	133_1	-20,41	97156
133	TCATCCCTCCAAGAAA	2-12-2	TCatccctccaagaAA	133_2	-17,63	97156
133	TCATCCCTCCAAGAAA	3-11-2	TCAtccctccaagaAA	133_3	-19,09	97156

10

20

30

40

50

Seq ID NO	モチーフ	デザイン	化合物	CMP ID NO	$\Delta G^\circ$	開始位置 SEQ ID NO 1
133	TCATCCCTCCAAGAAA	3-10-3	TCAtccctccaagAAA	133_4	-19,81	97156
134	CACCTCCCTATTACATAAA	4-13-2	CACCtccctattacataAA	134_1	-24,18	100018
134	CACCTCCCTATTACATAAA	2-15-2	CAcctccctattacataAA	134_2	-20,51	100018
135	CACCTCCCTATTACATAA	4-12-2	CACCtccctattacatAA	135_1	-23,75	100019
135	CACCTCCCTATTACATAA	2-14-2	CAcctccctattacatAA	135_2	-20,07	100019
136	CCTCCCTATTACATAA	2-12-2	CCtccctattacatAA	136_1	-18,40	100019
137	CTAAATCTTCCAATTCTA	2-15-2	CTaaatcttccaattcaTA	137_1	-18,12	106139
138	TATCCCTTGATTATCCT	2-13-2	TAtcccttgattatcCT	138_1	-20,68	109406
139	CCTCTTTGTCAAATACT	2-13-2	CCctttgtcaaataCT	139_1	-19,30	110768
140	CAGCTTATTTACCTCTT	2-13-2	CAgcttattacctcTT	140_1	-19,30	114828
141	ACTCTTTACCTCTAACACT	4-13-2	ACTCtttacctctaacaCT	141_1	-24,26	117468
142	TTACTCTTACCTCTAACAC	3-14-3	TTActctttacctctaaCAC	142_1	-23,23	117469
143	CCAACCTAATACCTTAATA	2-15-2	CCaacctaataacctaaTA	143_1	-20,27	118639
144	TACCAACCTAATACCTTAA	2-15-2	TAccaacctaataaccttAA	144_1	-18,32	118641
145	CCAATACCCACAAACC	3-10-3	CCAatacccacaaACC	145_1	-23,17	124162
145	CCAATACCCACAAACC	2-12-2	CCAatacccacaaaACC	145_2	-20,85	124162
146	CCATTATTCTACTTTGT	3-11-3	CCAttattctacttTGT	146_1	-21,79	125501
146	CCATTATTCTACTTTGT	2-13-2	CCattattctacttGT	146_2	-18,63	125501
147	CATTTCCCTATCTTCACA	2-14-2	CAttcccttatcttcACA	147_1	-20,39	125529
148	TCATTTCCCTATCTTCACA	4-13-2	TCATttcccttatcttcACA	148_1	-24,13	125529
149	AATAATTCCCTATTCCT	2-14-2	AAtaattccctatttcCT	149_1	-18,01	125539
150	ACAATAATTCCCTATTCCT	3-13-3	ACAataattccctatttTCC	150_1	-22,71	125540
150	ACAATAATTCCCTATTCCT	2-15-2	ACaataattccctatttCC	150_2	-20,23	125540

### 【 0 1 8 0 】

デザインは、それぞれの数字が、連続する修飾ヌクレオチド、例えば2'修飾ヌクレオシドの数（最初の数 = 5' フランク）、続いてDNAヌクレオシドの数（2番目の数 = ギャップ領域）、続いて修飾ヌクレオシド、例えば2'修飾ヌクレオシドの数（3番目の数 = 3' フランク）を表す、ギャップマークデザインF-G-F'を指し、これには、任意で、標的核酸に相補的である連続した配列の非必須部分であるDNAおよびLNAのさらなる繰り返し領域が前後にあってもよい。

### 【 0 1 8 1 】

オリゴヌクレオチド化合物に関して、大文字はベータ-D-オキシLNAヌクレオシドを表し、小文字はDNAヌクレオシドを表し、LNA Cはすべて5-メチルシトシンであり、5-メチルDNAシトシンは“e”で表され、ヌクレオシド間連結はいずれもホスホロチオエートヌクレオシド間連結である。

### 【 0 1 8 2 】

#### オリゴヌクレオチド合成

オリゴヌクレオチド合成は当技術分野において広く公知である。以下は適用することができるプロトコールである。本発明のオリゴヌクレオチドは、使用される装置、支持体、および濃度の点でわずかに相違する方法によって作製されたものであります。

### 【 0 1 8 3 】

オリゴヌクレオチドは、MerMade12またはOligomaker DNA/RNA合成装置において、ウリジンユニバーサル支持体上、ホスホラミダイトアプローチを使用して、1 ~ 4  $\mu$  molスケールで合成される。合成の最後に、アンモニア水溶液を使用し、60 °C で5 ~ 16時間にわたって、オリゴヌクレオチドを固体支持体から切り離す。オリゴヌクレオチドを逆相HPLC (RP-HPLC) または固相抽出によって精製し、UPLCによって特徴づけ、さらに分子質

10

20

30

40

50

量をESI-MSで確認する。

#### 【0184】

オリゴヌクレオチドの伸長:

-シアノエチル-ホスホラミダイト(DNA-A(Bz)、DNA-G(ibu)、DNA-C(Bz)、DNA-T、LNA-5-メチル-C(Bz)、LNA-A(Bz)、LNA-G(dmf)、LNA-Tまたはアミノ-C6リンカー)のカップリングは、アセトニトリル中0.1Mの5'-O-DMT-保護アミダイト溶液および活性化剤としてのアセトニトリル中のDCI(4,5-ジシアノイミダゾール)(0.25M)を使用して行われる。最終サイクルについては、所望の修飾を持つホスホラミダイト、例えばコンジュゲート基を取り付けるためのC6リンカー、またはコンジュゲート基そのものを使用することができる。ホスホルチオエート連結を導入するためのチオール化はキサンタンヒドリド(アセトニトリル/ピリジン9:1中、0.01M)を使用して実行される。ホスホルジエステル連結は、THF/ピリジン/水7:2:1中の0.02Mヨウ素を使用して導入することができる。残りの試薬は、オリゴヌクレオチド合成に典型的に使用されるものである。

10

#### 【0185】

RP-HPLCによる精製:

粗化合物は、Phenomenex Jupiter C18 10 μ 150 × 10mmカラムでの分取用RP-HPLCによって精製する。0.1M酢酸アンモニウムpH8およびアセトニトリルを緩衝液として5mL/分の流速で使用する。収集したフラクションを凍結乾燥することで、精製された化合物を典型的には白色固体として得る。

20

略号:

DCI: 4,5-ジシアノイミダゾール

DCM:ジクロロメタン

DMF:ジメチルホルムアミド

DMT: 4,4'-ジメトキシトリチル

THF:テトラヒドロフラン

Bz:ベンゾイル

Ibu:イソブチリル

RP-HPLC:逆相高速液体クロマトグラフィー

#### 【0186】

T<sub>m</sub>アッセイ

30

オリゴヌクレオチドおよびRNA標的二重鎖を500mlのRNaseフリー水に3mMまで希釈し、500mlの2×T<sub>m</sub>緩衝液(200mM NaCl、0.2mM EDTA、20mM リン酸Na、pH7.0)と混合する。その溶液を95℃に3分間加熱してから、室温で30分間アニールさせる。二重鎖融解温度(T<sub>m</sub>)は、PE Templatソフトウェア(Perkin Elmer)を使用して、ペルチエ温度プログラマーPTP6を装備したラムダ40UV/VIS分光測光器で測定する。260nmでの吸光を記録しながら、温度を20℃から95℃まで上昇させた後、25℃まで降下させる。融解とアニーリングの両方の一次導関数および極大を使用して、二重鎖T<sub>m</sub>を評価する。

#### 【0187】

マウス初代皮質神経細胞培養物の調製

初代皮質ニューロン培養物は、標準的手順に従って、15日齢のマウス胎児脳から調製した。簡単に述べると、培養プレートを、ポリ-L-リジン(50 μg/mlポリ-L-リジン、10mM四ホウ酸塩Na、pH8緩衝液)により、室温で2~3時間コーティングした。プレートを使用前に1×PBSで洗浄した。採取したマウス胎児脳をカミソリの刃で切離、ホモジナイズし、38mlの切離培地(HBSS、0.01M Hepes、ペニシリン/ストレプトマイシン)に浸漬した。次に、2mlトリプシンを加え、細胞を37℃で30分間インキュベートし、遠沈した。細胞を20ml DMEM(+10%FBS)に溶解し、さらにホモジナイズするためにシリンドリに通した。次に500rpmで15分間遠心分離した。細胞をDMEM(+10%FBS)に溶解し、96ウェルプレートに播種した(100 μl中に0.1 × 10<sup>6</sup>細胞/ウェル)。神経細胞培養物は、播種後すぐに使用できる状態になった。

40

#### 【0188】

50

マウス初代皮質神経細胞培養物におけるオリゴヌクレオチドのスクリーニング  
96ウェルプレートにおいて、細胞を成長培地 (Gibco Neurobasal培地、B27サブリメント、Glutamax、ペニシリン-ストレプトマイシン) 中で培養し、所望の濃度で3日間、オリゴヌクレオチドと共にインキュベートした。全RNAを細胞から単離し、Quanta Bioscience製のqScript (商標) XLT One-Step RT-qPCR ToughMix (登録商標)、Low ROX (商標) キット (95134-500) を使用して、qPCR分析により、ノックダウン有効性を測定した。Thermo Fisher Scientific製の市販taqmanアッセイを使用して、正規化のためのGAPDHを含めて、Ube3a\_ATSを測定した。

## 【0189】

## ヒト初代神経細胞培養物の作製

10

記載したどの時点でも、すべての細胞株を、37℃、5%CO<sub>2</sub>濃度、相対湿度95%でインキュベートした。

## 【0190】

## ヒト人工多能性幹細胞 (hIPSC) 培養

アンジェルマン症候群と診断された患者からヒト全血試料を得た。以後の初代末梢血単核球 (PBMC) の培養では赤芽球が濃縮された。CytoTune-iPSセンダイリプログラミングキット (Thermo Fisher Scientific) で赤芽球をリプログラムすることによって、患者特異的IPSC株を作製した。誘導IPSC株は、mTESR1 (STEMCELL Technologies) 中、hESC-qualified Matrigel (Corning) を使用して、毎日培地交換をしながら、フィーダーフリー条件で維持した。コンフルエントになったら、Gentle Cell Dissociation Reagent (STEMCELL Technologies) を使用してコロニーを50~200 μmサイズの細胞クラスターに解離し、10 μM Y-27632 (Calbiochem) の存在下、1:10~1:20の比で継代培養した。

