

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-504661

(P2025-504661A)

(43)公表日 令和7年2月14日(2025.2.14)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68 1 0 0 Z	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813 Z Z N A	
C 1 2 Q 1/6858 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6858 Z	
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全107頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2024-544641(P2024-544641)	(71)出願人	520255399
(86)(22)出願日	令和5年1月26日(2023.1.26)		スイダンスク ユニバーシティ
(85)翻訳文提出日	令和6年9月25日(2024.9.25)		SYDDANSK UNIVERSIT
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/051916		ET
(87)国際公開番号	WO2023/144263		デンマーク 5 2 3 0 オーデンセ エム
(87)国際公開日	令和5年8月3日(2023.8.3)		キャンパスバイ 5 5
(31)優先権主張番号	PCT/EP2022/051790		Campusvej 55, 5 2 3 0
(32)優先日	令和4年1月26日(2022.1.26)		Odense M DENMARK
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	110002170
(31)優先権主張番号	PA202270346		弁理士法人翔和国際特許事務所
(32)優先日	令和4年6月29日(2022.6.29)	(72)発明者	アンドレセン ブラゲ ストルスティン
(33)優先権主張国・地域又は機関	デンマーク(DK)		デンマーク王国 8 2 3 0 オービホイ
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ	(72)発明者	シー. エー. ティレゴズバイ 2 3
	最終頁に続く		ドクター トーマス コード
			デンマーク王国 5 6 7 2 ブロビー モ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 偽エクソンを標的とする対立遺伝子特異的スプライススイッチングオリゴヌクレオチド

(57)【要約】

本発明は、偽エクソンの5' スプライス部位に対して下流の領域+9～+39において、pre-mRNAに結合したときに、この偽エクソンを成熟mRNAに組み込むことを促進することにより、細胞内の標的タンパク質の発現を調節することができるスプライススイッチングオリゴヌクレオチド (SSO) を特定する方法に関する。本発明はまた、この方法によって得られるSSO及びその使用に関する。特に、本発明は、対立遺伝子特異的スプライススイッチングオリゴヌクレオチド (SSO) に関する。

図1 Aは要約とともに公開される。

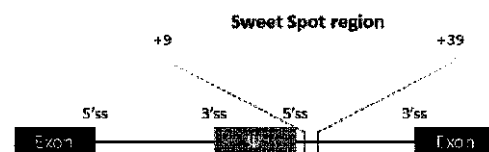


Fig. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

医薬品として使用するためのスプライススイッチングオリゴヌクレオチド（SSO）を含む組成物であって、前記組成物は、

－ 以下から成る群から選択される核酸内の領域に相補的又は実質的に相補的なSSOを含み、

○ 配列番号 217～294 のいずれかに記載の核酸、

○ 配列番号 217～294 のいずれかと比較した場合、1 若しくは2 若しくは3 個の置換を含む核酸、又は

○ 配列番号 217～294 のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列、

又は

－ 以下からなる群から選択されるSSOを含み、

○ 配列番号 295～367 のいずれかに記載の核酸、又は

○ 配列番号 295～367 のいずれかと比較した場合、1 若しくは2 若しくは3 個の置換を含む核酸、又は

○ 配列番号 295～367 のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列、

前記SSOは標的pre-mRNAに相補的又は実質的に相補的であり、前記標的pre-mRNAは機能無効化偽エクソンを含み、

－ 前記機能無効化偽エクソンは、

○ 5' 末端に3' スプライス部位、及び

○ 3' 末端に5' スプライス部位、

を含み、

前記SSOは、前記偽エクソンの5' スプライス部位に対して下流の領域+9～+39における標的pre-mRNAと相補的又は実質的に相補的である、組成物。

【請求項 2】

前記SSOが以下からなる群、

○ 配列番号 217 のいずれかに記載の核酸、

○ 配列番号 217 のいずれかと比較した場合、1 若しくは2 若しくは3 個の置換を含む核酸、又は

○ 配列番号 217 のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列、から選択される核酸内の領域と相補的又は実質的に相補的である、請求項 1 に記載の使用のための組成物。

【請求項 3】

前記組成物は、障害を引き起こす、若しくは障害に影響を与える機能タンパク質の発現の増加又は機能の改変を特徴とする疾患又は状態を有するヒト対象の治療に使用される、又は前記機能遺伝子産物の発現の減少が治療上有益である、請求項 1 又は 2 に記載の使用のための組成物。

【請求項 4】

前記SSOは、前記pre-mRNAの前記ポリヌクレオチドと実質的に相補的な配列を含み、最大3つのミスマッチ、例えば最大2つのミスマッチ、又は例えば最大1つのミスマッチを含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 5】

前記SSOは、9～100ヌクレオチドの範囲、例えば9～50ヌクレオチド、好ましくは9～40ヌクレオチドの範囲、及びより好ましくは9～31ヌクレオチドの範囲又は9～25ヌクレオチドの長さを有する、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 6】

前記SSOは、上に定義される前記pre-mRNAのポリヌクレオチドと相補的又は

10

20

30

40

50

実質的に相補的である配列を含み、前記配列は、9～31ヌクレオチド、例えば9～20ヌクレオチドの範囲の長さを有し、好ましくは、前記配列は、9～31ヌクレオチド、例えば9～20ヌクレオチド、又は例えば20～31ヌクレオチド、例えば25～31ヌクレオチドの範囲で相補的である、請求項1～5のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項7】

前記SSOは、糖修飾ヌクレオチドなどの1つ以上の人工ヌクレオチドを含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項8】

前記オリゴヌクレオチドは、mRNAのRNAse H媒介分解を媒介しない、請求項1～7のいずれか一項に記載の使用のための組成物。 10

【請求項9】

少なくとも1つの修飾糖部分が2'置換糖部分である、請求項7又は8に記載の使用のための組成物。

【請求項10】

前記2'置換糖部分は、2'-O-メチル(2'-OMe)、2'-フルオロ(2'-F)、及び2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)からなる群から選択される2'-置換を有する、請求項9に記載の使用のための組成物。

【請求項11】

癌、炎症性疾患、神経変性疾患又は神経疾患、代謝性疾患、慢性肝疾患、及び遺伝性網膜ジストロフィー(IRD)からなる群から選択される疾患の治療又は緩和に使用するための、請求項1～10のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項12】

前記組成物は、前記SSOによって標的とされる前記pre-mRNAにおける配列変異(SNP)についてヘテロ接合性である対象に投与され、これにより、前記SSOが、他の対立遺伝子に比べて、疾患原因対立遺伝子に機能無効化偽エクソンをより大きな程度で包含することを促進し、

又は

前記組成物は、前記SSOによって標的とされる前記pre-mRNAにおける前記SNP変異(SNP)についてホモ接合性である対象に投与される、請求項1～11のいずれか一項に記載の使用のための組成物。 30

【請求項13】

前記対象は、前記機能無効化偽エクソンの前記5'スプライス部位及び／又は前記3'スプライス部位、好ましくは前記5'スプライス部位における配列変異(SNP)についてヘテロ接合性である、請求項1～12のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項14】

前記SNPが点変異、前記SNP位置における1～20ヌクレオチドの挿入、又は前記SNP位置における1～20ヌクレオチドの欠失である、請求項12又は13に記載の使用のための組成物。

【請求項15】

前記SNPが前記3'スプライス部位又は前記5'スプライス部位に位置する、請求項14に記載の使用のための組成物。 40

【請求項16】

前記疾患原因遺伝子のヘテロ接合性により、前記SSOと接触した場合、一方の対立遺伝子から成熟mRNAに含まれる偽エクソンが、他方の対立遺伝子上の対応する遺伝子に比べて、より大きな程度で増加する、請求項12～15のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項17】

前記疾患原因遺伝子のヘテロ接合性により、前記疾患原因遺伝子における偽エクソンのスプライス部位のMaxEntスコアが、他の対立遺伝子上の対応する(正常に機能する 50

）遺伝子に比べて増加する、請求項 12～16 のいずれかに一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 18】

前記疾患原因遺伝子のヘテロ接合性により、前記疾患原因遺伝子における偽エクソンのスプライス部位の MaxEnt スコアが、他の対立遺伝子上の対応する（正常に機能する）遺伝子に比べてより高くなる、請求項 12～17 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 19】

前記疾患原因遺伝子の対立遺伝子における前記偽エクソンのスプライス部位は、他の対立遺伝子上の（正常に機能する）遺伝子の対応するスプライス部位に比べて、より高い MaxEnt スコアを有する、請求項 12～18 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 20】

前記対象は、表 9 に記載の SNP ID の群から選択される前記疾患原因対立遺伝子に SNP を保持する、請求項 12～19 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 21】

前記対象は、表 9 に記載の SNP の群から選択される疾患原因対立遺伝子に SNP を保持し、前記 SSO は、表 9 に記載の対応する Sweet Spot Sequence を標的とする、請求項 12～20 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 22】

前記 pre-mRNA が LRRK2 をコードする、請求項 1～21 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 23】

前記 pre-mRNA は LRRK2 をコードし、前記対象は、疾患を引き起こす前記 LRRK2 対立遺伝子に、SNP rs10878372 の高スコアの MaxEnt スコア「G 対立遺伝子」を保持する、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 24】

前記 pre-mRNA は LRRK2 をコードし、前記対象は LRRK2 における疾患を引き起こす変異についてヘテロ接合性である、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の使用のための組成物。

【請求項 25】

機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子の対立遺伝子特異的 SSO ベース偽エクソン包含治療に適格の可能性がある対象を特定する方法であって、前記方法は、

－ 前記対象からの生体試料において、前記機能不全又は疾患原因遺伝子の偽エクソンにおけるヘテロ接合性の有無を決定することを含み、

前記対象が、前記機能無効化偽エクソンの 5' スプライス部位及び／又は 3' スプライス部位、好ましくは 5' スプライス部位における配列変異（SNP）についてヘテロ接合性である場合、前記対象は、対立遺伝子特異的 SSO ベース偽エクソン包含治療に適格の可能性が高く、又は

前記対象が前記機能無効化偽エクソンの 5' スプライス部位及び／又は 3' スプライス部位の配列変異（SNP）についてヘテロ接合性でない場合、前記対象は、対立遺伝子特異的 SSO ベース偽エクソン包含治療に的確でない可能性が高く、

前記 SSO は、前記機能不全又は疾患原因遺伝子の標的 pre-mRNA と相補的又は実質的に相補的であり、前記標的 pre-mRNA は機能無効化偽エクソンを含み、

－ 前記機能無効化偽エクソンは、

- 5' 末端に 3' スプライス部位、及び
- 3' 末端に 5' スプライス部位、

を含む、方法。

【請求項 26】

10

20

30

40

50

前記対立遺伝子特異的 S S O ベース偽エクソン包含治療の結果、前記 S S O は、生体内で前記 p r e - m R N A にハイブリダイズし、前記機能不全又は疾患原因遺伝子の前記偽エクソンは、前記 S S O と接触していない対応する p r e - m R N A に比べて、より大きな程度で前記成熟 m R N A の一部となる、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記対立遺伝子特異的 S S O ベース偽エクソン包含治療の結果、前記 S S O は、生体内で p r e - m R N A にハイブリダイズし、前記偽エクソンは、前記 S S O と接触していない対応する p r e - m R N A に比べて、前記機能不全又は疾患原因遺伝子を保持する前記対立遺伝子において、より大きな程度で前記成熟 m R N A の一部となる、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の方法。

10

【請求項 2 8】

前記 S S O によって標的とされる前記 p r e - m R N A における前記偽エクソンの 5 ' スプライス部位及び／又は 3 ' スプライス部位における配列変異 (S N P) についての前記ヘテロ接合性は、前記 S S O と接触した場合、他の対立遺伝子に比べて、より大きな程度で、前記疾患原因遺伝子の前記機能無効化偽エクソンの包含を促進する、請求項 2 5 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

配列変異 (S N P) の前記ヘテロ接合性は、前記機能無効化偽エクソンの 5 ' スプライス部位及び／又は 3 ' スプライス部位、好ましくは 5 ' スプライス部位にある、請求項 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 3 0】

前記疾患原因遺伝子の配列変異 (S N P) の前記ヘテロ接合性は、点変異 (S N P) 、 1 ~ 2 0 ヌクレオチドの挿入、又は 1 ~ 2 0 ヌクレオチドの欠失であり、好ましくは点変異である、請求項 2 5 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記疾患原因遺伝子の配列変異 (S N P) の前記ヘテロ接合性により、前記 S S O と接触した場合、他の対立遺伝子上の対応する (正常に機能する) 前記遺伝子よりも、前記偽エクソンの包含がより大きな程度で増加する、請求項 2 5 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記疾患原因遺伝子の配列変異 (S N P) の前記ヘテロ接合性により、他の対立遺伝子上の (正常に機能する) 前記遺伝子の対応する前記スプライス部位に比べて、前記スプライス部位の M a x E n t スコアが増加する、請求項 2 5 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 3 3】

前記疾患原因遺伝子の配列変異 (S N P) の前記ヘテロ接合性により、他の対立遺伝子上の (正常に機能する) 前記遺伝子の対応する前記スプライス部位に比べて、前記スプライス部位の M a x E n t スコアがより高くなる、請求項 2 5 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記疾患原因遺伝子の配列変異 (S N P) の前記ヘテロ接合性が、前記疾患原因遺伝子の前記偽エクソンのスプライス部位にあり、他の対立遺伝子上の (正常に機能する) 前記遺伝子の前記対応するスプライス部位に比べて、 M a x E n t スコアがより高くなる、請求項 2 5 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 3 5】

前記 S S O が生体内で前記 p r e - m R N A にハイブリダイズする場合、対立遺伝子特異的 S S O ベース偽エクソン包含治療は、前記疾患原因対立遺伝子を保持しない前記対立遺伝子に比べて、前記疾患原因対立遺伝子を保持する前記対立遺伝子の前記 p r e - m R N A に、より大きな程度で、生体内でハイブリダイズする S S O を使用する治療を含む、請求項 2 5 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 36】

前記 SSO は、前記偽エクソンの前記 5' スプライス部位に対して下流の領域 +9 ~ +39 で前記標的 pre-mRNA と相補的又は実質的に相補的である、請求項 25 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記 SSO の前記標的配列が、LRRK2、LMN1B 及び ATXN2 からなる群から選択される遺伝子に配置される、請求項 25 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記対象は、表 9 に記載の SNP ID の群から選択される疾患原因対立遺伝子に SNP を保持する、請求項 25 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 39】

前記対象は、表 9 に記載の SNP ID 群から選択される両方の対立遺伝子に SNP を保持する、請求項 25 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記対立遺伝子の状態は、サンガー配列決定、次世代配列決定 (NGS) などの群から選択される方法、及び ARMS 及び Taq-man などの変異特異的アッセイによって決定される、請求項 25 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子の SSO ベース偽エクソン包含治療に適格の可能性がある対象を特定する方法であって、前記方法は、

20

ー 前記対象からの生体試料に SNP の有無を決定することを含み、前記機能不全又は疾患原因遺伝子の偽エクソンにおいて、SSO ベース偽エクソン包含治療を可能にし、前記対象が機能無効化偽エクソンの 5' スプライス部位及び／又は 3' スプライス部位、好ましくは 5' スプライス部位に配列変異 (SNP) を有する場合、前記対象は、SSO ベース偽エクソン包含治療に適格の可能性が高く、又は前記対象が機能無効化偽エクソンの 5' スプライス部位及び／又は 3' スプライス部位に配列変異 (SNP) を有さない場合、前記対象は SSO ベース偽エクソン包含治療に適格でない可能性あり、

○ 前記 SSO は、前記機能不全又は疾患原因遺伝子の標的 pre-mRNA と相補的又は実質的に相補的であり、前記標的 pre-mRNA は機能無効化偽エクソンを含み、

30

ー 前記機能無効化偽エクソンは、

○ 5' 末端に 3' スプライス部位、

○ 3' 末端に 5' スプライス部位、

を含む、方法。

【請求項 42】

前記対象は、前記 SNP に関してヘテロ接合性である、又は前記 SNP についてホモ接合性のいずれかであり、好ましくはヘテロ接合性である、請求項 41 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本発明は、偽エクソンのスプライシングを活性化することができる対立遺伝子特異的スプライススイッチングオリゴヌクレオチド (SSO) に関する。特に、SSO は、例えば対立遺伝子特異的に、遺伝子の mRNA 転写物に偽エクソンを包含することを促進し、それによって機能遺伝子産物の発現を阻害することができる。別の態様では、本発明は、SSO を使用して成熟 mRNA に偽エクソンを組み込むことが可能な偽エクソンを特定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