20

## 【0191】

## 神経系始原細胞 (NPC) への分化

神経系分化の誘導後は、1×B27 (Gibco, Invitrogen)、1×N2 (Gibco, Invitrogen)、0.1 mMベータ-メルカプトエタノール (Gibco, Invitrogen) および表示のサブリメントを補足した等体積のDMEM:F12 Glutamax培地およびNeurobasal培地 (Gibco, Invitrogen) で構成される基本培地中で、IPSC由来細胞を維持した。

30

## 【0192】

神経系始原細胞 (NPC) は、二重SMAD阻害により、公表された手順にわずかな変更を加えて、hIPSCから誘導した (Chambers et al. 2009 Nat Biotechnol. Vol. 3 pp.275-80、Boissart et al., 2013 Transl Psychiatry. 3:e294)。hIPSCを、Accutase (Innovative Cell Technologies Inc.) で単一細胞懸濁液に解離し、10 μM Y-27632 (Calbiochem)、5ng/ml FGF (Peprotech)、10 μM SB-431542 (Calbiochem) および100nM LDN (Calbiochem) をさらに補足したMT培地に再懸濁した。単一細胞懸濁液をAggreWell800プレート (STEMCELL Technologies) に移して、8000細胞からなる凝集物の形成を可能にした。5日後に、神経凝集物を、ポリ-L-オルニチン (Sigma) およびラミニン (Roche) でコーティングされたプレートに移し、FGFを補足した基本培地中、二重SMAD阻害 (SB-431542およびLDN) を継続しつつ、神経口ゼットを形成させた。STEMdiff (商標) 神経口ゼット選択試薬 (STEMCELL Technologies) を使用して神経口ゼットを選択的に単離し、ポリ-L-オルニチンおよびラミニン521 (BioLamina) でコーティングしたディッシュに再プレーティングし、10ng/ml FGF (Peprotech)、10 ng/ml EGF (RnD)、および20ng/ml BDNF (Peprotech) を補足した基本培地中で拡大培養した。コンフルエントになったら、細胞を0.05%トリプシン/EDTA (Gibco, Invitrogen) で酵素的に解離し、継代培養した。FGF、EGFおよびBDNFを補足した基本培地における継代の継続は、10~20継代以内に安定神経系始原細胞株 (NPC株) をもたらす。安定神経系始原細胞株は、その自己複製能ならびに発生段階特異的マーカーSox2およびネスチンの発現によって定義される。特別な刺激を受けると、NPCはニューロン子孫 (MAP2+、Tau+、HuC/D+) およびアストログリア子孫 (GFAP+) に分化する (Dunkle 40

40

50

y et al., 2015 Proteomics Clin Appl. Vol. 7-8 pp.684-94)。

#### 【0193】

##### NPC培養

NPC培養の条件は以前に記載されており、それにわずかな変更を加えて使用した (Boissart et al., 2013 Transl Psychiatry. 3:e294)。簡単に述べると、細胞をラミン521 (BioLamina) でコーティングしたディッシュに維持し、10ng/ml FGF (Peprotech) 、10ng/ml EGF (RnD) 、および20ng/ml BDNF (Peprotech) を補足した基本培地 [1×B27 (Gibco, Invitrogen) 、1×N2 (Gibco, Invitrogen) 、0.1mMベータ-メルカプトエタノール (Gibco, Invitrogen) を補足した等体積のDMEM:F12 Glutamax培地およびNeurobasal培地 (Gibco, Invitrogen) で構成されるもの] 中で培養した。

10

#### 【0194】

##### 神経細胞培養物への分化

NPCのニューロン分化を誘導するために、細胞を0.05%トリプシン/EDTA (Gibco, Invitrogen) で単一細胞懸濁液に解離し、ラミン521 (BioLamina) コートディッシュに12,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で播種し、200ng/ml Shh (Peprotech) 、100ng/ml FGF8 (Peprotech) 、および100 μMアスコルビン酸リン酸エステル (Sigma) を補足した基本培地中で7日間維持した。次に、20ng/ml BDNF (Peprotech) 、10ng/ml GDNF (Peprotech) 、0.5mM cAMP (BIOLOG Life Science) 、および100 μMアスコルビン酸リン酸エステル (Sigma) を補足した基本培地に、細胞を45000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で再プレーティングし、21日間、分化させた。分化の21日目に、分化ニューロン培養物を、スクリーニングに適合したプレートフォーマットに再プレーティングした。再プレーティングは、培養をAccutase (Innovative Cell Technologies Inc.) で単一細胞懸濁液に解離することによって行った。最終オリゴヌクレオチドスクリーニングアッセイのために、細胞を、384ウェルマイクロタイタープレートに、10 μM Y-27632 (Calbiochem製の細胞透過性で可逆的なRhoキナーゼ阻害剤) の存在下、200,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で播種した。20ng/ml BDNF (Peprotech) 、10ng/ml GDNF (Peprotech) 、0.5mM cAMP (BIOLOG Life Science) 、および100 μMアスコルビン酸リン酸エステル (Sigma) を補足した基本培地中で、さらに7日にわたって、ニューロン培養物をさらに分化させた。分化培地は週に2回交換した。神経細胞培養物は、35日の全分化期間後に、オリゴヌクレオチド処理の準備が整った。

20

#### 【0195】

##### ヒト神経細胞培養物におけるオリゴヌクレオチドのスクリーニング

スクリーニングのために、オリゴヌクレオチドストックを、384ウェルマイクロタイタープレート (化合物プレート) に、表示した濃度まで水で事前希釈した。このプレートレイアウトを処理テンプレートとした。化合物プレートから各培養プレートに、各ウェルから2マイクロリットルのオリゴヌクレオチド希釈液を移した。液体のハンドリングはすべて、半自動実験ロボットシステム (Beckman Coulter) を使用して、層流中、滅菌条件下で行った。神経細胞培養物をオリゴヌクレオチドと共に培地を変えずに5日にわたってインキュベートした。次に、RealTime ready Cell lysisキットおよびRealTime ready RNA Virus Masterキット (Roche) を使用して、qPCRアッセイのために、ニューロン培養物を溶解し、加工した。液体のハンドリングは半自動実験ロボットシステム (Beckman Coulter) を使用して行った。Lightcycler480リアルタイムPCRシステム (Roche) によって試料を分析した。

30

#### 【0196】

以下のプライマーおよびプローブを使用してUBE3Aの転写産物存在量をモニタリングするqPCRにより、オリゴヌクレオチドの活性を評価した。

UBE3a-センス: フォワードプライマー:

ATATGTGGAAGCCGGAATCT

40

リバースプライマー:

50

TCCCAGAACTCCCTAACAGAA

色素FAMで標識された内部プローブ:  
ATGACGGTGGCTATACCAGG

【0197】

PPIA (ペプチジルプロリルイソメラーゼA)を正規化のためのハウスキーピング遺伝子にして、RT-qPCRをマルチプレックス化した。PPIAプライマーおよび色素VICで標識されたプローブはThermo Fisher Scientificから購入した(アッセイID Hs99999904\_m1)。各プレートは、陰性対照としての非ターゲティングオリゴヌクレオチド(モック)(TTGaataagtggaTGT) 10

、およびUBE3A mRNAのアップレギュレーションをもたらすリファレンスオリゴヌクレオチドCMP ID NO:41\_1を含む。

【0198】

オリゴヌクレオチドの選択性は、15番染色体上でSNORD109Bの上流に位置するSNORD115転写産物に関する対比スクリーニング(counter screening)によって検証した。SNORD115の発現は以下のプライマーおよびプローブを使用するqPCRによってモニタリングした。

フォワードプライマー:

GGGTCAATGATGAGAACCTTAT 20

リバースプライマー:

GGGCCTCAGCGTAATCCTATT

色素FAMで標識された内部プローブ:

TTCTGAAGAGAGGTGATGACTAAAA

【0199】

オリゴヌクレオチド処理後にPPIA (Thermo Fisher Scientific)でRT-qPCRをマルチプレックス化した。 30

【0200】

以下のプライマーおよびプローブを用いるRT-qPCRにより、SNORD109B下流のSNHG14転写産物(UBE3Aサプレッサーとも呼ばれる)の低減を測定した。

フォワードプライマー:

ATCCGAGGCATGAATCTCAC

リバースプライマー:

CAGGCCAAAACCCTTGATAA 40

色素FAMで標識された内部プローブ:

TTGCTGAGCATTTTGATC

【0201】

PPIA (Thermo Fisher Scientific)でRT-qPCRをマルチプレックス化した。

【0202】

データは、すべてのプレートにわたって、モックと比較した平均%発現として表し、プレート間変動を説明するためにリファレンスオリゴヌクレオチドに対応させて正規化した。

【0203】

ヒト神経細胞培養物におけるオリゴヌクレオチドのスクリーニング - 96ウェル系 50

スクリーニングのために、オリゴヌクレオチドストックを、96ウェルマイクロタイプレート（化合物プレート）に、表示した濃度まで水で事前希釈した。このプレートレイアウトを処理テンプレートとした。化合物プレートから各培養プレートに、各ウェルから2マイクロリットルのオリゴヌクレオチド希釈液を移した。液体のハンドリングはすべて、半自動実験口ボットシステム（Beckman Coulter）を使用して、層流中、滅菌条件下で行った。神経細胞培養物をオリゴヌクレオチドと共に培地を変えずに5日にわたってインキュベートした。次に、ニューロン培養物を溶解し、RNA精製キットPure Link Pro96（12173011A）Life Technologiesを使用して、RNAを精製した。液体のハンドリングは半自動実験口ボットシステム（Beckman Coulter）を使用して行った。Ube3aおよびUbe3a-ATSのqPCR分析は、ViiA（商標）リアルタイムPCRシステム（Thermo Fisher Scientific）で、Quanta製のqScript（商標）XLT 1-Step RT-qPCR ToughMix Low ROX（95134-50）を使用して行った。10

#### 【0204】

以下のプライマーおよびプローブを使用した。

qPCR UBE3a-センス:

フォワードプライマー:

ATATGTGGAAGCCGGAATCT

リバースプライマー:

TCCCAGAACTCCCTAACAGAA20

色素FAMで標識された内部プローブ:

ATGACGGTGGCTATACCAGG

#### 【0205】

SNORD109B下流のqPCR SNHG14転写産物（UBE3Aサプレッサーとも呼ばれる）:

Thermo Fisher製の市販プライマーおよびプローブセット: Hs01372957\_m1。これらのプライマーは、Genbank転写産物AF400500.1中の87bpエクソン-エクソントンスパンニング配列を増幅する。30

#### 【0206】

qPCR GAPDH転写産物:

Thermo Fisher製の市販プライマーおよびプローブセット: 遺伝子記号: アッセイの詳細は次のとおり: RefSeq: NM\_002046.3、プローブエクソン位置: 3、アンプリコンサイズ: 122 bp。対応TaqManアッセイID: Hs99999905\_m1.

#### 【0207】

Ube3aおよびUbe3a-ATSのRT-qPCRはどちらも、GAPDHを正規化のためのハウスキーピング遺伝子として、マルチプレックス化した。各プレートは、陰性対照としての非ターゲティングオリゴヌクレオチド（モック）  
(TTGataagtggATGT)

、およびUBE3A mRNAのアップレギュレーションをもたらすリファレンスオリゴヌクレオチドCMP ID NO:21\_1を含む。さらに、アッセイノイズおよび偽陽性検出リスクをモニタリングするために、Ube3a転写産物もSNORD109B下流のSNHG14転写産物（UBE3Aサプレッサーとも呼ばれる）も標的としない対照オリゴヌクレオシドのパネルを含めた。これらはプレート上にランダムに分布させた。40

#### 【0208】

対照オリゴヌクレオチド:

配列

CGAaccactgaaCAA  
 CGAaccactgaacAAA  
 CGAagtgcacaCG  
 GCGtaaagagaGGT  
 GAGAaggcacagaCGG  
 GCGaagtgcacaCGG  
 GAGaaggcacagaCGG  
 CGAaccactgAACAA  
 GAAccactgaacAAA

10

caGCGtaaagagaGG  
 GCgtaaagagAGG  
 CGAaccactgaAC  
 CGAAccactgaaCAAA  
 AGCgaagtgcacaCGG  
 AGGtgaagcgaAGTG  
 TAGTaaactgagCCA  
 AGAaggcacagaCGG  
 CCGcagtatggaTCG

20

## 【 0 2 0 9 】

カニクイザル初代神経細胞培養物の作製

記載したどの時点でも、すべての細胞株を、37℃、5%CO<sub>2</sub>濃度、相対湿度95%でインキュベートした。

30

## 【 0 2 1 0 】

カニクイザル人工多能性幹細胞（cIPSC）培養

すべての動物実験は米国国立衛生研究所のガイドラインに従って行い、Roche（米国07110ニュージャージー州ナトリー、キングスランドストリート340（2014年に閉鎖））に所属する施設内動物実験委員会（IACUC）によって承認された。カニクイザルIPSCを、雌14歳モーリシャスカニクイザルの腎線維芽細胞から、山中因子（Oct4、Sox2、Klf4、およびC-Myc）（Takahashi, K. & Yamanaka, S., 2006）を保因するセンダイウイルス粒子（CytoTune-iPSセンダイリプログラミングキット、Thermo Fisher Scientific）を使用して樹立した。トランスフェクションの5日後に、細胞をマイトイマイシンC不活化フィーダー上に、さまざまな密度で移し、hESC培地（20%ノックアウト血清代替物、0.1mM非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン、0.1mM 2-メルカプトエタノール、および8ng/ml bFGFを補足したノックアウトDMEM:F12、いずれもLife Technologies製）中で培養した。トランスフェクションの20日後に、ES様の形態を持つクローンをさらなる継代のために選択した。3~4日ごとに、コロニーを手作業で解離することにより、細胞を定期的に継代した。Ono et al.; 2014に基づき、細胞をMatrigel（BD Bioscience）コートプレート上で培養し、細胞が単一細胞懸濁液の状態にある場合はチアゾビシンの代わりにY-27632（Calbiochem）を使用するという変更を加えることで、少なくとも10継代後には、cIPSCは、フィーダーフリー培養条件（15ng/ml FGF2（Peprotech）および10ng/mlアクトビンA（Peprotech）を補足したMT培地）に適応した。MT培地は、2.5mM GlutaMAX（商標）、7μg/mlインスリン、450μMモノチオグリセロール、1×脂質濃縮物、5

40

50

mg/ml BSA、14ng/ml亜セレン酸ナトリウム、1×非必須アミノ酸、2mg/mlヘパリン、15μg/mlトランスフェリン、および220μMアスコルビン酸-2-リン酸を含む、ハムのF12栄養混合物を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM/F12)を含有する合成培地である。Gentle Cell Dissociation Reagent(STEMCELL Technologies)を使用して細胞を2~4日ごとに継代した。さらなる実験のために1つのクローンを選び、以後のすべてのアッセイにそれを使用した。

#### 【0211】

神経系始原細胞(NPC)への分化

神経系分化の誘導後は、1×B27(Gibco, Invitrogen)、1×N2(Gibco, Invitrogen)、0.1mMベータ-メルカプトエタノール(Gibco, Invitrogen)および表示のサプリメントを補足した等体積のDMEM:F12 Glutamax培地およびNeurobasal培地(Gibco, Invitrogen)で構成される基本培地中で、cIPSC由来細胞(図4、1日目参照)を維持した。

10

#### 【0212】

神経系始原細胞(NPC)は、二重SMAD阻害により、公表された手順にわずかな変更を加えて、cIPSCから誘導した(Chambers et al. 2009 Nat Biotechnol. Vol. 3 pp.275-80、Boissart et al., 2013 Transl Psychiatry. 3:e294)。cynoIPSCを、Accutase(Innovative Cell Technologies Inc.)で単一細胞懸濁液に解離し、10μM Y-27632(Calbiochem)を補足したMT培地に再懸濁した。単一細胞懸濁液をAggreWell800プレート(STEMCELL Technologies)に移して、12000細胞からなる凝集物の形成を可能にした(図4:EB形成参照)。次の連続5日間は、AggreWellあたり1.5mlの培地を、5ng/ml FGF(Peprotech)、10μM SB-431542(Calbiochem)および100nM LDN-193189(Calbiochem)を補足した基本培地で置き換えた。5日後に、神経凝集物を、ポリ-L-オルニチン(Sigma)およびラミニン(Roche)でコーティングされたプレートに移し、FGFを補足した基本培地中、二重SMAD阻害(SB-431542およびLDN-193189)を継続しつつ、神経口ゼットを形成させた(図4:収集参照)。手作業による切離によって神経口ゼットを選択的に単離した後、BioLamina製のポリ-L-オルニチンおよびラミニン521でコーティングされたディッシュに再プレーティングし(図4:神経口ゼット単離参照)、10ng/ml FGF(Peprotech)、10ng/ml EGF(RnD)、および20ng/ml BDNF(Peprotech)を補足した基本培地中で拡大培養した。コンフルエントになったら、細胞を0.05%トリプシン/EDTA(Gibco, Invitrogen)で酵素的に解離し、継代培養した。FGF、EGFおよびBDNFを補足した基本培地における継代の継続は、5~10継代以内に安定神経系始原細胞株(NPC株)をもたらす(図4、24~45日目参照)。安定神経系始原細胞株は、その自己複製能ならびに発生段階特異的マーカーSox2およびネスチングの発現によって定義される。特別な刺激を受けると、カニクイザルNPCは神経MAP2+細胞に分化する。

20

#### 【0213】

NPC培養

NPC培養の条件は以前に記載されており、それにわずかな変更を加えて使用した(Boissart et al., 2013 Transl Psychiatry. 3:e294)。簡単に述べると、細胞をラミニン521(BioLamina)でコーティングしたディッシュに維持し、10ng/ml FGF(Peprotech)、10ng/ml EGF(RnD)、および20ng/ml BDNF(Peprotech)を補足した基本培地[1×B27(Gibco, Invitrogen)、1×N2(Gibco, Invitrogen)、0.1mMベータ-メルカプトエタノール(Gibco, Invitrogen)を補足した等体積のDMEM:F12 Glutamax培地およびNeurobasal培地(Gibco, Invitrogen)で構成されるもの]中で培養した。

40

#### 【0214】

神経細胞培養物への分化

NPCのニューロン分化を誘導するために、細胞を0.05%トリプシン/EDTA(Gibco, Invitrogen)で単一細胞懸濁液に解離し、ラミニン521(BioLamina)コートディッシュに30,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で播種し、200ng/ml Shh(Peprotech)、100ng/ml FGF8(Peprotech)、および100μMアスコルビン酸リン酸エステル(Sigma)を補足した基本培地中で7日間維持した。次に、20ng/ml BDNF(Peprotech)、10ng/ml GDNF(Pe

50

protech)、0.5 mM cAMP (BIOLOG Life Science)、および100 μM アスコルビン酸リン酸エステル (Sigma) を補足した基本培地に、細胞を45000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で再プレーティングし、21日間、分化させた。分化の21日目に、分化NCを解離し、スクリーニングに適合したプレートフォーマットに再プレーティングした。再プレーティングは、培養をAccutase (Innovative Cell Technologies Inc.) で単一細胞懸濁液に解離することによって行った。最終オリゴヌクレオチドスクリーニングアッセイのために、細胞を、384ウェルマイクロタイプレートに、10 μM Y-27632 (Calbiochem製の細胞透過性で可逆的なRhoキナーゼ阻害剤) の存在下、200000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で播種した。20ng/ml BDNF (Peprotech)、10ng/ml GDNF (Peprotech)、0.5 mM cAMP (BIOLOG Life Science)、および100 μM アスコルビン酸リン酸エステル (Sigma) を補足した基本培地中で、さらに7日にわたって、ニューロン培養物をさらに分化させた。分化培地は週に2回交換した。神経細胞培養物は、35日の全分化期間後に、オリゴヌクレオチド処理の準備が整った。