新しく合成された真核生物の mRNA 分子は、一次転写物又は pre-mRNA と呼ばれ、核において生成され、翻訳のために細胞質に輸送される前又は輸送中に処理される

50

。pre-mRNAの処理として、5'メチル化キャップ及び約200~250ヌクレオチドのポリ(A)鎖の転写物の3'末端への付加が挙げられる。

【0003】

mRNA処理のもうひとつ別の工程は、哺乳類のmRNAの90~95%の成熟化の一部であるpre-mRNAのスプライシングである。イントロン(又は介在配列)は、成熟mRNAのコード配列に含まれていない一次転写物の領域である。エクソンは、成熟mRNAが細胞質に到達したときに成熟mRNAに残る一次転写物の領域である。エクソン同士が継ぎ合わされて、成熟mRNA配列を形成する。スプライシングは、スプライス部位間で発生し、スプライス部位は結合してスプライスジャンクションを形成する。イントロンの5'末端のスプライス部位は、「5'スプライス部位」又は「スプライスドナー部位」と呼ばれ、イントロンの3'末端スプライス部位は、「3'スプライス部位」又は「スプライスアクセプター部位」と呼ばれることが多い。スプライシングでは、上流エクソンの3'末端が下流エクソンの5'末端に結合する。したがって、スプライスされていないRNA(又はpre-mRNA)は、イントロンの5'末端にエクソン/イントロンスプライス部位を有し、イントロンの3'末端にイントロン/エクソンスプライス部位を有する。イントロンが削除された後、エクソンは、成熟mRNAにおけるエクソン/エクソンジャンクション又は境界と呼ばれることもある場所で隣接する。選択的スプライシングは、エクソン又はエクソン断片の異なる組み合わせ同士のスプライシングとして定義され、単一遺伝子から発現された複数の成熟mRNA転写物になることが多い。

【0004】

前駆体mRNA(pre-mRNA)のスプライシングは、真核生物の遺伝子発現における必須の工程であり、スプライソソームの活動によってイントロンが除去され、遺伝子のコード部分が互いにスプライスされて、機能mRNAになる。pre-mRNAスプライシングは高度に制御された過程であり、変異がスプライシングに影響を与え、異常な転写物を生成する可能性があることが十分に立証されている。正しいmRNAスプライシングは制御配列に依存し、制御配列は、スプライソソームの異なる因子とスプライシング制御因子によって認識される。スプライシング制御因子は、スプライシングエンハンサー及びスプライシングサイレンサーなどのスプライシング制御配列への配列特異的結合によって、エクソンの認識及びスプライシングを刺激する、又は抑制するかのいずれかを行う。真核生物におけるpre-mRNAスプライシングは、広範な選択的スプライシングと関連してプロテオームを富ませることが多い。スプライス部位の代替選択により、真核生物は細胞型特異的遺伝子発現を調節することができ、機能の多様化に貢献する。選択的スプライシングは、スプライシング制御タンパク質、例えば、SRタンパク質又はhnRNPによって影響を受ける高度に制御された過程であり、スプライシング制御配列、例えば、エクソン内のエクソンスプライシングエンハンサー(ESE)及びエクソンスプライシングサイレンサー(ESS)、並びにイントロン内のイントロンスプライシングエンハンサー(ISE)及びイントロンスプライシングサイレンサー(ISS)などのスプライシング制御配列を認識する。

【0005】

エクソンの変異が、スプライス部位配列以外の既存のスプライシング制御配列の作成又は除去のいずれかを行い、RNAのミスプライシングを引き起こし、疾患を生じさせる可能性がよくあることは周知の事実である。しかし、すべてのエクソンがスプライス部位以外のスプライシング制御要素に決定的に依存しているわけではないため、どの変異がスプライシングに影響を与えるかを予測することは困難であり、結果として、スプライス部位の外側のスプライシング調節配列の変異の影響を受けやすいエクソンは限られる。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、偽エクソンを含む遺伝子の配列パラメータの特定に関し、これを用いて、スプライススイッチングオリゴヌクレオチド(SSO)を使用して偽エクソンを成熟mRNAに組み込むことが可能かどうかを決定することができる。偽エクソンの組み込みは、例

例えば、成熟 mRNA に偽エクソンを組み込むことによって、遺伝子から発現された機能産物の機能を不活性化、破壊、又は改変するために使用することができる（更なる情報については、実施例 1 及び対応する図と図の説明も参照されたい）。本発明は、このような SSO の（医療）用途にも関する。

【0007】

本発明の一方法では、発明チームは、対立遺伝子特異的標的化を可能にする SSO 結合領域内の多数の SNP を特定した。対立遺伝子特異的 SSO は、（疾患原因対立遺伝子からの）疾患原因 pre-mRNA を優先的に標的とするために使用することができ、「正常に機能する」対立遺伝子からの pre-mRNA に影響しない（又は与える影響が少ない）。（実施例 13 を参照のこと）。

10

【0008】

本発明のもうひとつ別の方法では、発明チームは、偽エクソンのスプライス部位配列内で SNP を特定し、疾患原因遺伝子のみの成熟 RNA に偽エクソンを対立遺伝子特異的に組み込むことを可能にした（他の対立遺伝子の他の「正常な」遺伝子には組み込まない）。言い換えると、疾患原因遺伝子におけるスプライス部位の MaxEnt スコアが他の対立遺伝子に比べて増加する場合、対立遺伝子特異的標的化が可能になる（実施例 15～16 を参照のこと）。

【0009】

実施例 2 は、特定されたパラメータが、活性化できる偽エクソン（表 1）と活性化できない偽エクソン（表 2）を特定するために不可欠であることを示す。

20

【0010】

実施例 3 は、SMAD2 に関連するデータを示す（実施例 11 も参照のこと）。

【0011】

実施例 12 は RNF115 に関連するデータを示す。

【0012】

実施例 4～11 及び 13～14 は、偽エクソンが活性化することができる（成熟 mRNA に組み込むことができる）偽エクソンを含む特定の遺伝子の更なる例を示す。

【0013】

実施例 13、15 及び 16 は、対立遺伝子特異的標的化を示す。

【0014】

したがって、本発明の目的は、偽エクソンを成熟 mRNA に組み込むための SSO の結合部位を特定することができる配列パラメータ（基準）を提供することに関する。

30

【0015】

本発明のもうひとつ別の目的は、生体内で、成熟 mRNA に偽エクソンを組み込むことを促進し、それによって遺伝子の本来の機能を不活性化、破壊、又は改変することができる SSO を提供することである。

【0016】

したがって、本発明の一態様は、上述の偽エクソンの 5' スプライス部位に対して下流の領域 +9～+39 の pre-mRNA に結合したときに、成熟 mRNA への偽エクソンの組み込みを促進することによって、細胞の標的タンパク質の発現及び／又は機能を調節することができる SSO を特定する方法に関し、方法は、

40

a) 1 つ以上の特定された偽エクソンを含む 1 つ以上の遺伝子配列を、データベース又はその他の記憶手段などの形態で提供すること、
b) 1 つ以上の遺伝子配列について、偽エクソンが以下の基準を満たすかどうかを決定すること、

- ・ 偽エクソンの長さ < 160 nt、
- ・ 偽エクソンの長さ > 30 nt、
- ・ 偽エクソンの最後の 3 nt は TAG と異なり、
- ・ ドナースプライス部位は、MaxEnt スコア ≥ 4.33 を有し、
- ・ ドナースプライス部位は、MaxEnt スコア ≤ 10.06 を有し、及び

50

- ・ アクセプタースプライス部位は、MaxEntスコア ≥ 3.63 を有する、
- c) 1つ以上の遺伝子配列について、上述の偽エクソン(3)の5'スプライス部位に対して下流の配列領域+9~+39が以下の基準を満たしているかどうかを決定すること、
 - ・ 総ピリミジン数 ≤ 20 、
 - ・ 総チミジン塩基数 ≤ 12 、
 - ・ 総チミジン塩基数 ≥ 4 、
 - ・ 総グアニン塩基数 ≤ 12 、
 - ・ チミジンポリマーの最大長 ≤ 4 、
 - ・ ピリミジンポリマーの最大長 ≤ 10 、
 - ・ プリンポリマーの最小長 ≥ 3 、
 - ・ 少なくとも3nt長のグアニンポリマーの最大数 ≤ 2 、

10

1つ以上の遺伝子配列がポイントb)及びポイントc)による基準を満たす場合、この偽エクソン(3)の5'スプライス部位に対して下流のこの領域+9~+39は、この偽エクソン(3)の5'スプライス部位に対して下流の領域+9~+39内の前記遺伝子のpre-mRNA(2)に生体内でハイブリダイズすることができるSSOについての標的と考えられ、この偽エクソン(3)は、SSO(1)に接触していない対応するpre-mRNAに比べて、より大きな程度で成熟mRNAの部分になり、

並びに

任意に医薬品として使用するために、任意に上述のSSOを生成することを含む。

20

【0017】

本発明はまた、医薬品として使用するために特異的に特定されたSSOに関する。したがって、本発明の別の態様は、医薬品として使用するためのスプライススイッチングオリゴヌクレオチド(SSO)を含む組成物に関し、この組成物は、

ー 以下からなる群から選択される核酸内の領域に相補的又は実質的に相補的なSSOを含み、

○ 配列番号106、1~26、79~105、107~125、及び137~201のいずれかに記載の核酸、又は

○ 配列番号106、1~26、79~105、107~125、137~201のいずれかと比較して、1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は

○ 配列番号106、1~26、79~105、107~125、137~201のいずれかと1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列、

30

又は

ー 以下からなる群から選択されるSSO、

○ 配列番号127~136及び配列番号202~216のいずれかに記載の核酸、又は

○ 配列番号127~136及び配列番号：202~216のいずれかと比較した場合に1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は

○ 配列番号127~136及び配列番号：202~216のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列、

上述のSSOは、(機能障害の原因となる、又は障害に影響を与えるタンパク質をコードする)標的pre-mRNAと相補的又は実質的に相補的であり、この標的pre-mRNAは機能無効化偽エクソンを含み、

40

ー 機能無効化偽エクソンは、

○ 5'末端に3'スプライス部位、

○ 3'末端に5'スプライス部位

を含み、

上述のSSOは、この偽エクソンの5'スプライス部位に対して下流の領域+9~+39における標的pre-mRNAと相補的又は実質的に相補的であり、

上述のSSOは、生体内で、この偽エクソンの5'スプライス部位に対して下流の領域+9~+39内のpre-mRNAにハイブリダイズする場合、この偽エクソンは、SSOと接触していない対応するpre-mRNAと比較して、より大きな程度で成熟mRNA

50

の一部になる。

【0018】

更に別の態様では、本発明は、

－ 以下からなる群から選択される核酸内の領域に相補的又は実質的に相補的なSSOを含む組成物に関し、

○ 配列番号106、1～26、79～105、107～125、及び137～201のいずれかに記載の核酸、又は

○ 配列番号106、1～26、79～105、107～125、137～201のいずれかと比較して、1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は

○ 配列番号106、1～26、79～105、107～125、137～201のいずれかと1と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列、

又は

－ 以下からなる群から選択されるSSOを含む組成物に関する、

－ 配列番号127～136及び配列番号202～216のいずれかに記載の核酸、又は

－ 配列番号127～136及び配列番号：202～216のいずれかと比較した場合に1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は

－ 配列番号127～136及び配列番号202～216のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列。

【0019】

本発明の更なる態様は、医薬品として使用するためのスプライススイッチングオリゴヌクレオチド（SSO）を含む組成物に関し、この組成物は、

－ 以下からなる群から選択される核酸内の領域と相補的又は実質的に相補的なSSOを含み、

○ 配列番号217～294のいずれかに記載の核酸、

○ 配列番号217～294のいずれかと比較した場合に1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は

○ 配列番号217～294のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列、

又は

－ 以下からなる群から選択されるSSO、

○ 配列番号295～367のいずれかの核酸、又は

○ 配列番号295～367のいずれかと比較した場合に1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は

○ 配列番号295～367のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列、

上述のSSOは標的pre-mRNAに相補的又は実質的に相補的であり、この標的pre-mRNAは機能無効化偽エクソンを含み、

－ 機能無効化偽エクソンは、

○ 5'末端に3'スプライス部位、

○ 3'末端に5'スプライス部位、

を含み、

上述のSSOは、この偽エクソンの5'スプライス部位に対して下流の領域+9～+39において標的pre-mRNAと相補的又は実質的に相補的である。

【0020】

本発明は、また、対立遺伝子特異的SSOベース偽エクソン包含治療に適格な対象を特定するために使用することができる。したがって、本発明の一態様は、機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子の対立遺伝子特異的SSOベース偽エクソン包含治療に適格の可能性のある対象を特定する方法に関し、方法は、

－ この対象からの生体試料において、機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子の偽エクソンにおけるヘテロ接合性の有無を決定すること、

対象が、機能無効化偽エクソンの5'スプライス部位及び／又は3'スプライス部位、好ましくは5'スプライス部位における配列変異(SNP)についてヘテロ接合性である場合、この対象は、対立遺伝子特異的SSOベース偽エクソン包含治療に適格の可能性がある、又は

対象が機能無効化偽エクソンの5'スプライス部位及び／又は3'スプライス部位の配列変異(SNP)についてヘテロ接合性でない場合、この対象は、対立遺伝子特異的SSOベース偽エクソン包含治療に適格でない可能性がある、

上述のSSOは、機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子の標的pre-mRNAと相補的又は実質的に相補的であり、この標的pre-mRNAは機能無効化偽エクソンを含み、

- － 機能無効化偽エクソンは、
 - 5'末端に3'スプライス部位、
 - 3'末端に5'スプライス部位を含む。

10

【0021】

本発明の更なる態様は、機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子のSSOベース偽エクソン包含治療に適格の可能性がある対象を特定する方法に関し、この方法は、

- － この対象からの生体試料において、機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子の偽エクソンにおいてSSOベース偽エクソン包含治療を可能にするSNPの有無を決定することを含み、

対象が、機能無効化偽エクソンの5'スプライス部位及び／又は3'スプライス部位、好ましくは5'スプライス部位に配列変異(SNP)を有する場合、この対象は、SSOベース偽エクソン包含治療に適格の可能性がある、又は

対象が機能無効化偽エクソンの5'スプライス部位及び／又は3'スプライス部位に配列変異(SNP)を有さない場合、この対象はSSOベース偽エクソン包含治療に適格でない可能性がある、

○ 上述のSSOは、機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子の標的pre-mRNAと相補的又は実質的に相補的であり、この標的pre-mRNAは機能無効化偽エクソンを含み、

- － 機能無効化偽エクソンは、
 - 5'末端に3'スプライス部位、
 - 3'末端に5'スプライス部位を含む。

30

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、本発明に記載のSSOによる遺伝子発現制御の概略図を示す。図1A) Sweet Spot領域は、本発明に記載の基準に従う偽エクソンの5'スプライス部位について下流の領域+9～+39として、pre-mRNAのイントロン部分に特定される。図1B) 基準を満たす偽エクソンのSweet Spot領域に相補的なSSOを使用することによって、mRNA転写物への偽エクソンの包含を活性化し、増加させることができる。mRNAへの偽エクソンの包含は、mRNA又はタンパク質機能の誤った局在化、不安定化、分解又は改変によって、mRNAレベル又はタンパク質レベルのいずれかで遺伝子発現を調節する。

40

【図2】図2は、RNA配列データを使用して、内因性転写物に低レベルで含まれる偽エクソンを経験的に検出するために、生体内でスプライスされた二重接合を検出する方法の概略図を示す。ヒトゲノムにマッピングした後、読み取りデータはフィルターにかけられ、少なくとも2つのスプライシングジャンクションを含む断片のみが保持される。次に、断片全体のスプライシングジャンクションがエクソン構造に集められ、最大100bpの断片内の読み取りデータ間にマップされていないギャップができる。次に、既知のエクソンアノテーションを使用してエクソンを分類して、イントロン内に含まれる偽エクソンを特定する。Sweet Spot領域に結合するSSOによって活性化のための候補とな