#### 【0215】

カニクイザル神経細胞培養物におけるオリゴヌクレオチドのスクリーニング - 96ウェル系スクリーニングのために、オリゴヌクレオチドストックを、96ウェルマイクロタイプレート (化合物プレート) に、表示した濃度まで水で事前希釈した。このプレートレイアウトを処理テンプレートとした。化合物プレートから各培養プレートに、各ウェルから2マイクロリットルのオリゴヌクレオチド希釈液を移した。液体のハンドリングはすべて、半自動実験口ボットシステム (Beckman Coulter) を使用して、層流中、滅菌条件下で行った。神経細胞培養物をオリゴヌクレオチドと共に培地を変えずに5日にわたってインキュベートした。次に、ニューロン培養物を溶解し、PureLink (登録商標) Pro96全RNA精製キット (Thermo Fisher) を使用して精製した後、qScript XLT One-Step RT-qPCR Tough Mix, Low ROX (Quanta Biosciences) でqPCRアッセイ用に加工した。液体のハンドリングは半自動実験口ボットシステム (Integra Assist およびIntegra Viaflo) を使用して行った。Lightcycler480リアルタイムPCRシステム (Roche) によって試料を分析した。

#### 【0216】

以下のプライマーおよびプローブを使用してUBE3A-センスおよびUBE3A-アンチセンスの転写産物存在量をモニタリングするqPCRにより、オリゴヌクレオチドの活性を評価した。  
UBE3a-センス: HS00166580\_VIC Taqmanアッセイ (Thermo Fisher)  
UBE3a-アンチセンス: HS01372957\_VIC Taqmanアッセイ (Thermo Fisher)

#### 【0217】

TBP (TATAボックス結合タンパク質) を正規化のためのハウスキーピング遺伝子として、RT-qPCRをマルチプレックス化した。TBPプライマーおよびFAM標識プローブはRocheから購入した (参照番号:05532957001、アッセイId.101145)。各プレートは、陰性対照としての非ターゲティングオリゴヌクレオチド (モック) (TTGataagtggATGT)

を含む。

#### 【0218】

データを、モック処理条件と比較した平均発現パーセンテージとして表す。

#### 【0219】

##### 免疫細胞蛍光染色

細胞を4%PFAで固定し、PBS (Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>含有) 中の0.1% TritonX (Sigma) で透過処理した。ブロッキングは0.1% TritonXを補足したSuperBlock溶液 (Thermo Fisher Scientific) を使用して行った。細胞を以下の一次抗体で染色した: 抗SOX2 (Millipore AB5603)、抗GFAP (Dako Z033401)、抗HuC/D (Invitrogen A21271)、抗ネスチン (Millipore mab5326) および抗Map2 (Neuromics CH22103)。次に、細胞を染色し、Alexa488、Alexa555またはAlexa647 (すべてMolecular Probes) の

10

20

30

40

50

いずれかにコンジュゲートされた二次抗体で染色した。核をヘキスト1:1000 ( Molecular Probes ) で染色した。Axiovert顕微鏡 ( Zeiss ) またはOperettaハイコンテントイメージングシステム ( Perkin Elmer ) を使用して細胞を撮像した。ImageJソフトウェアを使用して画像を分析した。

【 0 2 2 0 】

qPCR分析

miRNeasy Miniキット ( QIAGEN ) を使用してcIPSC、カニクイザル分化NC、hESCおよびヒト分化NCからRNAを単離し、qPCR分析を行った ( ヒト細胞にはAg-Path-ID One-Step RT-PCRキット ( Ambion ) を使用; カニクイザル細胞については、Transcriptor第1鎖cDNA合成キット ( Roche ) を使用して逆転写を行い、LightCycler 480 Probes Master ( Roche ) を使用してqPCRを行った ) 。以下のプライマーおよびプローブを使用した。ヒト細胞用: NES Hs04187831\_g1; MAP2 Hs00258900\_m1; ASCL1 Hs00269932\_m1; SOX2 Hs01053049\_s1; ELAVL3 Hs00154959\_m1; GAPDH 4352665、すべてThermo Fisher/Applied Biosystems製;

UBE3A-ATS Fwプライマー:

CAA ATG CCT CAC CCA CTC TT

、RVプライマー:

CCA GCT GTC AAC ATG TGC TT

10

、内部オリゴ:

AAG TGC GCT CCT GTG AAA AG

20

; UBE3A Fwプライマー:

TCT GGG AAA TCG TT CATT CA

、RVプライマー:

TGT AGG TAA CCT TTC TGT GTC TGG

、内部オリゴ

TAC AAC GGG CAC AGA CAG AG

30

。カニクイザル細胞用: NANOG アッセイID 700103、POU5F1 アッセイID 113034、SOX2 アッセイID 111867、ネスチン アッセイID 138150、PAX6 アッセイID 136139、SOX1 アッセイID 136988、ZIC1 アッセイID 112077、ASCL1 アッセイID 700027、TUBB3 アッセイID 700047、GAPDH カタログ番号04694333001、プローブ番号147; TBP アッセイID 101145、すべてRocheから購入。

UBE3A-ATS Fwプライマー:

AATGCAAAGGCAGCAGTACA

40

、Rvプライマー:

TTGGGGAGTTGGTTATTGGA

、内部オリゴ

TGACACCACCAGAAGAACACA

;

UBE3A センス: Fwプライマー:

ATATGTGGAAGCCGGAATCT

50

Rvプライマー:

TCCCAGAACTCCCTAACAGAA

内部オリゴ:

ATGACGGTGGCTATACCAGG

### 【0221】

#### RNAシーケンス解析

RNA単離はmiRNeasy Miniキット（QIAGEN）を使用して行った。ライブラリー調製は、Ribo-Zero Goldによる除去を含めてTruSeq Stranded Total RNA LTキット（illumina）を使用して行った。クラスター生成はcBOT装置およびHiSeq PE Clusterキットv4を使用して行った。シーケンシングは、以下の試薬を使用し、ペアエンドシングルインデックスシーケンシングラン（ $2 \times 125$ サイクル）として、HiSeq 2500装置で行った：HiSeq SBSキットv4 250サイクル（illumina）。

10

### 【0222】

#### ウェスタンプロット分析

タンパク質発現研究のために、スクレイピングによって細胞を収集し、瞬間凍結した。ホスファターゼおよびプロテアーゼ阻害剤およびDNase（すべてRoche製）を補完したCytobuster（Millipore）でペレットを溶解した。抽出物中のタンパク質濃度をBCAアッセイ（Thermo Scientific）によって測定し、溶液をポリアクリルアミドゲル（Invitrogen）にローディングした。電気泳動後に、iBlotシステム（Invitrogen）を使用してタンパク質をニトロセルロースメンブレンにプロットした。関心対象のタンパク質を検出するために使用した抗体は、抗hTau HT7（Pierce MN1000）、抗pTauS422（Roche）抗pTauS404（Abcam ab92676）であり、これらを適当なHRPコンジュゲート二次抗体で検出した。SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate（Thermo Fisher）を使用し、イメージヤー（Biorad）を使用して、複合体をルミネセンスで検出した。

20

### 【0223】

#### 参考文献:

Ono, T. et al. A single-cell and feeder-free culture system for monkey embryonic stem cells. PLoS One 9, e88346, doi: 10.1371/journal.pone.0088346 (2014)。

30

Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006)。

### 【0224】

#### 実施例1 - マウス初代神経細胞培養物におけるオリゴヌクレオチド活性

UBE3AプレmRNA（SEQ ID NO:1の位置55319～141053）に対してアンチセンスであるSNHG14長鎖ノンコーディングRNAの一部を標的とするオリゴヌクレオチドを、上記「材料および方法」の項で述べたように得たマウス初代皮質神経細胞培養物において、UBE3A発現を妨げるSNHG14長鎖ノンコーディングRNA転写産物（データ表ではUBE3AサブレッサーまたはUBE3A-SUPとも呼ぶ）を低減するそれらの能力、およびUBE3A mRNA再発現を誘導するそれらの能力について試験した。オリゴヌクレオチド濃度は $5 \mu M$ とした。「材料および方法」の項で述べたマウス皮質神経細胞培養物におけるスクリーニングのためのプロトコールに従って、オリゴヌクレオチドをスクリーニングした。結果を表4に示す。

40

### 【0225】

#### （表4）初代マウス神経細胞培養物におけるオリゴヌクレオチド活性

50

CMP ID NO	オリゴヌクレオチド	モックに対する% UBE3A_SUP	sd	モックに対する% UBE3A	sd
95_1	CTCAacttgcttaAT	3,6	0,1	154,1	15,1
95_2	CTcatacttgcttaAT	15,9	2,6	119,8	12,4
96_1	ACatctcatacttGCTT	4,0	0,5	149,9	11,5
96_2	ACatctcatacttgCTT	9,3	3,9	139,9	36,4
96_3	ACatctcatactgCTT	3,1	0,2	143,2	3,9
97_1	ACatctcatactTGCT	4,0	1,5	154,5	10,0
97_2	ACatctcatacttgCT	6,1	1,7	141,1	14,1
97_3	ACatctcatacttGCT	3,7	0,6	162,7	15,0
97_4	ACATctcatacttgCT	5,2	0,4	156,7	24,4
98_1	TAcatctcatactTGCT	5,0	0,9	159,0	15,6
98_2	TAcatctcatacttgCT	15,5	5,3	130,4	3,4
98_3	TACAtctcatacttgCT	4,7	0,4	140,3	38,2
101_1	TACatctcatactTGC	2,6	0,5	152,6	10,2
101_2	TAcatctcatacttGC	19,2	6,0	112,0	15,0
101_3	TAcatctcatactTGC	3,5	0,4	117,2	13,7
101_4	TACAtctcatacttGC	3,0	0,7	140,5	12,4
100_1	CTAcacatctcatactTGC	5,4	0,8	160,4	4,1
100_2	CTacatctcatacttGC	9,6	3,7	159,2	14,5
100_3	CTacatctcatactTGC	3,0	0,1	133,2	5,9
99_2	CCtacatctcatacttGC	7,8	1,4	150,7	11,0
99_3	CCtacatctcatactTGC	3,2	0,6	134,7	12,5
99_4	CCtacatctcatacTTGC	2,7	0,2	145,2	4,7
102_1	CCTAcacatctcatactTG	5,8	1,7	127,0	24,5
102_2	CCtacatctcatactTG	20,2	6,6	129,7	9,2
102_4	CCTacatctcatacTTG	4,0	0,6	140,2	7,2
102_3	CCTAcacatctcatactTG	3,9	1,0	133,3	10,0
104_1	CCTAcacatctcataCTT	6,6	1,5	136,5	8,7
104_3	CCtacatctcatACTT	3,5	0,4	131,4	6,0
103_1	ACCtacatctcataCTT	5,8	1,4	130,8	0,7
103_2	ACCtacatctcataCTT	11,4	2,2	123,6	12,4
103_3	ACCtacatctcatACTT	5,8	0,8	132,2	4,5
105_1	TACCTacatctcataCTT	5,2	0,8	152,3	7,2
106_1	TTAcctacatctcataCTT	13,3	3,0	140,1	17,5
106_2	TTacatctcatctcataCTT	21,0	1,4	116,9	15,0

10

20

30

40

50

CMP ID NO	オリゴヌクレオチド	モックに対する% UBE3A_SUP	sd	モックに対する% UBE3A	sd
107_1	ACCTacatctcataCT	6,2	0,9	119,2	3,4
107_2	ACctacatctcataCT	14,3	7,4	142,9	13,7
108_1	TACCTacatctcataCT	5,6	1,0	127,0	10,7
108_2	TAcctacatctcataCT	21,4	12,5	117,1	8,5
109_1	TTacctacatctcaTACT	4,4	0,4	138,9	1,2
109_2	TTacctacatctcataCT	22,9	3,3	117,1	13,0
110_1	TTAcctacatctcaTAC	8,7	2,1	133,2	5,1
110_2	TTacctacatctcatAC	21,0	5,1	111,4	11,1
111_1	GTtacctacatctCATA	8,0	2,4	143,8	14,8
111_2	GTtacctacatctcaTA	19,0	2,3	115,4	4,1
112_1	GTtacctacatctCAT	6,6	1,4	145,5	16,8
112_2	GTtacctacatctcAT	15,8	4,5	120,3	8,1
126_1	TCACttccagatatCA	8,0	1,9	133,8	5,4
126_3	TCactttccagatatCA	53,4	75,9	112,0	11,4
128_1	ACATgtcccttataTT	16,3	2,5	114,7	11,1
128_2	ACatgtcccttataTT	14,8	1,1	136,9	6,2
129_1	ACAtgtcccttaTAT	11,8	1,9	135,0	14,3
132_1	CTCAAtccctccaagaAA	9,1	1,6	131,7	8,4
132_2	CTcatccctccaagaAA	11,2	3,9	159,3	17,7

10

20

## 【0226】

## 実施例2 - ヒト神経細胞培養物におけるオリゴヌクレオチド活性

15番染色体上の位置25278410～25419462 (SEQ ID NO:1) に対応するSNORD109B下流の領域においてヒトSNHG14を標的とするオリゴヌクレオチドを、患者由来ヒト神経細胞培養物において試験した（「材料および方法」の項のプロトコール参照）。SNORD15の発現に影響を及ぼすことなく、SNORD109B下流の領域においてSNHG14転写産物（データ表ではUBE3AサプレッサーまたはUBE3A-SUPとも呼ぶ）を低減するオリゴヌクレオチドの能力を分析した。さらにまた、UBE3A mRNA再発現を誘導する能力も分析した。

30

## 【0227】

上記「材料および方法」の項で述べたヒト神経細胞培養物においてオリゴヌクレオチドをスクリーニングするためのプロトコールに従って、オリゴヌクレオチドをスクリーニングした。

## 【0228】

結果を表5に示す。UBE3A mRNAの発現はすべての化合物について測定したが、UBE3AサプレッサーのノックダウンおよびSNORD1115レベルの維持はすべての化合物について分析したわけではない。

## 【0229】

## (表5) 患者由来ヒト神経細胞培養物におけるオリゴヌクレオチド活性

40

開始位置 SEQ ID NO 1	CMP ID NO	標的	モックに対する% オリゴ濃度 0.2 μM	sd	モックに対する% オリゴ濃度 1.0 μM	sd	モックに対する% オリゴ濃度 5.0 μM	sd
1678	10_1	UBE3A	107	14	88	10	151	8
1679	12_2	UBE3A	100	9	87	14	158	16
1687	20_1	UBE3A	87	7	102	22	213	44
1712	21_1	UBE3A	127	23	166	6	178	13

50

開始位置 SEQ ID NO 1	CMP ID NO	標的	モックに対する% オリゴ濃度 0.2 μM	sd	モックに対する% オリゴ濃度 1.0 μM	sd	モックに対する% オリゴ濃度 5.0 μM	sd
1712	21_1	UBE3A-SUP	81	3	82	8	72	12
1712	21_1	SNORD115	115	6	142	24	169	26
4167	22_1	UBE3A	87	5	90	8	146	20
4170	27_1	UBE3A	94	16	106	11	170	10
4171	29_2	UBE3A	86	13	100	12	194	35
4172	30_1	UBE3A	96	6	121	12	209	27
9210	35_1	UBE3A	88	5	112	23	195	27
10838	37_1	UBE3A	77	7	85	9	169	24
15565	38_2	UBE3A	93	11	108	6	167	34
22209	42_1	UBE3A	125	16	143	14	180	17
22209	42_1	UBE3A-SUP	108	14	98	15	85	18
22209	42_1	SNORD115	101	14	93	25	127	21
30449	43_1	UBE3A	99	5	95	13	115	8
30451	44_1	UBE3A	99	15	80	20	141	17
30451	44_2	UBE3A	98	31	104	16	119	7
30697	46_1	UBE3A	91	8	87	5	167	20
36066	49_1	UBE3A	95	6	111	10	155	29
36066	49_1	UBE3A-SUP	76	7	84	24	110	31
36066	49_1	SNORD115	99	14	111	20	94	6
36068	50_1	UBE3A	109	15	105	11	92	14
36068	50_1	UBE3A-SUP	122	24	93	28	73	7
36068	50_1	SNORD115	120	15	113	12	99	6
37206	51_1	UBE3A	114	16	101	7	101	3
37206	51_1	UBE3A-SUP	128	21	67	9	84	13
37206	51_1	SNORD115	140	26	110	9	100	11
46130	52_1	UBE3A	139	3	160	1	236	36
46130	52_1	UBE3A-SUP	135	16	133	26	160	32
46130	52_1	SNORD115	104	8	119	14	100	8
48145	59_1	UBE3A	179	3	122	17	115	NA
48170	76_1	UBE3A	85	16	100	8	155	12
48171	80_1	UBE3A	120	7	114	10	172	20
48171	78_1	UBE3A	136	31	103	20	169	11
48172	82_2	UBE3A	96	11	121	4	186	32
48172	84_1	UBE3A	95	14	100	8	158	14
49343	85_1	UBE3A	97	22	121	10	189	17
49722	87_1	UBE3A	111	9	126	11	177	22
52417	92_1	UBE3A-SUP	88	14	80	14	82	8
52417	92_1	SNORD115	102	8	114	20	91	9

10

20

30

40

50

開始位置 SEQ ID NO 1	CMP ID NO	標的	モックに対する% オリゴ濃度 0.2 μM	sd	モックに対する% オリゴ濃度 1.0 μM	sd	モックに対する% オリゴ濃度 5.0 μM	sd
52420	93_1	UBE3A	111	14	120	9	126	16
52420	93_1	UBE3A-SUP	104	23	82	20	79	8
52420	93_1	SNORD115	110	11	114	17	95	7
53953	94_1	UBE3A	117	12	147	15	166	15
53953	94_1	UBE3A-SUP	92	18	81	5	86	22
53953	94_1	SNORD115	124	33	122	17	106	14
60819	95_1	UBE3A	103	11	131	14	175	7
60819	95_1	UBE3A-SUP	93	13	87	3	74	6
60819	95_1	SNORD115	162	19	158	20	201	11
60819	95_2	UBE3A	147	10	129	20	117	2
60819	95_2	UBE3A-SUP	118	24	87	13	83	8
60819	95_2	SNORD115	104	17	118	10	129	6
60823	96_1	UBE3A	115	16	135	19	174	17
60823	96_1	UBE3A-SUP	104	25	93	32	91	11
60823	96_2	UBE3A	108	7	114	9	115	13
60823	96_2	UBE3A-SUP	99	17	92	19	93	10
60824	97_1	UBE3A	111	12	134	23	169	14
60824	97_1	UBE3A-SUP	110	27	105	33	92	10
60824	97_2	UBE3A	124	13	126	12	124	11
60824	97_2	UBE3A-SUP	113	17	107	33	96	20
60824	98_1	UBE3A	111	16	119	11	138	14
60824	98_1	UBE3A-SUP	118	34	98	23	82	19
60824	98_1	SNORD115	109	11	123	18	114	16
60824	98_2	UBE3A	128	10	109	7	136	12
60824	98_2	UBE3A-SUP	91	15	77	11	110	16
60824	98_2	SNORD115	101	3	110	7	124	11
60825	99_1	UBE3A	125	6	115	5	131	10
60825	99_1	UBE3A-SUP	139	18	121	34	127	45
60825	99_1	SNORD115	110	18	112	12	99	19
60825	99_2	UBE3A	120	21	111	11	135	22
60825	99_2	UBE3A-SUP	96	21	79	15	75	11
60825	99_2	SNORD115	104	34	113	22	131	24
60825	100_1	UBE3A	123	34	139	34	145	21
60825	100_1	UBE3A-SUP	104	37	127	46	99	17
60825	100_2	UBE3A	124	46	138	37	145	31
60825	100_2	UBE3A-SUP	111	36	120	47	92	11
60825	101_1	UBE3A	112	18	123	15	150	13
60825	101_1	UBE3A-SUP	96	18	102	14	88	12
60825	101_2	UBE3A	118	15	138	24	139	32