50

りうる新しい偽エクソンは、14個の基準によって特定することができ、その後、機能遺伝子産物の発現のダウンレギュレーション又は改変が医学的に関連する遺伝子において、治療に強く関連のある偽エクソンを特定することができる。

【図3】図3は、LINGO2偽エクソンの包含は神経膠芽腫細胞の成長と増殖を阻害する、ことを示す。(A) LINGO2偽エクソン+11 SSO及び非標的SSOコントロールでトランスフェクトされたU251細胞におけるLINGO2偽エクソンスプライシングのRT-PCR解析。上方のバンドには、+11 SSOのトランスフェクションによって活性化される偽エクソンが含まれる。(B) IncuCyte (登録商標) 細胞増殖アッセイは、LINGO2 +11 SSOと非標的SSOコントロールを異なる濃度(トランスフェクション後の時間に対する細胞集密度)でトランスフェクトしたU251細胞の増殖曲線を示す。+11 SSOのトランスフェクションにより、用量依存的に成長が阻害される。

10

【図4】図4は、TAF2偽エクソンの包含は肺癌細胞の成長と増殖を阻害する、ことを示す。(A) TAF2偽エクソン+11 SSO及び非標的SSOコントロールでトランスフェクトされたNCI-H358細胞におけるTAF2偽エクソンスプライシングのRT-PCR解析。上方のバンドには、+11 SSOのトランスフェクションによって活性化される偽エクソンが含まれる。(B) TAF2偽エクソン+11 SSO及び非標的SSOコントロールでトランスフェクトされたNCI-H358細胞の増殖曲線を示す IncuCyte (登録商標) 細胞増殖アッセイ(トランスフェクション後の時間に対する細胞集密度)。+11 SSOのトランスフェクションによって成長が阻害される。(C) TAF2偽エクソン+11 SSO及び非標的SSOコントロールでトランスフェクトされたNCI-H358肺癌細胞の細胞生存率の指標として、450nmでの吸光度を示す WST-1細胞生存率及び増殖アッセイの棒グラフ。+11 SSOのトランスフェクションにより細胞生存率が低下する。

20

【図5】図5は、Sweet Spot領域を標的にするTRPM7 SSOの最適化を示す。(A+B) 20nMのTRPM7+9、+10、+11、+12、+13 SSOでトランスフェクトされた(A) HeLa細胞と(B) U251細胞におけるTRPM7偽エクソンスプライシングのRT-PCR解析であり、コントロール、トランスフェクション試薬(RNAiMAX)を使用した、又は使用しない(UTR)非標的コントロールSSO及び非トランスフェクト細胞のトランスフェクションを含む。上方のバンドには偽エクソンを含み、+9~+13のSSOのトランスフェクションによってその量が増加する。(C) IncuCyte (登録商標) 細胞増殖アッセイの棒グラフであり、TRPM7偽エクソン+13 SSO及びTRPM7 siRNA(KD)のトランスフェクション後68時間における相対細胞数を示し、コントロール、非標的コントロールSSOのトランスフェクション、及びトランスフェクション試薬(RNAiMAX)を使用した、又は使用しない(UTR)非トランスフェクション細胞を含む。+13 SSOのトランスフェクションによって成長が阻害される。スチューデントt検定、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.001$ 。

30

【図6】図6は、Sweet Spot領域を標的とするHIF1A SSOの最適化を示す。(A) HIF1A偽エクソン+9、+10、+11、+12、+13 SSOでトランスフェクトされたU251細胞におけるHIF1A偽エクソンスプライシングのRT-PCR解析。中央のバンドには偽エクソンが含まれており、+10 SSOによるトランスフェクションが最も効率が高い。偽エクソンの包含レベルは、Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies社)を使用して定量化した。(B) 正常酸素圧(N)又は低酸素(H)条件において、20nMのHIF1A偽エクソン+10 SSO及び非標的SSOコントロールでトランスフェクトされたU251細胞の成長と増殖の指標として吸光度を示すWST-1アッセイ。スチューデントt検定、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、及び*** $p < 0.001$ 。(C) 正常酸素圧又は低酸素条件で、20nMのHIF1A偽エクソン+10 SSO、非標的SSOコントロール及び非トランスフェクト細胞(UT)でトランスフェ

40

50

クトされた P A N C - 1 細胞から抽出したタンパク質のウェスタンブロットであり、ローディングコントロールとして H I F - 1 α 特異的抗体及び β -アクチン特異的抗体を使用する。H I F - 1 α タンパク質は正常酸素圧状態では存在しないが、コントロールでは低酸素状態で産生される。低酸素状態では、H I F - 1 α タンパク質の翻訳は + 1 0 S S O によって減少する。

【図 7】図 7 は、R N F 1 1 5 偽エクソンの包含により、R N F 1 1 5 タンパク質レベルが低下し、肺腺癌細胞の増殖が阻害される、ことを示す。(A) R N F 1 1 5 偽エクソン + 1 1 S S O 及び非標的 S S O コントロールでトランスフェクトされた N C I - H 2 3 細胞における R N F 1 1 5 偽エクソンスプライシングの R T - P C R 解析。上方のバンドには、+ 1 1 S S O のトランスフェクションによって活性化される偽エクソンが含まれる。(B) W S T - 1 アッセイは、異なるタイミングで、R N F 1 1 5 + 1 1 S S O 及び非標的 S S O コントロールでトランスフェクトされた N C I - H 2 3 細胞の増殖を示す。+ 1 1 S S O のトランスフェクションにより、用量依存的に成長が阻害される。(C) 5、10、20 n M の R N F 1 1 5 偽エクソン + 1 1 S S O、非標的 S S O コントロール、及び非トランスフェクト細胞 (U T) でトランスフェクトされた N C I - H 2 3 細胞から抽出したタンパク質のウェスタンブロットであり、R N F 1 1 5 特異的抗体、 β -カテニン抗体、及び β -アクチン特異的抗体をローディングコントロールとして使用した。R N F 1 1 5 及び β -カテニンのタンパク質レベルは、+ 1 1 S S O によって減少する。

【図 8】図 8 は、S M A D 2 偽エクソンの包含により肝星細胞の線維化が低下する、ことを示す。(A) S M A D 2 + 1 1 S S O 及び非標的 S S O コントロールでトランスフェクトされた H e L a 細胞における S M A D 2 偽エクソンスプライシングの R T - P C R 解析。上方のバンドには、+ 1 1 S S O によるトランスフェクションによって活性化される偽エクソンが含まれる。(B) S M A D 2 + 1 1 S S O 及び非標的 S S O コントロールでトランスフェクトされた L X - 2 肝星細胞における S M A D 2 偽エクソンスプライシングの R T - P C R 解析。(C) S M A D 2 S S O、非標的コントロール S S O、又は非トランスフェクト (U T R) H e p G 2 細胞でトランスフェクトされた H e p G 2 肝細胞から得たタンパク質のウェスタンブロッティング分析であり、タンパク質採取の 16 時間前に T G F β あり (+) 又は刺激なし (-) で刺激した。+ 1 1 S S O によるトランスフェクションにより、T G F β 刺激中に S M A D 2 とリン酸化 S M A D 2 が減少する。(D) L X - 2 肝星細胞は、S M A D 2 + 1 1 S S O 又は非標的 S S O コントロールでトランスフェクトされ、T G F β で 72 時間刺激した。細胞の位相差画像を撮影し、分化細胞の数を I m a g e J でカウントした。+ 1 1 S S O による S M A D 2 の減少は、線維症の T G F β 刺激中に筋線維芽細胞の形成を減少させる。

【図 9】図 9 は、S S O 媒介 L R R K 2 偽エクソンの包含を示す。(A) 誘導された L R R K 2 偽エクソンの包含の結果の模式図。L R R K 2 イントロン 47 からの 54 n t の偽エクソンを包含することは、翻訳された L R R K 2 タンパク質の W D 40 ドメインに 18 個のアミノ酸を導入し、同 5' スプライス部位を有する 82 n t の偽エクソンを包含することで、フレームシフトが発生し、ナンセンス変異依存 m R N A 分解機構 (N M D) による転写物の分解の標的となる未成熟終止コドンが挿入される。(B) L R R K 2 偽エクソン + 1 1 S S O 及び非標的 S S O コントロール (c t r l S S O) でトランスフェクトされた H e L a 細胞及び U 2 5 1 細胞における L R R K 2 偽エクソンスプライシングの R T - P C R 解析。上方のバンドは偽エクソンを含み、これは + 1 1 S S O のトランスフェクションによって m R N A に包含されるように活性化される。U T ; トランスフェクトされていない。

【図 10】図 10 は、L R R K 2 偽エクソン、c h r 12 : 40322690 - 40322887 (+) の S S O 媒介活性化の可能性は、偽エクソン 5' スプライス部位における共通 S N P、r s 10878372 A / G の存在に依存し、これにより偽エクソンの G 対立遺伝子特異的活性化が可能になる、ことを示す。(A) A 対立遺伝子の L R R K 2 偽エクソンの S w e e t S p o t 領域を標的とする S S O 治療の模式図。偽エクソン 5'

スプライス部位 (AGAgtagat) (配列番号368) のMaxEntスコアは-4.26と低い。SSO治療では、A対立遺伝子からの偽エクソンの包含は誘発されず、正常なmRNA転写物が生成され、機能タンパク質に翻訳することができる。これはLR RK2偽エクソン+11 SSO (5'-CAGACUACCAGACAUCUGACUAGAA-3') (配列番号333) 及び非標的SSOコントロール (ctrl SSO) (5'-GCUCAAU AUGCUACUGCCAU GCUUG-3') (配列番号126) でトランスフェクトされたA549細胞 (A対立遺伝子についてホモ接合性) におけるLR RK2偽エクソンスプライシングのRT-PCR解析によって示され、偽エクソン包含を有するバンドはアガロースゲル上に検出することができない。 (B) G対立遺伝子のLR RK2偽エクソンのSweet Spot領域を標的とするSSO治療の模式図。偽エクソン5' スプライス部位 (AGAgtaggt) (配列番号369) はMaxEntスコアが4.84と高い。SSO治療は、G対立遺伝子からの偽エクソン包含を誘発し、偽エクソンの包含によって、ナンセンス変異依存mRNA分解機構 (NMD) による分解についてmRNA転写物を標的にし、及び/又は切断されたタンパク質を翻訳することになるいくつかのインフレーム未成熟終止コドンを導入する。これは、LR RK2偽エクソン+11 SSO (5'-CAGACUACCAGACAUCUGACUAGAA-3') (配列番号333) 及び非標的SSOコントロール (ctrl SSO) (5'-GCUCAAU AUGCUACUGCCAU GCUUG-3') (配列番号126) でトランスフェクトされたLX-2細胞 (G対立遺伝子についてヘテロ接合性) におけるLR RK2偽エクソンスプライシングのRT-PCR解析によって示され、アガロースゲル状の上方のバンドは、偽エクソンの包含を示す。G対立遺伝子特異的偽エクソン活性化により、特定されたSNP (G) 及び優性病原性変異が同対立遺伝子に位置する場合、活性化過剰のLR RK2疾患対立遺伝子のダウンレギュレーションが可能になり、野生型への影響は最小限又は全くない。Ψ; 偽エクソン、WT; 野生型、MUT; 変異体。

【図11】図11は、Sweet Spot領域 (5' スプライス部位の+9~+39 nt下流) を標的とするSSOによって媒介される偽エクソンの活性化は、偽エクソンの3' 及び5' スプライス部位の強度に依存する、ことを示す。23merの3' スプライス部位 (イントロン-エクソン境界の-20~+3 nt) 又は9merの5' スプライス部位 (エクソン-イントロン境界の-3~+6 nt) に位置するSNPは、所与のスプライス部位の強度に影響し (MaxEntスコアを変化させる)、対立遺伝子特異的偽エクソンの活性化に利用することができ、これは、このようなSNPが、他の点では応答しない偽エクソンSSO治療の機能標的にすることができ、それによって、成熟mRNAの所与の偽エクソンを対立遺伝子特異的に包含し、又は所与の偽エクソンの包含が増加するためである。 (A) 偽エクソン3' 又は5' スプライス部位に低スコアのMaxEntスコアSNP変異体を有する対立遺伝子では、偽エクソンのSSO媒介活性化は不可能である、又は低い程度でしか可能にならない。正常なmRNA転写物が生成され、機能タンパク質に翻訳される。 (B) SNP変異体は、偽エクソン3' スプライス部位を強化し (MaxEntスコアを増加)、特定の3' スプライス部位の高スコアのMaxEntスコアSNP変異体を有する対立遺伝子からの偽エクソンのSSO媒介活性化を可能にする。 (C) SNP変異体は偽エクソン5' スプライス部位を強化し (MaxEntスコアを増加させる)、偽エクソンのSSO媒介活性化を可能にし、特定の5' スプライス部位を有する対立遺伝子から高いMaxEntスコアのSNP変異体にする。どちらの場合も、偽エクソンの包含は、ナンセンス変異依存mRNA分解機構 (NMD) による分解について、mRNA転写物を標的にすることができ、又は切断された非機能タンパク質の翻訳がなされ、それによって遺伝子発現が調節される。ヘテロ接合体における対立遺伝子特異的偽エクソン活性化により、特定されたMaxEntスコアが高いSNP変異体及び病原性変異が同対立遺伝子に位置する場合、野生型への影響が最小限の、又はまったく影響を及ぼさずに疾患対立遺伝子のダウンレギュレーションが可能になる。偽エクソンは、MaxEntスコアが高いSNP変異体のホモ接合体の両方の対立遺伝子から活性化される。*は、偽エクソン3' 又は5' スプライス部位の強度に影響を与えるSNPの可能性のある位置を示す。Ψ

；偽エクソン、WT；野生型、MUT；変異体。

【発明を実施するための形態】

【0023】

以下、本発明について更に詳しく説明する。

【0024】

定義

本発明を更に詳細に説明する前に、まず以下の用語と規則を定義する。

【0025】

偽エクソン（PE）

本発明の文脈では、「偽エクソン」又は「PE」という用語は、イントロン領域内に存在するが、通常はスプライセオソーム機構によって無視されるエクソン様配列に関係する。したがって、偽エクソンは、通常のスプライシング条件下では成熟したmRNAの一部にはならない、又は低レベルでのみ成熟したmRNAの一部になる。したがって、偽エクソンは3'及び5'スプライス部位に隣接するイントロン配列であるが、偽エクソンはmRNA転写物に含まれる量が少ないため、アノテーションが付けられないことが多い。更に、偽エクソンが含まれると、偽エクソンは、正常な転写物又はタンパク質の機能を破壊する、又は大幅に改変する。

【0026】

機能無効化偽エクソン

本発明の文脈では、「機能無効化偽エクソン」という用語は、成熟mRNAに偽エクソンが存在することで、（偽エクソンのない成熟mRNAと比較して）mRNAから発現されるタンパク質の不活性化、活性の低下、転写の低下、及び／又は機能の改変が生じる状況に関係する。

【0027】

エクソンスプライシングエンハンサー（ESE）

本明細書で使用される場合、用語「エクソンスプライシングエンハンサー（Exonic Splicing Enhancer）」又は「エクソンスプライシングエンハンサー（Exon Splicing Enhancer）」又は「ESE」は、エクソンに存在し、核スプライシング制御タンパク質の結合にアクセスできる場合、及び／又はpre-mRNAの二次構造又はその一部を形成することによって、pre-mRNAスプライシング中にこのエクソンが最終的にスプライスされたmRNAに組み込まれることを刺激するヌクレオチド配列を意味する。

【0028】

エクソンスプライシングサイレンサー（ESS）

本明細書で使用される用語「エクソンスプライシングサイレンサー（Exonic Splicing Silencer）」又は「エクソンスプライシングサイレンサー（Exon Splicing Silencer）」又は「ESS」は、エクソンに存在し、核スプライシング制御タンパク質の結合にアクセスできる場合、及び／又はpre-mRNAの二次構造又はその一部を形成することによって、pre-mRNAスプライシング中にこのエクソンが最終的にスプライスされたmRNAに含まれることを阻害するヌクレオチド配列を意味する。

【0029】

イントロンスプライシングエンハンサー（ISE）

本明細書で使用される用語「イントロンスプライシングエンハンサー（Intronic Splicing Enhancer）」又は「イントロンスプライシングエンハンサー（Intron Splicing Enhancer）」又は「ISE」は、イントロンに存在し、核スプライシング制御タンパク質の結合にアクセスできる場合、及び／又はpre-mRNAの二次構造又はその一部を形成することによって、pre-mRNAスプライシング中に最終的にスプライスされたmRNAへのエクソンの包含を刺激するヌクレオチド配列を意味する。

【0030】

イントロンスプライシングサイレンサー (ISS)

本明細書で使用される用語「イントロンスプライシングサイレンサー (Intronic Splicing Silencer)」又は「イントロンスプライシングサイレンサー (Intron Splicing Silencer)」又は「ISS」は、イントロンに存在し、核スプライシング調節タンパク質の結合にアクセスできる場合、及び／又は pre-mRNA の二次構造又はその一部を形成することによって、pre-mRNA スプライシング中に最終的にスプライスされた mRNA へのエクソンの包含を阻害するヌクレオチド配列を意味する。

【0031】

スプライス部位

イントロンの 5' 末端のスプライス部位は、多くの場合「5' スプライス部位」又は「スプライドナー部位」と呼ばれ、イントロンの 3' 末端のスプライス部位は、多くの場合「3' スプライス部位」又は「スプライスアクセプター部位」と呼ばれる。

【0032】

ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD)

「ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構」又は「NMD」は、すべての真核生物に存在する監視経路である。その主な機能は、未成熟終止コドン (PTC) を含む mRNA 転写物を排除することによって、遺伝子発現のエラーを減らすことである。本発明に関係して、導入された偽エクソンに PTC が存在する場合、又は偽エクソンが成熟転写物の読み取りフレームを変更する場合、偽エクソンの導入により NMD が誘発される可能性がある。

【0033】

ヌクレオチド

本明細書で使用する場合、「ヌクレオチド」とは、リン酸結合基を更に含むヌクレオシドを意味する。本明細書で使用する場合、「結合ヌクレオシド」はリン酸結合によって結合されていても結合されていなくてもよく、したがって「結合ヌクレオチド」を含むが、これに限定されない。本明細書で使用する場合、「結合ヌクレオシド」とは、連続配列に結合されたヌクレオシド（すなわち、結合されたヌクレオシド間に追加のヌクレオシドが存在しない）である。

【0034】

核酸塩基

本明細書で使用する場合、「核酸塩基」とは、糖部分に結合してオリゴヌクレオチドに組み込むことができるヌクレオシドを生成できる原子群を意味し、この原子群は、もうひとつ別のオリゴヌクレオチド又は核酸の相補的な天然核酸塩基と結合することができる。核酸塩基は天然に存在する場合もあれば、改変されている場合もある。

【0035】

未修飾核酸塩基

本明細書で使用する場合、「未修飾核酸塩基」又は「天然核酸塩基」という用語は、RNA 又は DNA の天然複素環式核酸塩基、すなわちプリン塩基のアデニン (A) 及びグアニン (G)、及びピリミジン塩基のチミン (T)、シトシン (C) (5-メチル C を含む)、及びウラシル (U) を意味する。

【0036】

修飾核酸塩基

本明細書で使用する場合、「修飾核酸塩基」とは、天然に存在する核酸塩基ではない任意の核酸塩基を意味する。

【0037】

修飾ヌクレオシド

本明細書で使用する場合、「修飾ヌクレオシド」とは、天然に存在する RNA 又は DNA ヌクレオシドと比較して少なくとも 1 つの化学修飾を含むヌクレオシドを意味する。修飾ヌクレオシドは、修飾糖部分及び／又は修飾核酸塩基を含む。

10

20

30

40

50

【0038】

拘束エチルヌクレオシド (c E t)

本明細書で使用する場合、「拘束エチルヌクレオシド」又は「c E t」は、4' - C H (C H 3) - O - 2' 架橋を含む二環式糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

【0039】

ロックド核酸ヌクレオシド (L N A)

本明細書で使用する場合、「ロックド核酸ヌクレオシド」又は「L N A」は、4' - C H 2 - O - 2' 架橋を含む二環式糖部分を含むヌクレオシドを意味する。

【0040】

2' - 置換ヌクレオシド

本明細書で使用する場合、「2' - 置換ヌクレオシド」とは、H又はOH以外の2' 位に置換基を含むヌクレオシドを意味する。特に明記しない限り、2' - 置換ヌクレオシドは二環式ヌクレオシドではない。

【0041】

2' - デオキシヌクレオシド

本明細書で使用する場合、「2' - デオキシヌクレオシド」とは、天然のデオキシリボヌクレオシド (D N A) に見られる2' - Hフラノシル糖部分を含むヌクレオシドを意味する。特定の実施形態では、2' - デオキシヌクレオシドは、修飾核酸塩基を含んでもよく、又はR N A核酸塩基 (例えば、ウラシル) を含んでもよい。

【0042】

オリゴヌクレオチド

本明細書で使用する場合、「オリゴヌクレオチド」とは、複数の結合したヌクレオシドを含む化合物を意味する。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、1つ以上の未修飾リボヌクレオシド (R N A) 及び／又は未修飾デオキシリボヌクレオシド (D N A) 及び／又は1つ以上の修飾ヌクレオシドを含む。

【0043】

末端基

本明細書で使用する場合、「末端基」とは、オリゴヌクレオチドの3' 末端又は5' 末端のいずれか、又は両方に結合した1つ以上の原子を意味する。特定の実施形態では、末端基は共役基である。特定の実施形態では、末端基は1つ以上の末端基ヌクレオシドを含む。

【0044】

共役基

本明細書で使用する場合、「共役基」とは、オリゴヌクレオチド又はオリゴマー化合物に結合した原子又は原子群を意味する。一般に、共役基は、結合している化合物の1つ以上の特性を変更し、これには、薬力学、薬物動態、結合、吸収、細胞分布、細胞取り込み、電荷、及び／又はクリアランス特性が含まれるが、これらに限定されない。

【0045】

共役連結基

本明細書で使用する場合、「共役連結基」とは、共役基をオリゴヌクレオチド又はオリゴマー化合物に結合するために使用される任意の原子又は原子群を意味する。

【0046】

スプライススイッチングオリゴヌクレオチド (S S O)

本明細書で使用する場合、「スプライススイッチングオリゴヌクレオチド」又は「S S O」とは、少なくとも一部が標的核酸と相補的であり、ハイブリダイズ可能であり、標的 p r e - m R N A のスプライシングパターンに少なくとも1つの変化をもたらすオリゴヌクレオチドを含む、又はオリゴヌクレオチドからなる化合物を意味する。

【0047】

スプライススイッチングオリゴヌクレオチドは、スプライススイッチングアンチセンスオリゴマー (S S O) と呼ばれる。

10

20

30

40

50

【0048】

mRNA

本明細書で使用する場合、「mRNA」とは、タンパク質をコードするRNA分子を意味する。

【0049】

Pre-mRNA

本明細書で使用する場合、「pre-mRNA」とは、mRNAに完全に処理されていないRNA転写物を意味する。pre-mRNAには1つ以上のイントロンが含まれる。

【0050】

標的 pre-mRNA

本明細書で使用する場合、用語「標的 pre-mRNA」は、SSOがハイブリダイズする核酸分子を意味する。

【0051】

標的 pre-mRNAのスプライシングパターンの変化

本明細書で使用する場合、「標的 pre-mRNAのスプライシングパターンの変化」とは、標的 pre-mRNAの参照ヌクレオチド配列と比較した場合に、生成されたmRNAに、例えば偽エクソン又はその一部に対応する割合が挿入される、pre-mRNAスプライシング過程の変化を意味する。

【0052】

転写物

本明細書において、「転写物」とは、DNAから転写されたRNA分子を意味する。転写物には、mRNA、pre-mRNA、部分的に処理されたRNAが含まれるが、これらに限定されない。

【0053】

標的とする及び～に標的化される

本明細書において、「標的とする」又は「～に標的化される」とは、特定の標的核酸分子又は標的核酸分子の特定の領域へのSSOの結合を意味する。SSOは、標的核酸と十分に相補的であり、生理学的条件下でハイブリダイゼーションを可能にする場合に、標的核酸を標的とする。

【0054】

核酸塩基相補性と相補性

本明細書で使用する場合、核酸塩基に関連して「核酸塩基相補性」又は「相補性」は、もうひとつ別の核酸塩基と塩基対を形成できる核酸塩基を意味する。例えば、DNAでは、アデニン（A）はチミン（T）と相補的である。例えば、RNAでは、アデニン（A）はウラシル（U）と相補的である。特定の実施形態では、相補的核酸塩基とは、標的核酸の核酸塩基と塩基対を形成できるSSOの核酸塩基を意味する。例えば、SSOの特定の位置にある核酸塩基が、標的核酸の特定の位置で核酸塩基と水素結合できる場合、オリゴヌクレオチドと標的核酸間の水素結合の位置は、その核酸塩基対で相補的であると見なされる。特定の修飾を含む核酸塩基は、対応する核酸塩基と対になる能力を維持することができ、したがって、核酸塩基相補性は依然として可能である。

【0055】

本明細書で使用する場合、オリゴマー化合物（例えば、結合したヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、又は核酸）に関して「相補的」とは、そのオリゴマー化合物又はその領域が、厳しい条件下で核酸塩基の相補性を通じて別のオリゴマー化合物又はその領域とハイブリダイズする能力を意味する。相補的オリゴマー化合物は、各ヌクレオシドにおいて核酸塩基の相補性を有する必要はない。むしろ、多少のミスマッチは許容される。特定の実施形態では、相補的なオリゴマー化合物又は領域は、核酸塩基の70%で相補的である（70%相補的）。特定の実施形態では、相補的なオリゴマー化合物又は領域は80%相補的である。特定の実施形態では、相補的なオリゴマー化合物又は領域は90%相補的である。特定の実施形態では、相補的なオリゴマー化合物又は領域は95%相補的である。特

10

20

30

40

50

定の実施形態では、相補的なオリゴマー化合物又は領域は100%相補的である。もうひとつ別の実施形態では、オリゴマー化合物は、最大3つのミスマッチ、例えば最大2つ又は1つのミスマッチを含む。ミスマッチが存在しないことが望ましい。

【0056】

ハイブリダイゼーション

本明細書において、「ハイブリダイゼーション」とは、相補的なオリゴマー化合物（例えば、SSOとその標的核酸）の対合を意味する。特定のメカニズムに限定されるわけではないが、最も一般的な対合のメカニズムには、相補的な核酸塩基間の水素結合、ワトソン・クリック型、フーグスティーン型、又は逆フーグスティーン型水素結合、が含まれる。

10

【0057】

モチーフ

本明細書で使用する場合、「モチーフ」とは、オリゴマー化合物又はその領域における化学修飾のパターンを意味する。モチーフは、オリゴマー化合物の特定のヌクレオシド及び／又は特定の結合基における修飾によって定義され得る。

【0058】

本明細書で使用する場合、「ヌクレオシドモチーフ」とは、オリゴマー化合物又はその領域におけるヌクレオシド修飾のパターンを意味する。このようなオリゴマー化合物の結合は、修飾されていても、修飾されていなくてもよい。特に明記しない限り、本明細書においてヌクレオシドのみを説明するモチーフは、ヌクレオシドモチーフであることが意図される。したがって、このような場合には、結合は制限されない。

20

【0059】

本明細書で使用する場合、「糖モチーフ」とは、オリゴマー化合物又はその領域における糖修飾のパターンを意味する。

【0060】

本明細書で使用する場合、「結合モチーフ」とは、オリゴマー化合物又はその領域における結合修飾のパターンを意味する。このようなオリゴマー化合物のヌクレオシドは、修飾されていても、修飾されていなくてもよい。特に明記しない限り、本明細書で結合のみを説明するモチーフは結合モチーフであることが意図される。したがって、このような場合には、ヌクレオシドは制限されない。

30

【0061】

修飾のタイプ

本明細書で使用する場合、ヌクレオシド又はある「タイプ」のヌクレオシドに関する「修飾のタイプ」は、ヌクレオシドの化学修飾を意味し、修飾ヌクレオシドと未修飾ヌクレオシドが含まれる。したがって、特に断りがない限り、「第1のタイプの修飾を有するヌクレオシド」は、未修飾ヌクレオシドであってもよい。

【0062】

異なって修飾される

本明細書で使用する場合、「異なって修飾される」とは、修飾が存在しないことも含め、互いに異なる化学修飾又は化学置換基を意味する。したがって、例えば、DNAヌクレオシドが未修飾であっても、MOEヌクレオシドと未修飾DNAヌクレオシドは「異なって修飾されている」ことになる。同様に、DNAとRNAはどちらも天然に存在する未修飾ヌクレオシドであっても、「異なって修飾」される。同じであるが異なる核酸塩基を含むヌクレオシドは、異なって修飾されない。例えば、2'-OMe修飾糖と未修飾アデニン核酸塩基を含むヌクレオシドと、2'-OMe修飾糖と未修飾チミン核酸塩基を含むヌクレオシドとは、異なって修飾されない。

40

【0063】

MaxEntスコア

MaxEntスコアは、スプライス部位内の位置間の隣接依存関係と非隣接依存関係を考慮する当業者に知られているスコアであり、最大エントロピー原理を使用して最適なス

50

プライス部位を特定する。スコアが高いということは、機能的に強力なスプライス部位である可能性が高いことを示すが、スコアが低いスプライス部位は、ESE又はISEモチーフでpre-mRNAに結合したスプライシングファクターによる活性化を通じて機能的になる可能性がある。同様に、スコアの低いスプライス部位は、阻害スプライシング因子に結合する、近くにある、又は重複するESS又はISSモチーフによって機能的に抑制される可能性がある。

【0064】

本発明に記載のMaxEntスコアは、プログラム「MaxEntScan」バージョン20-04-2004を使用して決定される。同ソフトウェアを使用して、次のことを決定できる。

10

5' スプライス部位のスコア

(http://hollywood.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html)、及び

3' スプライス部位のスコア

(http://hollywood.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq_acc.html)。

【0065】

MaxEntスコアの決定については、Gene Yeo and Christopher B. Burge (J Comput Biol.) 2004; 11(2-3): 377-94) に更に詳しく説明されている。

20

【0066】

MaxEntスコアは、1つの方法でのみ決定できる特定の値である。

【0067】

MaxEntスコアを含めると全体的な予測可能性が大幅に改善し、好ましいことであるが、本発明の特定の実施形態では、MaxEntスコアは任意である。

【0068】

偽エクソンの特定

偽エクソンは、二重接合アプローチを使用して、3' スプライス部位及び5' スプライス部位の正確なゲノム座標で特定される。このアプローチでは、RNA配列断片がフィルタリングされ、少なくとも2つのスプライシングジャンクションのエビデンスがあるものだけが保持される。エクソン座標はマッピングされた読み取りデータから抽出することができ、直接的な配列がない断片の中央に一定の長さのギャップができる。同じ断片の両端でスプライシングジャンクションによって支持されているエクソンは、既知の遺伝子アノテーションと比較して分類され、新しい偽エクソンは、既存のエクソンではなくイントロンと重複するエクソンとして特定できる。

30

【0069】

「Sweet Spot領域」は、偽エクソンの5' スプライス部位の下流の+9から+39までの領域として定義され、両方の位置が含まれる。Sweet Spot領域内の領域に結合するSSOによって活性化できる偽エクソンは、以下のパラメータによって特定される。

40

偽エクソンパラメータ／基準：

- ・ 偽エクソンの長さ<160nt、
- ・ 偽エクソンの長さ>30nt、
- ・ 偽エクソンの最後の3ntはTAGと異なり、
- ・ ドナースプライス部位は、MaxEntスコア ≥ 4.33 を有し、
- ・ ドナースプライス部位は、MaxEntスコア ≤ 10.06 を有し、及び
- ・ アクセプタースプライス部位は、MaxEntスコア ≥ 3.63 を有する、

前記偽エクソンの5' スプライス部位の下流の配列領域+9～+39のパラメータ／基準：

- ・ 総ピリミジン数 ≤ 20 、
- ・ 総チミジン塩基数 ≤ 12 、

50

- ・ 総チミジン塩基数 ≥ 4 、
- ・ 総グアニン塩基数 ≤ 12 、
- ・ チミジンポリマーの最大長 ≤ 4 、
- ・ ピリミジンポリマーの最大長 ≤ 10 、
- ・ プリンポリマーの最小長 ≥ 3 、及び
- ・ 少なくとも 3 nt の長さのグアニンポリマーの最大数 ≤ 2 。