10

20

30

40

50

開始位置 SEQ ID NO 1	CMP ID NO	標的	モックに対する% オリゴ濃度 0.2 μM	sd	モックに対する% オリゴ濃度 1.0 μM	sd	モックに対する% オリゴ濃度 5.0 μM	sd
60825	101_2	UBE3A-SUP	100	29	110	39	92	10
60826	102_1	UBE3A	132	17	120	7	125	9
60826	102_1	UBE3A-SUP	113	16	83	5	88	18
60826	102_1	SNORD115	121	36	131	23	100	9
60826	102_2	UBE3A	90	6	116	23	103	7
60826	102_2	UBE3A-SUP	91	7	90	12	64	18
60826	102_2	SNORD115	116	15	146	27	183	28
60827	103_1	UBE3A	106	8	112	10	115	9
60827	103_1	UBE3A-SUP	99	15	110	28	94	8
60827	103_2	UBE3A	107	14	120	13	112	14
60827	103_2	UBE3A-SUP	97	14	118	38	93	20
60827	104_1	UBE3A	128	14	111	9	111	6
60827	104_1	UBE3A-SUP	111	12	97	9	87	19
60827	104_1	SNORD115	114	10	110	12	109	13
60827	104_2	UBE3A	108	10	111	16	109	10
60827	104_2	UBE3A-SUP	103	13	103	33	89	9
60827	105_1	UBE3A	122	13	121	12	121	4
60827	105_1	UBE3A-SUP	119	7	97	15	93	7
60827	105_1	SNORD115	114	21	128	12	118	9
60827	105_2	UBE3A	123	5	110	9	114	8
60827	105_2	UBE3A-SUP	110	11	89	17	94	21
60827	105_2	SNORD115	102	15	108	16	107	18
60827	106_1	UBE3A	114	17	133	23	125	9
60827	106_1	UBE3A-SUP	112	35	103	15	87	12
60827	106_2	UBE3A	110	12	130	22	123	14
60827	106_2	UBE3A-SUP	105	19	107	27	93	10
60828	107_1	UBE3A	83	11	117	13	112	6
60828	107_1	UBE3A-SUP	86	11	114	16	67	7
60828	107_1	SNORD115	108	17	130	21	137	24
60828	107_2	UBE3A	143	42	117	10	122	11
60828	107_2	UBE3A-SUP	116	12	92	4	100	8
60828	107_2	SNORD115	108	4	127	16	108	14
60828	108_1	UBE3A	120	7	127	31	132	31
60828	108_1	UBE3A-SUP	153	33	118	34	89	17
60828	108_1	SNORD115	114	9	114	9	105	15
60828	108_2	UBE3A	122	18	133	26	128	9
60828	108_2	UBE3A-SUP	101	19	100	28	89	17
60828	109_1	UBE3A	108	10	129	14	128	5
60828	109_1	UBE3A-SUP	106	21	107	24	84	8

10

20

30

40

50

開始位置 SEQ ID NO 1	CMP ID NO	標的	モックに対する% オリゴ濃度 0.2 μM	sd	モックに対する% オリゴ濃度 1.0 μM	sd	モックに対する% オリゴ濃度 5.0 μM	sd
60828	109_2	UBE3A	109	11	110	8	111	13
60828	109_2	UBE3A-SUP	95	15	86	14	83	9
60829	110_1	UBE3A	104	6	83	3	101	15
60829	110_1	UBE3A-SUP	100	13	95	12	79	4
60829	110_1	SNORD115	126	21	125	6	182	13
60829	110_2	UBE3A	92	7	87	8	96	7
60829	110_2	UBE3A-SUP	99	7	108	9	81	5
60829	110_2	SNORD115	118	15	139	22	198	39
60830	111_1	UBE3A	110	6	122	13	124	10
60830	111_1	UBE3A-SUP	104	14	90	28	79	11
60830	111_2	UBE3A	115	10	120	15	121	10
60830	111_2	UBE3A-SUP	114	20	89	19	87	9
60831	112_1	UBE3A	93	8	94	13	106	10
60831	112_1	UBE3A-SUP	97	1	68	29	82	7
60831	112_1	SNORD115	116	20	110	13	158	20
60831	112_2	UBE3A	83	8	78	7	83	6
60831	112_2	UBE3A-SUP	106	35	80	23	69	9
60831	112_2	SNORD115	107	6	106	8	159	21
62198	113_1	UBE3A	110	3	122	6	134	9
62198	113_1	UBE3A-SUP	113	20	85	19	79	24
62198	113_1	SNORD115	116	18	123	9	91	9
62284	115_1	UBE3A	105	14	98	19	141	36
62422	116_1	UBE3A	130	19	142	29	172	18
62423	117_1	UBE3A	76	8	93	13	171	17
62439	118_1	UBE3A	75	7	88	9	150	19
66378	119_1	UBE3A	96	14	93	5	110	10
77565	126_1	UBE3A	94	6	113	5	125	14
77565	126_1	UBE3A-SUP	83	17	95	33	85	5
77565	126_1	SNORD115	105	11	123	19	152	15
77565	126_2	UBE3A	95	5	126	9	111	2
77565	126_2	UBE3A-SUP	77	27	106	21	83	15
77565	126_2	SNORD115	115	17	157	13	180	15
92321	128_1	UBE3A	102	7	91	5	111	13
92321	128_1	UBE3A-SUP	115	3	104	25	91	13
92321	128_1	SNORD115	135	9	132	12	196	35
92321	128_2	UBE3A	91	5	96	8	104	8
92321	128_2	UBE3A-SUP	112	20	92	20	79	7
92321	128_2	SNORD115	125	7	111	13	169	12
92322	129_1	UBE3A	101	5	103	2	110	7

10

20

30

40

50

開始位置 SEQ ID NO 1	CMP ID NO	標的	モックに対する% オリゴ濃度 0.2 μM	sd	モックに対する% オリゴ濃度 1.0 μM	sd	モックに対する% オリゴ濃度 5.0 μM	sd
92322	129_1	UBE3A-SUP	99	39	113	12	94	13
92322	129_1	SNORD115	124	25	114	6	140	13
92322	129_2	UBE3A	93	2	100	4	113	16
92322	129_2	UBE3A-SUP	109	4	102	22	85	7
92322	129_2	SNORD115	103	11	99	9	152	31
97154	132_1	UBE3A	100	10	128	13	142	13
97154	132_1	UBE3A-SUP	103	9	115	8	109	6
97154	132_1	SNORD115	49	7	90	12	143	25
97154	132_2	UBE3A	111	8	128	17	128	17
97154	132_2	UBE3A-SUP	95	7	116	9	105	13
97154	133_2	SNORD115	86	7	106	9	121	9
97154	133_1	UBE3A	101	3	107	11	124	19
97154	133_1	UBE3A-SUP	112	9	117	7	146	25
97154	133_1	SNORD115	60	7	110	15	141	15
97154	133_2	UBE3A	94	13	116	14	138	12
97154	133_2	UBE3A-SUP	116	6	128	13	148	38
97154	132_2	SNORD115	70	5	108	9	160	34
106137	137_1	UBE3A	83	12	74	11	124	20
109404	138_1	UBE3A	80	20	92	7	120	21
110766	139_1	UBE3A	76	5	85	12	121	17
114826	140_1	UBE3A	87	10	88	11	136	9
118637	143_1	UBE3A	83	7	104	30	141	28
118639	144_1	UBE3A	74	17	31	39	106	33
124160	145_2	UBE3A	89	6	95	10	115	25
125499	146_1	UBE3A	83	13	76	7	124	16
125499	146_2	UBE3A	123	30	79	14	102	23
125538	150_2	UBE3A	82	17	82	7	119	24

## 【0230】

5 μM濃度では、モックオリゴヌクレオチドと比較した場合に、試験した187の化合物のうち、およそ90%がUBE3Aの再発現を示した。UBE3Aの再発現を誘導する能力を有するオリゴヌクレオチドの数は、SEQ ID NO:1の位置1～55318間の領域（非オーバーラップ領域）において高く、次にUBE3Aコーディング領域に相補的な領域（オーバーラップ領域）において高かった。図2にオリゴヌクレオチドの分布を15番染色体上でのそれらの位置に従って、モックオリゴヌクレオチドとの比としてのUBE3A mRNA発現に対してプロットする。

## 【0231】

SNORD115を試験したオリゴヌクレオチドについては、1 μMおよび5 μMにおいて、モックと比較した場合に有意なダウンレギュレーションがない。

## 【0232】

実施例3 - カニクイザルニューロン分化インビトロ系の作製および検証

材料および方法の項で説明し、図4に図示するプロトコールに従って、NPCに分化するよ

10

20

30

40

50

うに、カニクイザルIPSCを誘導した。このプロトコールにより、FGF、EGFおよびBDNFを補足した基本培地で維持し、拡大培養することができるNPCを得ることができる。効率のよいカニクイザルNPCの誘導を検証するために、神経系幹細胞マーカーSOX2およびネスチンの発現を免疫染色によって評価した（図5参照）。カニクイザルNPCはSOX2およびネスチンを発現し、発現パターンはヒトNPCとよく似ている。

#### 【0233】

分化NCを得るために、拡大培養中のNPCを解離し、SFA培地で1週間プレーティングする。その後に、細胞を分化培地（BGAA）に曝露する。カニクイザルNPCのニューロン分化能を評価するために、転写分析を行い、結果を分化ヒトNPCの転写プロファイルと比較した（図6参照）。BGAA培地における14日間の分化後に、cyno培養物は、cIPSCと比較すると、NANOGおよびPOU5F1のような多能性マーカーの発現の減少と、PAX6、SOX1、ZIC1、ASCL1、TUBB3のような外胚葉マーカーおよびニューロンマーカーの発現増加を示す（図6A参照）。同様に、BGAA中で14日にわたって分化させたヒト多能性幹細胞由来NCの転写分析（図6BのRNAシーケンシングおよび図6CのqPCR）でも、14日目のBGAA分化NCでは、hESCと比較して、多能性マーカーの発現減少、ならびに外胚葉マーカーおよびニューロンマーカーの発現増加が認められる。重要なことに、アンジェルマン症候群と関係づけられている疾患遺伝子UBE3Aおよびニューロン中で発現すると記述されているノンコーディング転写産物UBE3A-ATSの発現の変化は、分化カニクイザルNCと分化ヒトNCとの間で同等であった（図6D参照）。これらのデータは、カニクイザルIPCがNCに分化することおよび特異的マーカーの発現プロファイルが分化ヒトNCに似ていることを実証している。10