【0070】

RNA配列では、ウラシルの存在は、対応するDNA配列の同じ位置におけるチミジンの存在と同等であると考えられる場合がある。そのため、DNA配列内のチミジンの存在は、対応するRNA配列内の同じ位置にあるウラシルと同等であるとも考えられる。したがって、チミジン及びピリミジンを含む配列を網羅する基準は、分析される配列がRNA配列である場合のウラシル及びピリミジンを含む配列について相当する基準と同一である。

10

【0071】

配列の特定及びSSOの生成

上で概説したように、本発明は、偽エクソンを含む遺伝子の配列パラメータの特定に関するものであり、これを使用して、スプライススイッチングオリゴヌクレオチド(SSO)を使用して偽エクソンを成熟mRNAに(高い確率で)組み込むことが可能かどうかを決定することができる(実施例1及び対応する図も参照されたい)。したがって、本発明の一態様は、前記偽エクソンの5'スプライス部位に対して下流の領域+9~+39においてpre-mRNAに結合して、偽エクソンの成熟mRNAへの組み込みを促進することによって、細胞内の標的タンパク質の発現を調節することができるSSOを特定する方法であって、方法は以下を含み、

20

- 1つ以上の特定された偽エクソンを含む1つ以上の遺伝子配列を提供すること、
- 1つ以上の遺伝子配列について、偽エクソンが以下の基準を満たすかどうかを決定すること、

- ・ 偽エクソンの長さ $< 160 \text{ nt}$ 、
- ・ 偽エクソンの長さ $> 30 \text{ nt}$ 、
- ・ 偽エクソンの最後の 3 nt はTAGと異なり、
- ・ ドナースプライス部位は、MaxEntスコア ≥ 4.33 を有し、
- ・ ドナースプライス部位は、MaxEntスコア ≤ 10.06 を有し、及び
- ・ アクセプタースプライス部位はMaxEntスコア ≥ 3.63 を有し、

30

- 1つ以上の遺伝子配列について、前記偽エクソン(3)の5'スプライス部位に対して下流の配列領域+9~+39が以下の基準を満たしているかどうかを決定すること、

- ・ 総ピリミジン数 ≤ 20 、
- ・ 総チミジン塩基数 ≤ 12 、
- ・ 総チミジン塩基数 ≥ 4 、
- ・ 総グアニン塩基数 ≤ 12 、
- ・ チミジンポリマーの最大長 ≤ 4 、
- ・ ピリミジンポリマーの最大長 ≤ 10 、
- ・ プリンポリマーの最大長 ≥ 3 、及び
- ・ 少なくとも 3 nt の長さのグアニンポリマーの最大数 ≤ 2 、

40

1つ以上の遺伝子配列がポイントb)及びポイントc)による基準を満たす場合、前記偽エクソンの5'スプライス部位に対して下流の前記領域+9~+39は、前記偽エクソン(3)の5'スプライス部位に対して下流の領域+9~+39内の前記遺伝子のpre-mRNA(2)に生体内でハイブリダイズすることができるSSOについての標的と考えられ、結果として、前記偽エクソン(3)はSSO(1)と接触してない対応するpre-mRNAに比べて、より大きな程度で成熟mRNAの部分となり、

並びに

任意に医薬品として使用するために、任意に前記SSOを生成すること、を含む。

50

【0072】

実施例2で概説したように、含まれる選択パラメータ（基準）は、SSOを使用できる遺伝子（実施例2の表1）と、SSOを偽エクソンに組み込むことができない遺伝子（実施例2の表2）を区別できる。

【0073】

一実施形態では、本発明はコンピュータによって実装される（任意に医薬品として使用するために前記SSOを生成する任意のステップを除く）。

【0074】

もうひとつ別の実施形態では、1つ以上の特定された偽エクソンを含む1つ以上の遺伝子配列は、データベースの形態で、又は別のデジタル記憶手段で提供される。

10

【0075】

一実施形態では、1つ以上の特定された偽エクソンを含む1つ以上の遺伝子配列は、遺伝子の発現の増加又は遺伝子の機能の改変を特徴とする優性陰性タンパク質をコードする遺伝子などの疾患原因遺伝子を含む遺伝子配列である。

【0076】

もうひとつ別の実施形態では、偽エクソンは、癌、糖尿病、炎症、神経変性又は神経障害、組織変性、組織線維症及び硬化、代謝性疾患、慢性肝疾患及び遺伝性網膜ジストロフィー（IRD）に関連する遺伝子など、正常な機能遺伝子産物のレベルの低下が治療上の利点を有する遺伝子内に存在する。

【0077】

20

更に別の実施形態では、1つ以上の特定された偽エクソンを含む1つ以上の遺伝子配列は、癌、糖尿病、炎症、神経変性又は神経障害、組織変性、組織線維症及び硬化、代謝性疾患、慢性肝疾患及び遺伝性網膜ジストロフィー（IRD）などの疾患を引き起こす／増強する／影響を及ぼすタンパク質をコードする遺伝子などの疾患原因遺伝子を含む遺伝子配列である。疾患の原因は発現の増強であり得る。

【0078】

更に別の実施形態では、1つ以上の特定された偽エクソンを含む1つ以上の遺伝子配列は、遺伝性疾患を引き起こすことが知られているだけではない遺伝子配列である。

【0079】

好ましい実施形態では、SSOは、前記偽エクソンの5'スプライス部位に対して下流の特定された領域+9～+39に対して生成され、その領域は上記で概説した基準を満たす。実施例3～10は、特定された標的配列に対するSSOの効果の具体的な例を示す。

30

【0080】

一実施形態では、前記生成されたSSOは、偽エクソン（3）の5'スプライス部位に対して下流の領域+9～+39、例えば5'スプライス部位に対して下流の領域+11～+35内に相補的又は実質的に相補的な配列を含む。実施例のセクション（実施例2～8）では、位置+11～+35に相補的なSSOが使用された（長さ25nt）。実施例9及び10では、SSOの標的領域の特定の最適化が、2つの遺伝子HIF1A及びTRPM7について更に最適化されている。実施例3及び13では、SSOの標的領域の特定の最適化が、2つの遺伝子SMAD2及びLRRK2に対して更に最適化されている。

40

【0081】

別の実施形態では、前記生成されたSSOは、前記偽エクソン（3）の5'スプライス部位に対して下流の領域+9～+39に実質的に相補的な配列を含み、最大3つのミスマッチ、例えば最大2つのミスマッチ、又は例えば最大1つのミスマッチを含む。

【0082】

一実施形態では、前記生成されたSSOは、前記偽エクソン（3）の5'スプライス部位に対して下流の領域+9～+39、例えば5'スプライス部位に対して下流の領域+11～+35内に相補的な配列を含む。実施例では、位置+1～+35を標的とするSSOが試験された。

【0083】

50

一実施形態では、相補領域は、9～31ヌクレオチド、例えば15～30、例えば15～25、又は例えば9～15、又は例えば15～30、例えば20～25の範囲である。例えば、LNA又はその他の高結合ヌクレオチドが使用される場合、SSOの長さはより短い範囲になる可能性がある。

【0084】

SSOは異なる方法で標的タンパク質の発現を調節できる。したがって、一実施形態では、SSOをpre-mRNAを生体内でハイブリダイズした結果、

- ー 機能タンパク質(4)をコードするmRNAのレベルの低下及び／又は
- ー 機能タンパク質(6)の発現の減少、及び／又は
- ー 機能タンパク質(5)の機能喪失、及び／又は
- ー 機能タンパク質(6)の新たな機能、及び／又は
- ー タンパク質の誤った局在化、
- ー 機能タンパク質をコードするmRNAの誤った局在化が生じる。

10

【0085】

更に別の実施形態では、ステップa)からの1つ以上の遺伝子配列は、遺伝子の発現の増加又は機能の改変を特徴とする障害又は状態を引き起こす。一実施形態では、障害又は状態は常染色体優性陰性障害である。

【0086】

更に別の実施形態では、ステップa)からの1つ以上の遺伝子配列は、正常な機能遺伝子産物のレベルが減少した場合に治療上有益である。一実施形態では、障害又は状態は、疾患を引き起こす遺伝子と直接関連していない。

20

【0087】

一実施形態では、前記SSOは、9～100ヌクレオチドの範囲、例えば9～50ヌクレオチド、好ましくは9～40ヌクレオチドの範囲、より好ましくは15～31ヌクレオチド又は15～25ヌクレオチドの範囲の長さを有する。

【0088】

一実施形態では、前記SSOは、pre-mRNAのポリヌクレオチドに相補的又は実質的に相補的な配列を含み、この配列の長さは9～31ヌクレオチド、例えば15～25ヌクレオチドであり、好ましくは、配列は9～31ヌクレオチド、例えば9～20ヌクレオチド、又は例えば20～31ヌクレオチド、例えば25～31ヌクレオチドの範囲で相補的である。

30

【0089】

好ましい実施形態では、前記生成されたSSOは、糖修飾ヌクレオチドなどの1つ以上の人工ヌクレオチドを含む。

【0090】

別の好ましい実施形態では、SSOは、生体内でmRNAのRNAse H媒介分解を媒介しない。

【0091】

一実施形態では、少なくとも1つの修飾糖部分は2'-置換糖部分である。

【0092】

一実施形態では、前記2'-置換糖部分は、2'-O-メチル(2'-OMe)、2'-フルオロ(2'-F)、及び2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)からなる群から選択される2'-置換を有する。

40

【0093】

一実施形態では、少なくとも1つの前記2'-置換糖部分の2'-置換は、2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)である。

【0094】

一実施形態では、少なくとも1つの修飾糖部分は二環式糖部分である。

【0095】

一実施形態では、少なくとも1つの二環式糖部分は、ロックド核酸(LNA)又は拘束

50

エチル (c E t) ヌクレオシドである。

【0096】

一実施形態では、少なくとも1つの糖部分は糖代替物である。

【0097】

一実施形態では、少なくとも1つの糖代替物はモルホリノである。

【0098】

一実施形態では、少なくとも1つのモルホリノは修飾モルホリノである。

【0099】

一実施形態では、SSOは少なくとも1つのヌクレオシド間N3'~P5'へのホスホラミデートジエステル結合を含む。

10

【0100】

一実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのヌクレオシド間ホスホロチオエート結合を含む。

【0101】

一実施形態では、すべてのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートである。

【0102】

一実施形態では、SSOは、Gal-Nac、(ポリ)不飽和脂肪酸(オレオイル、リノレノイルなど)、アニサミド、アナンダミド、葉酸(FolA)、カルバコール、エストロン、Retro-1、リン脂質、 α -トコフェロール(α -TP)、コレステロール、スクアレノ(SQ)、非分岐脂肪酸(ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル及びドコサノイルなど)、及び細胞浸透ペプチドからなる群から選択される送達要素に結合される。

20

【0103】

一実施形態では、1つ以上の特定された偽エクソンを含む1つ以上の遺伝子配列は、癌、炎症性疾患、神経変性疾患又は神経疾患、代謝性疾患、慢性肝疾患、及び遺伝性網膜ジストロフィー(IRD)からなる群から選択される疾患又は障害に關与する。

【0104】

一実施形態では、慢性肝疾患は非アルコール性脂肪性肝疾患である。

【0105】

一実施形態では、この癌は、脳癌、神経膠芽腫、肺癌、大腸癌、皮膚癌、膵臓癌、膀胱癌、肝臓癌、乳癌、眼癌、及び前立腺癌からなる群から選択される。

30

【0106】

更に別の実施形態では、この癌は、多発性骨髄腫、急性骨髄芽球性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病及び慢性リンパ性白血病からなる群より選択されるような血液癌である。

【0107】

実施例のセクションで概説されるように、発明チームは、成熟したmRNAに組み込むことができ、それによって発現した(疾患を引き起こす)タンパク質の機能を不活性化/阻害/改変することができる偽エクソンを含む複数の臨床関連遺伝子を特定した。

【0108】

したがって、一実施形態では、このSSOは、以下の群から選択される核酸内の領域と相補的又は実質的に相補的である、

40

一 配列番号106(RNF115)、1~26、79~105、107~125及び137~201のいずれかに記載の核酸、又は

一 配列番号106、1~26、79~105、107~125、137~201のいずれかと比較して、1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は

一 いずれかの配列番号106、1~26、79~105、107~125、137~201のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列。

【0109】

好ましい実施形態では、この生成されたSSOは、以下の群から選択される核酸内の領

50

域と相補的又は実質的に相補的である、

- － 配列番号 79～100 のいずれかの核酸、又は
- － 配列番号 79～100 のいずれかと比較した場合に 1 若しくは 2 若しくは 3 個の置換を含む核酸、又は
- － 配列番号 79～100 のいずれかと少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列。
【0110】

より好ましい実施形態では、前記生成された SSO は、以下の群から選択される核酸内の領域と相補的又は実質的に相補的である、

- － 配列番号 79～85 のいずれかに記載の核酸、又は
- － 配列番号 79～85 のいずれかと比較した場合に 1 若しくは 2 若しくは 3 個の置換を含む核酸、又は
- － 配列番号 79～85 のいずれかと少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列。
【0111】

実施例のセクションで提供される遺伝子配列データに基づいて、当業者は、例えば表の下線付きのセクションを使用し、それに相補的な SSO を設計することによって、この情報を特定の SSO 配列に簡単に翻訳できる。

【0112】

- －実施形態では、SSO は以下からなる群から選択される。
- － 配列番号 127～136 のいずれかに記載の核酸、又は
- － 配列番号 127～136 のいずれかと比較した場合に 1 若しくは 2 若しくは 3 個の置換を含む核酸、又は
- － 配列番号 127～136 のいずれかと少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列。

【0113】

好ましくは、核酸は配列番号 127 又は 128 又は 133 又は 136 である。実施例 9 及び 10 に示すように、これらの SSO は Sweet Spot 領域内で最適化されている。したがって、結合領域を例えば 1 つ又は 2 つの位置だけ移動させることによって、効率は驚くほど更に向上し得る。より好ましくは、核酸は配列番号 128 又は 136 である。

【0114】

別の好ましい実施形態では、SSO は、以下からなる群から選択される核酸内の領域と相補的又は実質的に相補的である、

- 配列番号 21 (SMAD2 を標的とする)、配列番号 106 (RNF115 を標的とする) 並びに配列番号 141、142、158 及び 159 (LRRK2 を標的とする) のいずれかに記載の核酸、
- 配列番号 21、106、141、142、158 及び 159 のいずれかと比較した場合に 1 若しくは 2 若しくは 3 個の置換を含む核酸、又は
- 配列番号 21、106、141、142、158 及び 159 のいずれかと少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列。

【0115】

実施例 3 は SMAD2 標的化に関するデータを示す (実施例 11 も参照されたい)。

【0116】

実施例 12 は RNF115 標的化のデータを示す。

【0117】

実施例 13 は、対立遺伝子特異的標的化を含む LRRK2 標的化に関するデータを示す。

【0118】

更に別の好ましい実施形態では、SSO は、以下からなる群から選択される核酸内の領域と相補的又は実質的に相補的である、

- 配列番号 100、114、118、150 及び 151 のいずれかに記載の核酸、

- 配列番号 100、114、118、150、151 のいずれかと比較した場合に 1 若しくは 2 若しくは 3 個の置換を含む核酸、又は
- 配列番号 100、114、118、150 及び 151 のいずれかと少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列。

【0119】

更に別の好ましい実施形態では、SSO は、以下からなる群から選択される核酸内の領域と相補的又は実質的に相補的である、

- 配列番号 12、24 若しくは 26 のいずれかに記載の核酸、
- 配列番号 12、24 若しくは 26 のいずれかと比較した場合に 1 若しくは 2 若しくは 3 個の置換を含む核酸、又は
- 配列番号 12、24 若しくは 26 のいずれかと少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列。

【0120】

実施例のセクションで概説したように、異なる遺伝子は、本発明に記載の選択基準を使用して既に標的化されている（実施例 2、表 1）、又は本発明に記載の選択基準を使用して標的配列として特定されている（実施例 8、表 3、実施例 11、表 6～7）。したがって、一実施形態では、生成された SSO は、表 1、表 3、表 6、及び表 7（Sweet Spot 領域）に概説されているように、配列番号と相補的又は実質的に相補的である。

【0121】

表 1 又は表 3 又は表 6～7 に列挙される遺伝子は、以下に概説するように、特定の疾患に関連して特に好ましい場合がある。繰り返しになるが、SSO の Sweet Spot は、表 1、表 3、及び表 6～7 に概説される。表 2 は、本発明に記載の基準を満たしておらず、SSO の機能部位ではない偽エクソン配列を示す。

【0122】

フレーム外の癌（NMD）：

以下の遺伝子は、癌治療に関係する標的に関連する可能性がある、TXNRD1、SLC7A11、STAT5B、MAPKAPK5、ZYG11A、ROCK1、MCCC2、SMYD2、DIAPH3、COPS3、SNX5、YBX1、CHD1L、PTPN11、UBAP2L、RNF115、HGS、TLK1、WWTR1、HMGCS1、SND1、THOC2、ORC1、TAF2、HIF1A、TRPM7、CPPS1、LRP6、MELK、TTBK2、TTK、ITGBL1、ROCK2、TASP1、FLT1、KNTC1、SMC1A、ZNF558、PMPCB 及び DBI。

【0123】

したがって、一実施形態では、生成された SSO は、表 1 及び表 3 及び表 6～7 に概説される配列番号と相補的又は実質的に相補的であり、遺伝子は、TXNRD1、SLC7A11、STAT5B、MAPKAPK5、ZYG11A、ROCK1、MCCC2、SMYD2、DIAPH3、COPS3、SNX5、YBX1、CHD1L、PTPN11、UBAP2L、RNF115、HGS、TLK1、WWTR1、HMGCS1、SND1、THOC2、ORC1、TAF2、HIF1A、TRPM7、CPPS1、LRP6、MELK、TTBK2、TTK、ITGBL1、ROCK2、TASP1、FLT1、KNTC1、SMC1A、ZNF558、PMPCB 及び DBI からなる群から選択され、癌の治療に使用される。好ましい実施形態では、遺伝子は RNF115 である（実施例 12 を参照されたい）。

【0124】

フレーム内の癌：

以下の遺伝子は、癌治療に関係する標的に関連する可能性がある、ROCK1、E2F3、LRIG2、HSPG2、SLC2A1、KNTC1、DIAPH3、FDFT1、THOC2 及び SMC1A、DDR2、STAG2、TRPM7、LINGO2、RAP1GDS、BUD1、CD44、CDKL5、RNF115、UBAP2L、ZNF558、RBPJ、EFEMP1 及び FLT1。

【0125】

したがって、一実施形態では、生成されたSSOは、表1及び表3及び表6～7に概説される配列番号と相補的又は実質的に相補的であり、遺伝子は、ROCK1、E2F3、LRIG2、HSPG2、SLC2A1、KNTC1、DIAPH3、FDF1、THOC2、DDR2、STAG2、TRPM7、LINGO2、SMC1A、RAP1GDS、BUD1、CD44、CDKL5、RNF115、UBAP2L、ZNF558、RBPJ、EFEMP1及びFLT1からなる群から選択され、癌の治療に使用される。

【0126】

神経疾患（フレーム外）：

以下の遺伝子は、神経疾患に関係する標的に関連する可能性がある、ROCK1、HTT、OGA、TMEM97、PICALM、LRRK2、UBAP2L、SMC1A、TTBK2。

10

【0127】

したがって、一実施形態では、生成されたSSは、表1、表3、及び表6～7に概説される配列番号と相補的又は実質的に相補的であり、遺伝子は、ROCK1、HTT、OGA、TMEM97、PICALM、LRRK2、UBAP2L、SMC1A、及びTTBK2からなる群から選択され、神経疾患の治療に使用される。好ましい実施形態では、遺伝子はLRRK2である（実施例13を参照のこと）。

【0128】

更により好ましい実施形態では、神経疾患は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、及び脊髄性筋萎縮症からなる群から選択される。

20

【0129】

神経変性とは、ニューロンの死を含む、ニューロンの構造又は機能の進行性の喪失である。筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病及びプリオン病を含む多くの神経変性疾患は、神経変性の過程の結果として発症する。

【0130】

神経疾患（フレーム内）：

以下の遺伝子は、神経疾患に関係する標的に関連する可能性がある、ROCK1、E2F3、SLC2A13、ASIC1、TRPM7、LINGO2、LRIG2、LRRK2、UBAP2L、SMC1A、ATXN7、及びCLCN1。

30

【0131】

したがって、一実施形態では、生成されたSSOは、表1、表3、及び表6～7に概説される配列番号と相補的又は実質的に相補的であり、遺伝子は、ROCK1、E2F3、SLC2A13、TRPM7、LINGO2、ASIC1、LRIG2、LRRK2、UBAP2L、SMC1A、ATXN7及びCLCN1からなる群から選択され、神経疾患の治療に使用される。

【0132】

また、更に好ましい実施形態では、神経疾患は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、及び脊髄性筋萎縮症からなる群から選択される。

40

【0133】

糖尿病：

以下の遺伝子、TXNRD1（糖尿病）、DYRK1A（糖尿病）、TRPM7（糖尿病）、PHLPP1（糖尿病及び肥満）は、糖尿病に関係する標的に関連する可能性がある。

【0134】

したがって、一実施形態では、生成されたSSOは、表1及び表3及び表6～7に概説される配列番号と相補的又は実質的に相補的であり、遺伝子は、TXNRD1、DYRK1A、TRPM7、及びPHLPP1からなる群から選択され、糖尿病の治療に使用され

50

る。好ましい実施形態では、糖尿病は1型糖尿病及び2型糖尿病から選択される。

【0135】

別の実施形態では、生成されたSSOは、表1、表3、及び表6～7に概説される配列番号と相補的又は実質的に相補的であり、遺伝子は、LINGO2、SMAD2、ORC1、DDR2、STAG2、TRPM7、HIF1A、HTT、TAF2、CSPP1、RN115、LRRK2、UBAB2L、LRP6、MELK、及びKNTC1からなる群から選択される。これら16個の遺伝子はすべて、すべての基準に一致する偽エクソンを含み、いずれもSweet Spot領域内に位置するSSOによって活性化され（表1、表3、及び表6～7を参照）、高い治療能を有する。

【0136】

一実施形態では、この方法はコンピュータによって実装される。したがって、本発明は、ハードウェア、ソフトウェア、ファームウェア、又はこれらの任意の組み合わせによって実装することができる。本発明又はその特徴の一部は、1つ以上のデータプロセッサ及び／又はデジタル信号プロセッサ上で実行されるソフトウェアとして実装することもできる。

【0137】

本発明の実施形態の個々の要素は、単一のユニット、複数のユニット、又は個別の機能ユニットの一部としてなど、任意の適切な方法で物理的、機能的、論理的に実装することができる。本発明は、単一のユニットで実装する、又は異なるユニット及びプロセッサ間で物理的及び機能的に分散させることもできる。

【0138】

前述のように、SSOには1つ以上のミスマッチが含まれる場合がある。このようなミスマッチを導入する利点は、対立遺伝子特異的標的化が可能になることである。これは、遺伝子の1つの対立遺伝子のみを標的にしたい場合に関係する可能性がある。

【0139】

列挙される遺伝子の遺伝子（pre-mRNA）を標的とする特定のSSOは、表4、5、及び8に列挙される。したがって、一実施形態では、SSOは表4、5、及び8に列挙されているSSOから選択される。

【0140】

使用のための組成物

本発明の方法によって特定されたSSOは、異なる疾患の治療のための医薬品として使用することができる。したがって、本発明の別の態様は、標的pre-mRNA（例えば、機能障害を引き起こす、又は障害に影響を与えるタンパク質をコードする）と相補的又は実質的に相補的なスプライススイッチングオリゴヌクレオチド（SSO）を含む組成物に関し、この標的pre-mRNA（2）は機能無効化偽エクソンを含み、

- ー 機能無効化偽エクソンは、
 - 5'末端に3'スプライス部位、及び
 - 3'末端に5'スプライス部位、
- を含み、

このSSOは、偽エクソンの5'スプライス部位に対して下流の領域+9～+39において標的pre-mRNAと相補的又は実質的に相補的であり、

このSSOが、生体内で、偽エクソンの5'スプライス部位に対して下流の領域+9～+39内のpre-mRNAにハイブリダイズすると、偽エクソンは、SSOと接触していない対応するpre-mRNAに比べて、より大きな程度で成熟mRNAの部分となり、医薬品として使用される。

【0141】

したがって、SSOは、偽エクソンの成熟mRNAへの組み込みを促進することによって、標的タンパク質の発現を調節する。

SSOによって誘導される調節は、異なる方法で標的タンパク質に影響を及ぼす可能性がある。したがって、一実施形態では、SSOのpre-mRNAへのハイブリダイゼーシ

10

20

30

40

50

ヨンによって、

- － 機能タンパク質をコードする mRNA のレベルが低下し、及び／又は
- － 機能タンパク質の発現が減少し、及び／又は
- － 機能タンパク質の機能が喪失し、及び／又は
- － 機能タンパク質に新しい機能が生じ、及び／又は
- － タンパク質の誤った局在化が生じ、及び／又は
- － 機能タンパク質をコードする mRNA の誤った局在化が生じる。

【0142】

一実施形態では、組成物は、障害を引き起こす、又は障害に影響を与える機能タンパク質の発現の増加又は機能の改変を特徴とする疾患又は状態を有する、又は機能遺伝子産物の発現の減少が治療上有益であるヒト対象の治療に使用される。

10

【0143】

一実施形態では、SSOは、本発明に記載のパラメータによって特徴付けられる pre-mRNA 内のポリヌクレオチドに相補的又は実質的に相補的な配列を含む。

【0144】

一実施形態では、pre-mRNA 中のポリヌクレオチドに実質的に相補的な配列を含む SSO は、最大3つのミスマッチ、例えば最大2つのミスマッチ、又は最大1つのミスマッチを含む。

【0145】

一実施形態では、このSSOは、定義された基準に従って pre-mRNA 内のポリヌクレオチドに相補的な配列を含む。

20

【0146】

一実施形態では、この偽エクソンの5' スプライス部位に対する+9～+39の領域は、スプライシング制御部位を含む。

【0147】

更に別の実施形態では、スプライシング制御部位はイントロンスプライシングサイレンサー (ISS) 部位である。

【0148】

一実施形態では、このSSOは、9～100ヌクレオチドの範囲、例えば9～50ヌクレオチド、好ましくは9～40ヌクレオチドの範囲、より好ましくは9～31ヌクレオチド又は9～25ヌクレオチドの範囲の長さを有する。

30

【0149】

一実施形態では、このSSOは、上記で定義した pre-mRNA 中のポリヌクレオチドに相補的又は実質的に相補的な配列を含み、この配列は、9～31ヌクレオチド、例えば9～20ヌクレオチドの範囲の長さを有し、好ましくは、この配列は、9～31ヌクレオチド、例えば9～20ヌクレオチド、又は例えば20～31ヌクレオチド、例えば25～31ヌクレオチドの範囲で相補的である。

【0150】

一実施形態では、このSSOは、糖修飾ヌクレオチドなどの1つ以上の人工ヌクレオチドを含む。

40

【0151】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、mRNA の RNase H 媒介分解を媒介しない。

【0152】

一実施形態では、少なくとも1つの修飾糖部分は2'-置換糖部分である。

【0153】

一実施形態では、上述の2'-置換糖部分は、2'-O-メチル(2'-OMe)、2'-フルオロ(2'-F)、及び2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)からなる群から選択される2'-置換を有する。

【0154】

50

一実施形態では、少なくとも1つの上述の2'-置換糖部分の2'-置換は、2'-O-メトキシエチル(2'-MOE)である。

【0155】

一実施形態では、少なくとも1つの修飾糖部分は二環式糖部分である。

【0156】

一実施形態では、少なくとも1つの二環式糖部分は、ロックド核酸(LNA)又は拘束エチル(cEt)ヌクレオシドである。

【0157】

一実施形態では、少なくとも1つの糖部分は糖代替物である。

【0158】

一実施形態では、上述の少なくとも1つの糖代替物はモルホリノである。

【0159】

一実施形態では、上述の少なくとも1つのモルホリノは修飾モルホリノである。

【0160】

一実施形態では、SSOは少なくとも1つのヌクレオシド間N3'~P5'へのホスホラミデートジエステル結合を含む。

【0161】

一実施形態では、修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのヌクレオシド間ホスホロチオエート結合を含む。

【0162】

一実施形態では、すべてのヌクレオシド間結合はホスホロチオエートである。

【0163】

実施例のセクションでは、試験したSSOは、各糖部分に2'-O-メチル修飾を有する25nt長のホスホロチオエートRNAオリゴヌクレオチドであった。

【0164】

一実施形態では、SSOは、Gal-Nac、(ポリ)不飽和脂肪酸(オレオイル、リノレノイルなど)、アニサミド、アナンダミド、葉酸(FoLA)、カルバコール、エストロン、Retro-1、リン脂質、 α -トコフェロール(α -TP)、コレステロール、スクアレン(SQ)、非分岐脂肪酸(ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル及びドコサノイルなど)、及び細胞浸透ペプチドからなる群から選択される送達要素に結合される。

【0165】

組成物は特定の疾患の治療に使用することができる。したがって、一実施形態では、癌、炎症性疾患、神経変性疾患又は神経疾患、代謝性疾患、慢性肝疾患、及び遺伝性網膜ジストロフィー(IRD)からなる群から選択される疾患の治療又は緩和に使用するための組成物である。

【0166】

一実施形態では、疾患は癌であり、遺伝子配列は、ROCK1、TXNRD1、SLC7A11、STAT5B、MAPKAPK5、ZYG11A、MCCC2、SMYD2、DIAPH3、COPS3、SNX5、YBX1、CHD1L、PTPN11、UBAP2L、RNF115、HGS、TLK1、WWTR1、HMGCS1、SND1、THOC2、E2F3、LRIG2、HSPG2、SLC2A1、KNTC1、FDFT1、SMC1A、HIF1A、CSPP1、TRPM7、DDR2、STAG2、ORC1、TAF2、LRP6、MELK、TTBK2、TTK、ITGBL1、ROCK2、TASP1、FLT1、ZNF558、PMPCB、DBI、RAP1GDS、BUD1、CD44、CDKL5、ZNF558、RBPJ、EFEMP1及びFLT1からなる群から選択され、

又は

疾患は炎症性疾患であり、遺伝子配列はDDR2、TRPM7、SMAD2、及びLRP6からなる群から選択され、

10

20

30

40

50

又は

疾患は神経変性疾患又は神経疾患であり、遺伝子配列は、ROCK1、OGA、TMEM97、PICALM、E2F3、SLC2A13、ASIC1、TRPM7、LRIG2、LRRK2、UBAP2L、SMC1A、TTBK2、ATXN7、CLCN1からなる群から選択され、

又は

－ 疾患は慢性肝疾患であり、遺伝子配列はSMAD2及びTRPM7、DDR2、HIF1A、及びROCK1、RAP1GDS1からなる群から選択され、

又は

－ 疾患は糖尿病であり、遺伝子配列はTXNRD1、DYRK1A、TRPM7及びPHLPP1からなる群から選択される。

10

【0167】

いくつかのSSOのSweet Spot標的配列は、実施例のセクション（表1及び表3及び表6及び表7）で提供される。したがって、一実施形態では、上述の使用のための組成物は、以下からなる群から選択される核酸内の領域に相補的又は実質的に相補的なSSOを含む、

○ 配列番号106、1～26、79～105、107～125、及び137～201のいずれかに記載の核酸、又は

○ 配列番号106、1～26、79～105、107～125、137～201のいずれかと比較して、1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は

20

○ 配列番号106、1～26、79～105、107～125、137～201のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列。

【0168】

好ましい実施形態では、上述の使用のための組成物は、以下からなる群から選択される核酸内の領域に相補的又は実質的に相補的なSSOを含む、

－ 配列番号79～100のいずれかの核酸、又は

－ 配列番号79～100のいずれかと比較した場合に1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は

－ 配列番号79～100のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列。

【0169】

30

より好ましい実施形態では、上述の使用のための組成物は、以下からなる群から選択される核酸内の領域に相補的又は実質的に相補的なSSOを含む、

－ 配列番号79～85のいずれかに記載の核酸、又は

－ 配列番号79～85のいずれかと比較した場合に1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は

－ 配列番号79～85のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列。

【0170】

一実施形態では、SSOは以下からなる群から選択される、

－ 配列番号127～136のいずれかに記載の核酸、又は

－ 配列番号127～136のいずれかと比較した場合に1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は