#### 【0234】

##### 実施例4 - 分化カニクイザルNCの解離および再播種

幹細胞由来細胞は、薬物スクリーニングのためのインビトロ系として、とりわけ対応する初代細胞タイプが利用できないか、ニューロンがそうであるように限られた量でしか利用できない場合に、大きな潜在的可能性を有する。しかし、薬物スクリーニングには、適切なプレートフォーマットで利用できるロバストな細胞スクリーニング系が必要になる。この目的のために、本発明者らは、NHP-IPSCに由来するNPCを神経細胞（NC）に分化させるための異なる戦略を試験した。NCが一様に分布したロバストな細胞系を同定するために、拡大培養中のNPCを解離し、2つの方法のうちの一方で分化培地に曝露した。すなわち、それらを最終アッセイフォーマットで直接プレーティングするか、あるいは、細胞を細胞培養フラスコにプレーティングし、その後、さらなる分化後に、解離して、最終アッセイフォーマットに再播種した（図7参照）。方法Aおよび方法Bでは、NPCをフラスコ中で23日にわたって分化させてから、解離し、アッセイフォーマットで再播種した。7日間のさらなる分化期間後に細胞をオリゴヌクレオチドで処理した。あるいは、方法Cおよび方法Dでは、NPCを解離し、96ウェルプレートに直接プレーティングした。方法Aおよび方法Cにおける分化培地には、細胞増殖を阻害するために有糸分裂阻害剤カクテル（ウリジン35 μg/mlおよび15 μg/ml 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン）を補足した。35日目に、培養物を固定し、神経系始原細胞およびグリア細胞マーカーSOX2ならびにニューロンマーカーMAP2について染色した（図8参照）。方法B（再プレーティングあり、有糸分裂阻害剤なし）は、MAP2陽性細胞を含み、他の方法よりSOX2陽性細胞が少ない、より一様に分布した細胞培養物をもたらした。そのため、以後の記載するオリゴヌクレオチド処理には、ニューロン分化方法Bを選んだ。30

#### 【0235】

##### 実施例5 - 分化ヒトNCの解離および再播種

実施例4で述べたように、本発明者らは、分化中のカニクイザルニューロンを再プレーティングすることは、これらの細胞をスクリーニング目的に適するようにするために必要な工程であることを立証した。そこで本発明者らは、ヒトIPSC由来ニューロンにも同様の手順を利用することが可能かどうかを検証しようと試みた。この目的のために、2つのIPSC株（ED4およびSFC808）から以前に樹立された神経系始原細胞（NPC）を、材料および

10

20

30

40

50

方法の項に記載した手順に従って分化させた。簡単に述べると、拡大培養中のNPCを解離し、SFA培地で1週間プレーティングした。その後、細胞を2つの方法の一方で分化培地(BGAA)に曝露した。すなわち、それらをアッセイフォーマットで直接プレーティングするか、または細胞培養フラスコにプレーティングした。後者の場合は、細胞を21日にわたって分化させた後、解離し、アッセイフォーマットで再播種した。どちらの実験群も(すなわち直接分化させた群も、解離して再播種した群も)、加工前に、合計6週にわたって分化させた(それぞれ、アッセイフォーマットで6週、またはフラスコ中で3週およびアッセイフォーマットで3週)。

#### 【0236】

一組目の実験では、ニューロンを免疫蛍光およびハイコンテントイメージングによって分析した。使用したマーカーは神経系始原細胞(SOX2)、グリア細胞(GFAP)またはニューロン(MAP2およびHuC/D)に特異的である。図9に例示するように、再プレーティングプロセスは、ヒトIPSC由来ニューロンの分化または形態に影響をしないようであった。これを、染色の定量によってさらに検証したところ、染色は、直接分化群と再プレーティング群との間にHuC/D陽性細胞の存在に有意差を示さなかった(図10; ED4の場合、 $p = 0.542$ 、SFC808の場合、 $p = 0.579$ )。

10

#### 【0237】

分化ヒトIPSC由来ニューロンの特徴を変化させることなくそれらを解離し、再プレーティングすることが可能であることをさらに確認するために、本発明者らは、細胞骨格関連タンパク質が解離プロセスによって破壊されないことを確認したいと考えた。本発明者らは微小管関連タンパク質タウの発現を分析した。これはニューロン機能にとって極めて重要であり、前頭側頭型認知症およびアルツハイマー病などの神経変性疾患に直接関係づけられるからである。細胞を上述のように(解離および再播種ありならびになしで)培養し、タンパク質抽出物をウェスタンプロットによって分析した。図11に示すように、タウの発現およびそのリン酸化型のうちの2つの発現に変化がないことから、再プレーティングは、意外にも、ヒトIPSC由来ニューロンの細胞骨格特徴を破壊しないことが明らかになり、このプロセスでは生理学的特徴が改変されないことが示唆される。

20

#### 【0238】

これらの結果は、ヒトIPSC由来ニューロンが分化中に解離および再播種を受け、かつそれらの重要な特徴を維持することが可能であることを実証しており、靈長類幹細胞由来ニューロンの分化には、再プレーティング工程(解離および再播種)が実行可能であることが示唆される。

30

#### 【0239】

実施例6 - 灵長類IPSCに由来する解離し再播種した分化NCを使ったハイスループットスクリーニング

上述の靈長類IPSC由来ニューロン培養物は、スクリーニング目的での使用に適した融通性と再現性の高い系である。本発明者らは、細胞をオリゴヌクレオチドで処理し、定量ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)によって標的および関連遺伝子の発現を検証するためのワークフローを開発した(図12参照)。この目的のために、ヒトまたはカニクイザルの神経系始原細胞を上述のように処理した。スクリーニングのために、3週間の分化後に細胞を解離し、96ウェルプレートに200'000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で再播種した。さらに1週間の分化後に、細胞をオリゴヌクレオチドで5日にわたって処理し、次に、材料および方法の項で述べたように、発現分析のために加工した。この方法により、試料をハイスループットで試験することが常に可能になる。

40

#### 【0240】

この実施例の場合、本発明者らは、Ube3Aアンチセンス(Ube3A\_ATS)転写産物を標的とする5つの異なるオリゴヌクレオチドを、20 μMから開始して1段階ごとに3分の1に減少することで20.000、6.325、2.000、0.632、0.200、0.063、0.020および0.006 μMの用量となる、8つの濃度で利用した。本発明者らは、アンジェルマン症候群患者IPSC(ヒト)またはカニクイザルIPSC(カニクイザル)から分化させたニューロンで、これ

50

らの化合物を試験した。

【 0 2 4 1 】

処理後に、細胞を溶解し、RNAを抽出し、Ube3A用およびUbe3A\_ATS用の市販TaqManアッセイを使用してqPCR反応を行い、ヒト細胞ではGAPDHを、またカニクイザル細胞ではTBPを、発現データを正規化するためのハウスキーピング遺伝子として使用した。いずれの場合も、処理はUbe3A\_ATSの著しい減少をもたらし、それはセンス転写産物の発現増加と符合した。この効果は用量依存的に認められた。視覚的にわかりやすいように、本発明者らは、高用量（2 μM）および低用量（0.02 μM）での発現レベルを、図13に報告する。

【 0 2 4 2 】

用量2 μMでは、アンチセンス転写産物が媒体（PBS）処理細胞のレベルの約50%のレベルで発現した。これは、ヒト細胞とカニクイザル細胞の両方に当てはまった。Ube3A\_ATSのノックダウンは、Ube3Aの発現を、ヒトおよびカニクイザルについてそれぞれ媒体の約250%および約130%のレベルまで増加させた。患者由来ニューロンは、Ube3A遺伝子のアレルの1つが欠失しているために、極めて低レベルのセンス転写産物を発現するので、この不一致は驚くべきことではない。

【 0 2 4 3 】

これらの実験は、ヒトニューロンおよびカニクイザルニューロン中のUbe3A\_ATSに向けられたオリゴスクレオチドのターゲット・エンゲージメントを実証している。それゆえに、記載の方法は、靈長類IPSC由来ニューロンにおける治療用オリゴスクレオチドのハイスクロープットクリーニングに適している。