40

－ 配列番号127～136のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列。

【0171】

更にもうひとつ別の好ましい実施形態では、SSOは、以下からなる群から選択される核酸内の領域と相補的又は実質的に相補的である、

○ 配列番号100、114、118、150及び151のいずれかに記載の核酸

○ 配列番号100、114、118、150、151のいずれかと比較した場合に1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は

○ 配列番号100、114、118、150及び151のいずれかと少なくとも90%

50

の配列同一性を有する核酸配列。

【0172】

更にもうひとつの別の好ましい実施形態では、SSOは、以下からなる群から選択される核酸内の領域と相補的又は実質的に相補的である、

- 配列番号12、24若しくは26のいずれかに記載の核酸、
- 配列番号12、24若しくは26のいずれかと比較した場合に1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は
- 配列番号12、24若しくは26のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列。

【0173】

好ましくは、SSOは配列番号128又は136である。実施例9及び10に示すように、これらのSSOはSweet Spot領域内で最適化されている。したがって、結合領域を例えば1つ又は2つの位置だけ移動させることによって、効率は驚くほど更に向上し得る。

【0174】

その他の使用のための組成物

更に別の態様において、本発明は、医薬品として使用するための組成物に関し、この組成物は、

- ー 以下からなる群から選択される核酸内の領域に相補的又は実質的に相補的なSSOを含み、
 - 配列番号79、若しくは1～26若しくは80～125のいずれかに記載の核酸、又は
 - 配列番号79、若しくは1～26若しくは80～125のいずれかと比較した場合に1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は
 - 配列番号79、若しくは1～26又は80～125のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列、
- 又は

- ー 以下からなる群から選択されるSSO、
- 配列番号127～136のいずれかに記載の核酸、又は
- 配列番号127～136のいずれかと比較した場合に1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は
- 配列番号127～136のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列。

【0175】

好ましくは、SSOは配列番号128又は136である。実施例9及び10に示すように、これらのSSOはSweet Spot領域内で最適化されている。したがって、結合領域を例えば1つ又は2つの位置だけ移動させることによって、効率は驚くほど更に向上し得る。

【0176】

実施例9及び10に示すように、TRPM7及びHIF1Aを標的とするSSOはSweet Spot領域内で最適化されている。

【0177】

同様に、SMAD2及びLRRK2の最適化データは、それぞれ実施例3及び13に示される。

【0178】

したがって、結合領域を1つ又は数個の位置だけ移動させることによって、驚くほど効率が更に向上する。

【0179】

上記及び実施例のセクションでも説明するように、異なる遺伝子は、本発明に記載の選択基準を使用してすでに標的化されている（表1及び表6）、又は本発明に記載の選択基準を使用して標的配列として特定されている（表3及び表7）。したがって、一実施形態

10

20

30

40

50

では、SSOは、表1、表3、表6、及び表7（Sweet Spot領域）に概説される配列に対する核酸内の領域に相補的又は実質的に相補的である。

【0180】

一実施形態では、SSOは、表1及び表3に概説される配列番号と相補的又は実質的に相補的であり、遺伝子は、TXNRD1、SLC7A11、STAT5B、MAPKAPK5、ZYG11A、ROCK1、MCCC2、SMYD2、DIAPH3、COPS3、SNX5、YBX1、CHD1L、PTPN11、UBAP2L、RNF115、HGS、TLK1、WWTR1、HMGCS1、SND1、HIF1A、CSPP1、TAF2、ORC1、THOC2、LRP6、MELK、TTBK2、TTK、ITGBL1、ROCK2、TASP1、FLT1、KNTC1、SMC1A、ZNF558、PMPCB、及びDBIからなる群から選択され、癌の治療に使用される。

10

【0181】

別の実施形態では、SSOは、表1及び表3、表6及び表7に概説される配列と相補的又は実質的に相補的であり、遺伝子は、ROCK1、E2F3、LRIG2、HSPG2、SLC2A1、KNTC1、DIAPH3、FDF1、THOC2、SMC1A、DDR2、LINGO2、TRPM7、STAG2、RAP1GDS、BUD1、CD44、CDKL5、RNF115、UBAP2L、ZNF558、RBPJ、EFEMP1、FLT1 からなる群から選択され、癌の治療に使用される。

【0182】

更に別の実施形態では、SSOは、表1及び表3及び表6及び表7に概説される配列番号と相補的又は実質的に相補的であり、遺伝子は、ROCK1、OGA、TMEM97、PICALM、LRRK2、UBAP2L、SMC1A及びTTBK2からなる群から選択され、神経疾患の治療に使用される。

20

【0183】

更により好ましい実施形態では、神経疾患は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、及び脊髄性筋萎縮症からなる群から選択される。

【0184】

神経変性とは、ニューロンの死を含む、ニューロンの構造又は機能の進行性の喪失である。筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病及びプリオン病を含む多くの神経変性疾患は、神経変性の過程の結果として発症する。

30

【0185】

一実施形態では、SSOは、表1及び表3及び表6及び表7に概説される配列番号と相補的又は実質的に相補的であり、ROCK1、E2F3、SLC2A13、LINGO2、TRPM7、ASIC1、LRIG2、LRRK2、UBAP2L、SMC1A、ATXN7及びCLCN1からなる群から選択され、神経疾患の治療に使用される。

【0186】

また、更に好ましい実施形態では、神経疾患は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、フリードライヒ運動失調症、ハンチントン病、レビー小体病、パーキンソン病、及び脊髄性筋萎縮症からなる群から選択される。

40

【0187】

一実施形態では、SSOは、表1及び表3及び表6及び表7に概説される配列番号と相補的又は実質的に相補的であり、遺伝子は、TXNRD1、DYRK1A、TRPM7及びPHLP1からなる群から選択され、糖尿病の治療に使用される。好ましい実施形態では、糖尿病は1型糖尿病及び2型糖尿病から選択される。

【0188】

別の実施形態では、SSOは、表1及び表3及び表6及び表7に概説される配列番号と相補的又は実質的に相補的であり、遺伝子はLINGO2、SMAD2、ORC1、DDR2、STAG2、TRPM7、HIF1A、HTT、TAF2、CSPP1、RN115、LRRK2、UBAB2L、LRP6、MELK及びKNTC1からなる群から選択

50

される。これら 16 個の遺伝子はすべて、すべての基準に一致する偽エクソンを含み、いずれも Sweet Spot 領域内に位置する SSO によって活性化され（表 1、表 3、表 6～7 を参照のこ）、高い治療能を有する。

【0189】

組成物

更に別の態様では、本発明は、

— 以下からなる群から選択される核酸内の領域に相補的又は実質的に相補的な SSO を含む組成物に関し、

○ 配列番号 106、1～26、79～105、107～125、及び 137～201 のいずれかに記載の核酸、又は

○ 配列番号 106、1～26、79～105、107～125 及び 137～201 のいずれかと比較した場合に 1 若しくは 2 若しくは 3 個の置換を含む核酸、又は

○ 配列番号 106、1～26、79～105、107～125 及び 137～201 のいずれかと少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸配列、

又は

— 以下からなる群から選択される SSO を含む組成物に関する、

— 配列番号 127～136 及び配列番号 202～216 のいずれかに記載の核酸、又は

— 配列番号 127～136 及び配列番号：202～216 のいずれかと比較した場合に 1 若しくは 2 若しくは 3 個の置換を含む核酸、又は

— 配列番号 127～136 及び配列番号 202～216 のいずれかと少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸配列。

【0190】

一態様では、SSO は、表 4（実施例 9 を参照のこと）、表 5（実施例 10 を参照のこと）、及び表 8（実施例 11 を参照のこと）に列挙された SSO の群から選択される。

【0191】

この組成物は、例えば、上記に概説した一連の疾患の治療のための、上記に概説した医薬品として使用することができる。

【0192】

もうひとつ別の態様では、本発明は、スプライススイッチングオリゴヌクレオチド（SSO）を含む組成物に関し、この組成物は、

— 以下からなる群から選択される核酸内の領域と相補的又は実質的に相補的な SSO を含む、

○ 配列番号 217～294 のいずれかに記載の核酸、

○ 配列番号 217～294 のいずれかと比較した場合に 1 若しくは 2 若しくは 3 個の置換を含む核酸、又は

○ 配列番号 217～294 のいずれかと少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸配列、

又は

— 以下からなる群から選択される SSO、

○ 配列番号 295～367 のいずれかの核酸、又は

○ 配列番号 295～367 のいずれかと比較した場合に 1 若しくは 2 若しくは 3 個の置換を含む核酸、又は

○ 配列番号 295～367 のいずれかと少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸配列。

【0193】

対立遺伝子特異的標的化—Sweet Spot 領域の SNP

本発明に記載の方法を使用することにより、発明チームは、LRRK2 pre-mRNA の Sweet Spot 領域内の SNP を特定した（実施例 13 も参照のこと）。

【0194】

SSO を慎重に設計することにより、このような対立遺伝子特異的 SSO は、疾患を引

10

20

30

40

50

き起こす *pre-mRNA*（疾患原因対立遺伝子からのもの）を優先的に標的とするのに使用できると考えられるが、一方で、「正常に機能する」対立遺伝子からの *pre-mRNA* は影響を受けない（又は影響が少ない）。

【0195】

このような方法を使用することにより、正常な *RNA* の量を維持し、正常な遺伝子機能を維持することが可能となる。

【0196】

実施例13に見られるように配列番号141及び142は、1つの *SNP* 特異的対立遺伝子を標的にし、配列番号158及び159はもうひとつ別の *SNP* 特異的対立遺伝子を標的にする。

【0197】

したがって、一実施形態では、本発明に記載の組成物は、*SSO* によって標的とされる *pre-mRNA* 領域においてヘテロ接合性である対象に投与され、その結果、*SSO* は、対立遺伝子の1つの *pre-mRNA* に対する結合親和性が増加し、例えば、上述の対立遺伝子におけるスプライススイッチング活性が増加する。

【0198】

別の実施形態では、*pre-mRNA* は *LRRK2* をコードする。

【0199】

更に別の実施形態では、*pre-mRNA* は *LRRK2* をコードし、対象は *rs17444202* の位置でヘテロ接合性である。

【0200】

更にもうひとつ別の実施形態では、*pre-mRNA* は *LRRK2* をコードし、対象は *LRRK2* に変異を引き起こす疾患に関してヘテロ接合性である。

【0201】

更に別の実施形態では、*SSO* は、以下からなる群から選択される核酸内の領域と相補的又は実質的に相補的であり、

- 配列番号141、142、158及び159のいずれかに記載の核酸、又は
 - 配列番号141、142、158及び159のいずれかと比較した場合に1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は
 - 配列番号141、142、158及び159のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列、
- 又は

— *SSO* は以下からなる群から選択される、

- 配列番号208～216のいずれかに記載の核酸、又は
- 配列番号208～216のいずれかと比較した場合に1若しくは2若しくは3個の置換を含む核酸、又は
- 配列番号208～216のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列。

【0202】

一実施形態では、*SSO* は、他の対立遺伝子に比べて、より大きな程度で、疾患原因対立遺伝子への偽エクソンの包含を促進する。又は、これにより、正常な *mRNA* がより高い程度で存在する可能性がある。したがって、*SSO* は疾患原因対立遺伝子の *pre-mRNA* に対する結合親和性が増加する。

【0203】

本発明の更なる一態様は、機能不全の *LRRK2* 対立遺伝子の対立遺伝子特異的標的に適格の可能性がある対象を特定する方法に関し、この方法は、

- この対象からの *DNA* サンプルにおいて *LRRK2* の対立遺伝子状態を決定すること、を含み、

対象が *rs17444202* についてヘテロ接合性である場合、この対象は本発明による対立遺伝子特異的治療に適格であり、又は

10

20

30

40

50

対象が rs17444202 についてヘテロ接合性でない場合、この対象は本発明に記載の対立遺伝子特異的治療に適格ではない。

【0204】

以下で更に概説するように、対象は SNP に関してホモ接合性である可能性もあり、その場合、両方の対立遺伝子に SNP が含まれ、偽エクソンの包含が促進される可能性がある。これは好ましくないかもしれないが、治療を行わないという選択肢がある場合は、より良い選択肢となる可能性がある。

【0205】

対立遺伝子の状態は、サンガー法又は次世代シーケンシング (NGS)、あるいは ARMS や Taq-man などの変異特異的アッセイによって決定できる。

【0206】

対立遺伝子特異的標的化ースプライス部位の SNP

発明チームは、偽エクソンのスプライス部位に存在する広範囲な SNP を特定した。SNP が対立遺伝子の一方又は両方に存在する場合、そのような SNP を保持する対象は、(対象が疾患を引き起こす遺伝子を有する対立遺伝子にのみ SNP を含む場合)、又は対象が SNP に対してホモ接合性であり、したがって両方の対立遺伝子に SNP を保持する場合、対立遺伝子特異的 SSO 治療に適格の可能性はある。言い換えれば、発明チームは、スプライス部位の MaxEnt スコアを増加させる SNP を特定し、これにより、この偽エクソンを標的とする対応する SSO で処理すると、偽エクソンの包含が可能になる (又は改善される)。実施例 15 ~ 16 も参照されたい。

したがって、本発明の一態様は、医薬品として使用するためのスプライススイッチングオリゴヌクレオチド (SSO) を含む組成物に関し、この組成物は、

— 以下からなる群から選択される核酸内の領域と相補的又は実質的に相補的な SSO を含み、

o 配列番号 217 ~ 294 のいずれかに記載の核酸、

o 配列番号 217 ~ 294 のいずれかと比較した場合に 1 若しくは 2 若しくは 3 個の置換を含む核酸、又は

o 配列番号 217 ~ 294 のいずれかと少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列、

又は

— 以下からなる群から選択される SSO、

o 配列番号 295 ~ 367 のいずれかの核酸、又は

o 配列番号 295 ~ 367 のいずれかと比較した場合に 1 若しくは 2 若しくは 3 個の置換を含む核酸、又は

o 配列番号 295 ~ 367 のいずれかと少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸配列、

この SSO は標的 pre-mRNA に相補的又は実質的に相補的であり、この標的 pre-mRNA は機能無効化偽エクソンを含み、

— 機能無効化偽エクソンは、

o 5' 末端に 3' スプライス部位、及び

o 3' 末端に 5' スプライス部位

を含み、

この SSO は、上述の偽エクソンの 5' スプライス部位に対して下流の領域 +9 ~ +39 において標的 pre-mRNA と相補的又は実質的に相補的である。

【0207】

実施例 16 に示すように、SSO ベース偽エクソン包含治療を可能にする広い範囲の SNP が特定されている。

【0208】

一実施形態では、SSO は、以下からなる群から選択される核酸内の領域と相補的又は実質的に相補的である、

- 配列番号 217 のいずれかに記載の核酸、
- 配列番号 217 のいずれかと比較した場合に 1 若しくは 2 若しくは 3 個の置換を含む核酸、又は
- 配列番号 217 のいずれかと少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸配列。

【0209】

実施例 15 は、特定の SNP が存在する場合、配列番号 217 を標的とする SSO が、偽エクソンを成熟 mRNA に直接包含することができる。

【0210】

一実施形態では、組成物は、障害を引き起こす、又は障害に影響を与える機能タンパク質の発現の増加又は機能の改変を特徴とする疾患又は状態を有する、又は機能遺伝子産物の発現の減少が治療上有益であるヒト対象の治療に使用される。

【0211】

別の実施形態では、上述の SSO は、pre-mRNA 中のポリヌクレオチドに実質的に相補的な配列を含み、最大 3 つのミスマッチ、例えば最大 2 つのミスマッチ、又は例えば最大 1 つのミスマッチを含む。

【0212】

更なる実施形態では、上述の SSO は、9~100 ヌクレオチドの範囲、例えば 9~50 ヌクレオチド、好ましくは 9~40 ヌクレオチドの範囲、より好ましくは 9~31 ヌクレオチド又は 9~25 ヌクレオチドの範囲の長さを有する。

【0213】

更に別の実施形態では、上述の SSO は、上記で定義した pre-mRNA 内のポリヌクレオチドに相補的又は実質的に相補的な配列を含み、この配列の長さは 9~31 ヌクレオチド、例えば 9~20 ヌクレオチドであり、好ましくは、配列は 9~31 ヌクレオチド、例えば 9~20 ヌクレオチド、又は 20~31 ヌクレオチド、例えば 25~31 ヌクレオチドの範囲で相補的である。