10

20

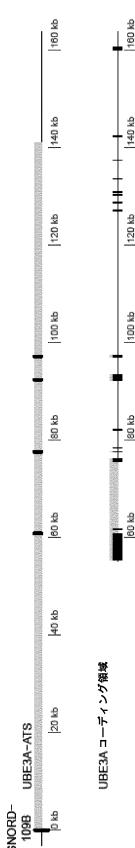
30

40

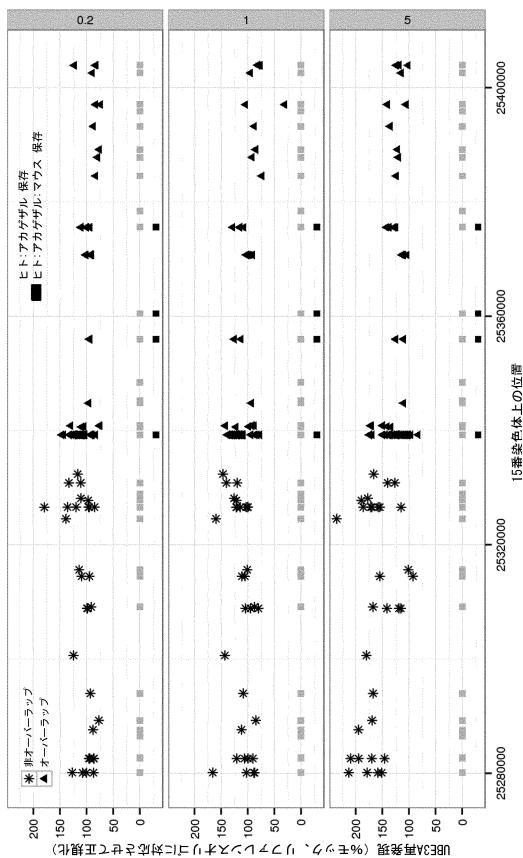
50

## 【図面】

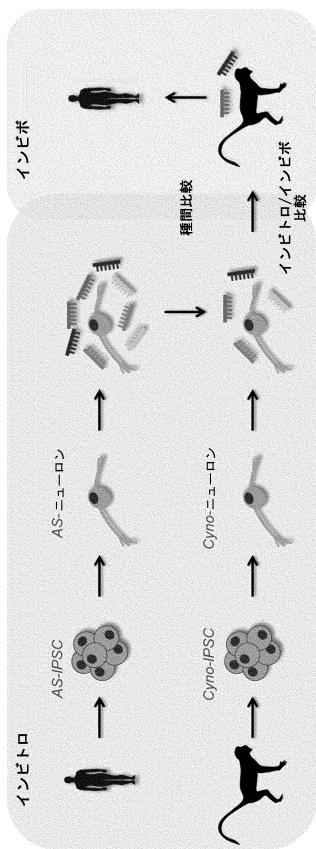
### 【図 1】



【 四 2 】



【図3】



【 図 4 】



10

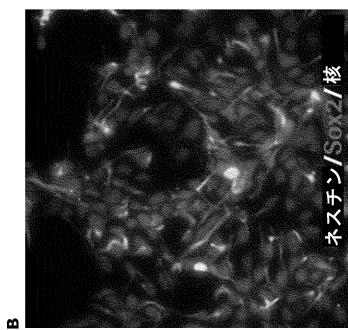
20

30

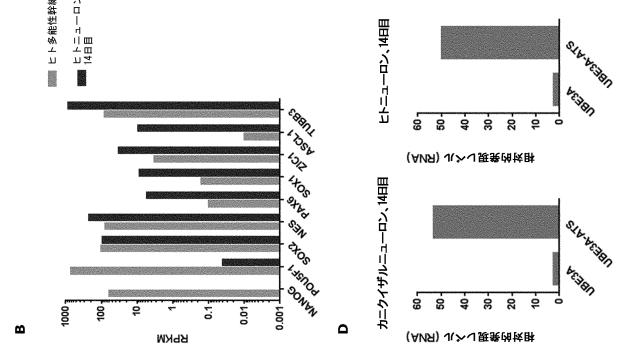
40

50

【図5】



【図6】



10

20

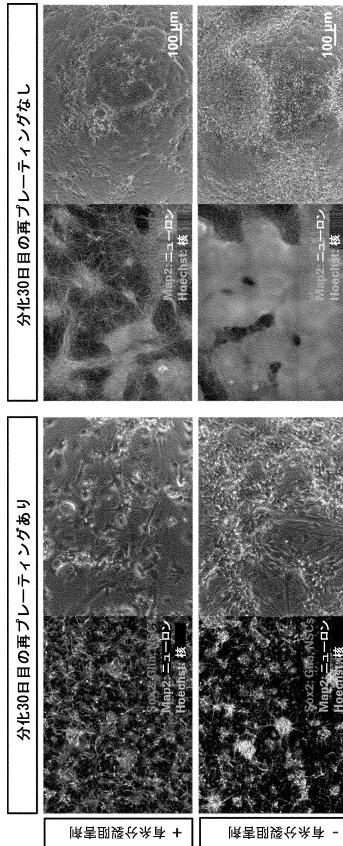
30

40

【図7】

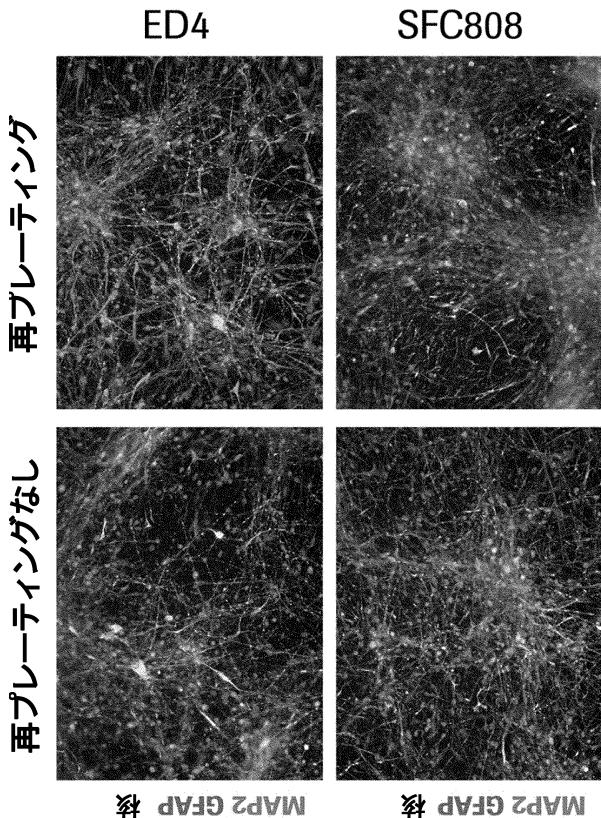


【図8】



50

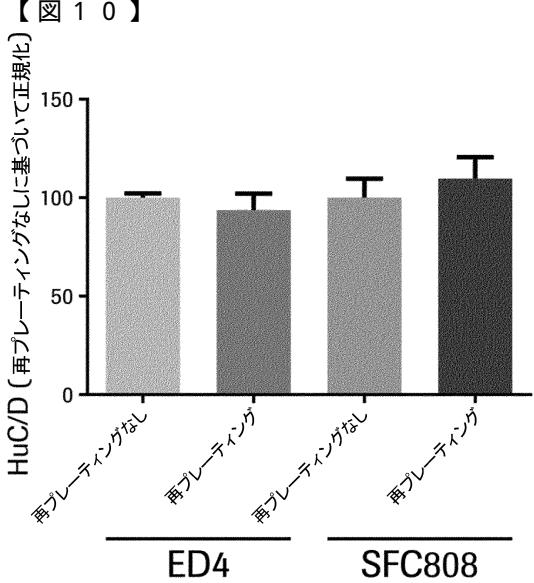
【図 9】



再プレーティングなし

【図 10】

【図 10】



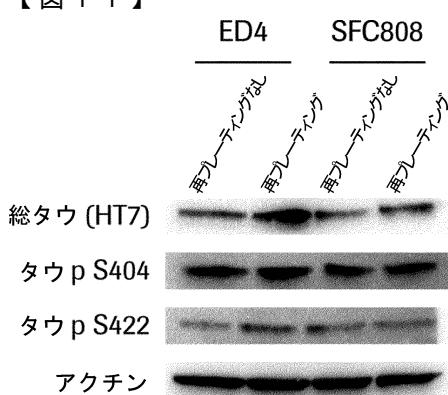
10

20

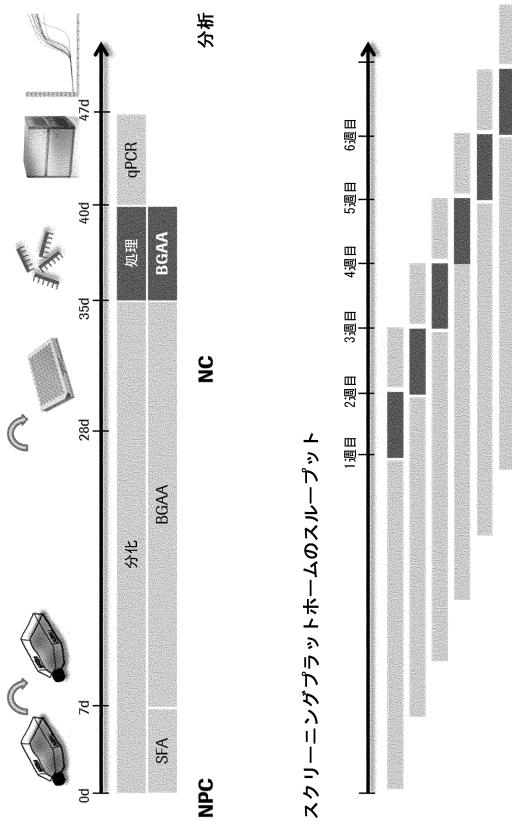
30

40

【図 11】

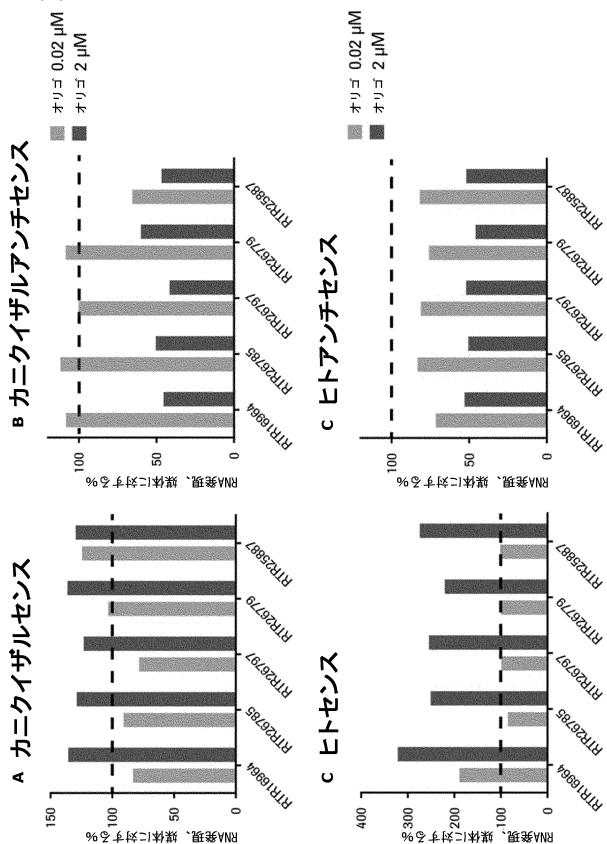


【図 12】



50

【図13】



【配列表】

0007066609000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 12 N	15/113 (2010.01)	F I	C 12 N	15/113	Z
G 01 N	33/50 (2006.01)		G 01 N	33/50	Z

## (33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 キュスリン カーロ

　　スイス連邦 4070 バーゼル グレンツァーヘルストラツセ 124 エフ. ホフマン - ラ ロシュ  
アーゲー内

(72)発明者 コスタ ペロニカ

　　スイス連邦 4070 バーゼル グレンツァーヘルストラツセ 124 エフ. ホフマン - ラ ロシュ  
アーゲー内

(72)発明者 ホーナー マリウス

　　スイス連邦 4070 バーゼル グレンツァーヘルストラツセ 124 エフ. ホフマン - ラ ロシュ  
アーゲー内

(72)発明者 パチ クリストフ

　　スイス連邦 4070 バーゼル グレンツァーヘルストラツセ 124 エフ. ホフマン - ラ ロシュ  
アーゲー内

(72)発明者 トーマ エヴァ クリストイーナ

　　スイス連邦 4070 バーゼル グレンツァーヘルストラツセ 124 エフ. ホフマン - ラ ロシュ  
アーゲー内

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特表2013-507135 (JP, A)

国際公開第2015/143342 (WO, A1)

特表2014-510537 (JP, A)

特表2007-503811 (JP, A)

米国特許第08642334 (US, B2)

Stem Cell Reports, 2014年, vol. 3, no. 4, pp 585-593

Stem Cells, 2013年, vol. 31, no. 8, pp 1548-1562

Assay and Drug Development Technologies, 2014年, vol. 12, no9/10, pp 536-547

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 12 N 5 / 00

G 01 N 33 / 00

Capillus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

PubMed