【0214】

一実施形態では、上述の SSO は、糖修飾ヌクレオチドなどの 1 つ以上の人工ヌクレオチドを含む。

【0215】

一実施形態では、オリゴヌクレオチドは、mRNA の RNase H 媒介分解を媒介しない。

【0216】

一実施形態では、少なくとも 1 つの修飾糖部分は 2' -置換糖部分である。

【0217】

一実施形態では、上述の 2' -置換糖部分は、2' -O-メチル (2' -OMe)、2' -フルオロ (2' -F)、及び 2' -O-メトキシエチル (2' -MOE) からなる群から選択される 2' -置換を有する。

【0218】

一実施形態では、組成物は、癌、炎症性疾患、神経変性疾患又は神経疾患、代謝性疾患、慢性肝疾患、及び遺伝性網膜ジストロフィー (IRD) からなる群から選択される疾患の治療又は緩和に使用される。

【0219】

実施例 15 に示されているように、SNP の存在により、SSO は、他の対立遺伝子と比較して、疾患原因対立遺伝子に、機能無効化偽エクソンの包含をより大きな程度で促進することができる。したがって、一実施形態では、組成物は、SSO によって標的とされる pre-mRNA 内の配列変異 (SNP) についてヘテロ接合性である対象に投与され、それによって、SSO は、他の対立遺伝子と比較して、疾患原因対立遺伝子に機能無効化偽エクソンの包含をより大きな程度で促進する。

【0220】

対象はホモ接合性の可能性もある。このような場合、「健康な遺伝子」と疾患の遺伝子

10

20

30

40

50

の両方が偽エクソンの包含の対象になる。もちろん、対象は2つの疾患遺伝子（各対立遺伝子に1つずつ）を保持する可能性もある。したがって、一実施形態では、組成物は、SSOによって標的とされるpre-mRNA内のSNP変異（SNP）についてホモ接合である対象に投与される。

【0221】

一実施形態では、対象は、機能無効化偽エクソンの5'スプライス部位及び／又は3'スプライス部位、好ましくは5'スプライス部位における配列変異（SNP）についてヘテロ接合性である。

【0222】

一実施形態では、SNPは、点変異、例えばSNP位置における1～20ヌクレオチドの挿入、又は例えば、SNP位置における1～20ヌクレオチドの欠失である。

【0223】

一実施形態では、挿入は1～10ヌクレオチド、例えば1～5ヌクレオチド、例えば2～4ヌクレオチド又は2～3ヌクレオチドである。別の実施形態では、欠失は1～10ヌクレオチド、例えば1～5ヌクレオチド、例えば2～4ヌクレオチド又は2～3ヌクレオチドである。

【0224】

別の実施形態では、SNPは、(23mer) 3'スプライス部位（イントロン-エクソン境界の-20～+3nt）又は(9mer) 5'スプライス部位（エクソン-イントロン境界の-3～+6nt）に位置する。

【0225】

更に別の実施形態では、疾患原因遺伝子のヘテロ接合性により、SSOと接触した場合、一方の対立遺伝子から成熟mRNAへの偽エクソンの包含が、他の対立遺伝子上の対応する（正常に機能する）遺伝子よりも、より大きな程度で増加する。

【0226】

もうひとつ別の実施形態では、疾患原因遺伝子のヘテロ接合性により、疾患原因遺伝子の偽エクソンのスプライス部位のMaxEntスコアが、他の対立遺伝子上の対応する（正常に機能する）遺伝子と比較して増加する。上で概説したように、MaxEntスコアは特定のアルゴリズムによって計算される定義された数である。

【0227】

関連する実施形態では、疾患原因遺伝子のヘテロ接合性により、疾患原因遺伝子の偽エクソンのスプライス部位のMaxEntスコアが、他の対立遺伝子上の対応する（正常に機能する）遺伝子と比較してより高くなる。

【0228】

更に別の実施形態では、疾患原因遺伝子の対立遺伝子内の偽エクソンのスプライス部位は、他の対立遺伝子上の（正常に機能する）遺伝子の対応するスプライス部位と比較して、より高いMaxEntスコアを有する。

【0229】

SNPをIDで一意に識別するデータベースが存在する。したがって、一実施形態では、対象は、表9に記載のSNP IDの群から選択された疾患原因対立遺伝子にSNPを有する。また、SNPは両方の対立遺伝子に存在する可能性もある。したがって、一実施形態では、対象は、表9に記載のSNP IDの群から選択された両方の対立遺伝子上にSNPを保持する。

【0230】

より特定の実施形態では、対象は、表9に記載のSNPの群から選択される疾患原因対立遺伝子内にSNPを保持し、SSOは表9に記載の対応するSweet Spot Seqを標的にする。

【0231】

一実施形態では、対応するSSOは表10から選択される。

【0232】

10

20

30

40

50

一実施形態では、pre-mRNAはLRRK2をコードする。実施例15と16も参照されたい。

【0233】

更に別の実施形態では、pre-mRNAはLRRK2をコードし、対象は、疾患を引き起こすLRRK2対立遺伝子においてSNP rs10878372の高MaxEntスコア「G対立遺伝子」を有する。

【0234】

一実施形態では、pre-mRNAはLRRK2をコードし、対象はLRRK2の疾患を引き起こす変異に関してヘテロ接合性である。

【0235】

標的とされる偽エクソンは、X染色体又はY染色体上に配置される遺伝子に位置する可能性があり、その場合、男性対象は単一のX染色体とY染色体しか含まないため、ヘテロ接合性又はホモ接合性のいずれかであるとは見みなすことができないことは理解される。しかしながら、そのような対象も本発明に従って治療することができる。

【0236】

本出願全体にわたって概説されているように、本発明は、医薬組成物などの、本発明に記載のSSOを含む組成物にも関する。

【0237】

対立遺伝子特異的SSOベース偽エクソン包含治療に適格な対象を特定する方法

本発明は、また、対立遺伝子特異的SSOベース偽エクソン包含治療に適格である対象を特定するために使用することができる。したがって、本発明の一態様は、機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子の対立遺伝子特異的SSOベース偽エクソン包含治療に適格の可能性のある対象を特定する方法に関し、方法は、

一 この対象からの生体試料において、機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子の偽エクソンにおけるヘテロ接合性の有無を決定することを含み、対象が、機能無効化偽エクソンの5'スプライス部位及び／又は3'スプライス部位、好ましくは5'スプライス部位における配列変異(SNP)についてヘテロ接合性である場合、この対象は、対立遺伝子特異的SSOベース偽エクソン包含治療に適格の可能性があり、又は

対象が機能無効化偽エクソンの5'スプライス部位及び／又は3'スプライス部位の配列変異(SNP)についてヘテロ接合性でない場合、この対象は、対立遺伝子特異的SSOベース偽エクソン包含治療に適格でない可能性があり、

上述のSSOは、機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子の標的pre-mRNAと相補的又は実質的に相補的であり、この標的pre-mRNAは機能無効化偽エクソンを含み、

一 機能無効化偽エクソンは、

- o 5'末端に3'スプライス部位、及び
- o 3'末端に5'スプライス部位を含む。

【0238】

実施例15及び16で概説されているように、特定のケースでは、例えば表9に従って、対象がSNPを保持している場合にのみSSOが機能する。

【0239】

一実施形態では、上述の対立遺伝子特異的SSOベース偽エクソン包含処理の結果、上述のSSOは、生体内でpre-mRNAにハイブリダイズし、機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子のこの偽エクソンは、SSOと接触していない対応するpre-mRNAと比較して、より大きな程度で成熟mRNAの一部となる。

【0240】

別の実施形態では、上述の対立遺伝子特異的SSOベース偽エクソン包含処理の結果、前記SSOは、生体内でpre-mRNAにハイブリダイズし、この偽エクソンは、SSOと接触していない対応するpre-mRNAと比較して、機能不全遺伝子又は疾患原因

10

20

30

40

50

遺伝子を有する対立遺伝子において、より大きな程度で成熟 mRNA の一部となる。

【0241】

更に別の実施形態では、SSOによって標的とされる pre-mRNA における偽エクソンの 5' スプライス部位及び／又は 3' スプライス部位における配列変異 (SNP) のヘテロ接合性は、SSOと接触した場合、他の対立遺伝子と比較して、疾患原因対立遺伝子に対してより大きな程度で機能無効化偽エクソンが含まれることを促進する。

【0242】

一実施形態では、配列変異 (SNP) のヘテロ接合性は、機能無効化偽エクソンの 5' スプライス部位及び／又は 3' スプライス部位、好ましくは 5' スプライス部位にある。

【0243】

一実施形態では、疾患原因遺伝子の配列変異 (SNP) のヘテロ接合性は、点変異 (SNP)、1～20ヌクレオチドの挿入、又は1～20ヌクレオチドの欠失であり、好ましくは点変異である。

【0244】

一実施形態では、疾患原因遺伝子は、SSOと接触した場合、他の対立遺伝子上の対応する (正常に機能する) 遺伝子よりも、偽エクソンの包含を大幅に増加させる。

【0245】

一実施形態では、疾患原因遺伝子の配列変異 (SNP) のヘテロ接合性により、他の対立遺伝子上の (正常に機能する) 遺伝子の対応するスプライス部位と比較して、スプライス部位の Max Ent スコアが増加する。

【0246】

一実施形態では、疾患原因遺伝子の配列変異 (SNP) のヘテロ接合性により、他の対立遺伝子上の (正常に機能する) 遺伝子の対応するスプライス部位と比較して、スプライス部位の Max Ent スコアがより高くなる。

【0247】

一実施形態では、疾患原因遺伝子の配列変異 (SNP) のヘテロ接合性は、疾患原因遺伝子の偽エクソンのスプライス部位にあり、その結果、他の対立遺伝子上の (正常に機能する) 遺伝子の対応するスプライス部位と比較して、Max Ent スコアがより高くなる。

【0248】

一実施形態では、上述のSSOが生体内で pre-mRNA にハイブリダイズする場合、対立遺伝子特異的SSOベース偽エクソン包含治療には、生体内で、疾患原因対立遺伝子を保持しない対立遺伝子と比較して、疾患原因対立遺伝子をより大きな程度で保持する対立遺伝子の pre-mRNA にハイブリダイズするSSOを使用する治療が含まれる。

【0249】

一実施形態では、上述のSSOは、上述の偽エクソンの 5' スプライス部位に対して下流の領域 +9～+39において、標的 pre-mRNA に相補的又は実質的に相補的である。

【0250】

一実施形態では、上述のSSOの標的配列は、LRRK2、LMN1B、及びATXN2からなる群から選択される遺伝子に位置する。

【0251】

一実施形態では、対象は、表9に記載のSNP IDの群から選択される疾患原因対立遺伝子にSNPを保持する。

【0252】

一実施形態では、対象は、表9に記載のSNP IDの群から選択される両方の対立遺伝子にSNPを保持する。

【0253】

一実施形態では、対立遺伝子の状態は、サンガー配列決定、次世代配列決定 (NGS) などからなる群から選択される方法、及びARMSやTaq-manなどの変異特異的ア

10

20

30

40

50

ッセイによって決定される。当業者は、対立遺伝子の状態を決定するのに適した他の方法を見つけることができる。

【0254】

上述したように、対象はSNPに関してホモ接合性又はヘテロ接合性であってもよい（又は、SNPはX染色体若しくはY染色体に関連付けられていてもよい）。したがって、本発明の更に別の態様は、機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子のSSOベース偽エクソン包含治療に適格の可能性がある対象を特定する方法に関し、この方法は、

－ この対象からの生体試料において、機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子の偽エクソンにおける、SSOベース偽エクソン包含治療を可能にするSNPの有無を決定することを含み、

対象が、機能無効化偽エクソンの5'スプライス部位及び／又は3'スプライス部位、好ましくは5'スプライス部位に配列変異（SNP）を有する場合、この対象は、SSOベース偽エクソン包含治療に適格の可能性がある、又は

対象が機能無効化偽エクソンの5'スプライス部位及び／又は3'スプライス部位に配列変異（SNP）を有さない場合、この対象はSSOベース偽エクソン包含治療に適格でない可能性がある、

上述のSSOは、機能不全遺伝子又は疾患原因遺伝子の標的pre-mRNAと相補的又は実質的に相補的であり、この標的pre-mRNAは機能無効化偽エクソンを含み、

－ 機能無効化偽エクソンは、

o 5'末端に3'スプライス部位、及び

o 3'末端に5'スプライス部位

を含む。

【0255】

－実施形態では、対象は、SNPに関してヘテロ接合性である、又はSNPに関してホモ接合性のいずれかであり、又はSNPがX染色体又はY染色体に関連し、好ましくはヘテロ接合性である。

【0256】

コンピュータ実装

－態様では、本発明は、データ記憶手段が接続された少なくとも1台のコンピュータを含むコンピュータシステムが、本発明の1つ以上の態様に記載の方法を制御できるように適合されたコンピュータプログラム製品に関し、例えば、プログラムがコンピュータによって実行されると、コンピュータに本発明の方法のステップを実行させる命令を含むコンピュータプログラム製品である。

【0257】

本発明のこの態様は、本発明は、コンピュータシステムにダウンロード又はアップロードされたときに、コンピュータシステムが本発明の態様の装置／システムの操作を実行できるようにするコンピュータプログラム製品によって実現され得るという点で特に有利であるが、排他的ではない。このようなコンピュータプログラム製品は、任意の種類のコンピュータ読み取り可能な媒体で、又はネットワークを通じて提供することができる。

【0258】

本発明の個々の態様は、それぞれ他の態様及び実施形態のいずれかと組み合わせることができる。本発明のこれらの側面及び他の態様は、記載された実施形態を参照した以下の説明から明らかになる。

【0259】

本発明は特定の実施形態に関連して説明されているが、提示された例に何ら限定されるものと解釈されるべきではない。本発明の範囲は、添付の請求項に照らして解釈されるべきである。請求項の文脈において、「含む」又は「含む」という用語は、他の可能な要素又はステップを排除するものではない。また、「a」や「an」などの参照の記載は、複数形を排除するものと解釈されるべきではない。図に示された要素に関する請求項における参照符号の使用も、本発明の範囲を制限するものと解釈されてはならない。更に、異な

10

20

30

40

50

る請求項に記載された個々の特徴は、有利に組み合わせる可能性があり、これらの特徴が異なる請求項に記載されていることは、特徴の組み合わせが不可能で、有利ではないことを排除するものではない。

【0260】

本出願に引用されているすべての特許及び非特許文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0261】

本発明を以下の非限定的な実施例により更に詳しく説明する。

【実施例】

【0262】

実施例1－発明の概略説明

図及び対応する図の説明は、本発明の基本原理を概説している。偽エクソンは、3'及び5'スプライス部位に隣接するイントロン配列である。偽エクソンは、mRNA転写物に含まれる量が通常少ないため、また、mRNAを含む偽エクソンは、ナンセンス変異依存mRNA分解機構(NMD)によって分解されることが多いため、通常は認識されない。Sweet Spot領域は、本出願に記載の基準(例えば、実施例2を参照のこと)に従う偽エクソンの5'スプライス部位の下流の+9~+39ヌクレオチドの領域として定義される。基準を満たす偽エクソンのSweet Spot領域に相補的なSSOを使用することによって、mRNA転写物への偽エクソンの包含を活性化し、増加させることができる。mRNAへの偽エクソンの包含は、誤った局在化、不安定化及び分解、又はタンパク質機能の改変によって、mRNAレベル又はタンパク質レベルのいずれかで遺伝子発現を調節する。5'ss; 5'スプライス部位、3'ss; 3'スプライス部位、SSO; スプライスシフティングオリゴヌクレオチド。

【0263】

図2は、低レベルで内因性転写物に含まれる偽エクソンを経験的に検出するために、RNAシーケンシングデータを使用して生体内でスプライスされた二重接合を検出する方法を示す。

【0264】

ヒトゲノムにマッピングした後、読み取りデータはフィルターにかけられ、少なくとも2つのスプライシングジャンクションを含む断片のみが保持される。次に、断片全体のスプライシングジャンクションがエクソン構造に集められ、最大100bpの断片内の読み取りデータ間にマップされていないギャップができる。次に、既知のエクソンアノテーションを使用してエクソンを分類して、イントロン内に含まれる偽エクソンを特定する。Sweet Spot領域に結合するSSOによる活性化の候補となり得る偽エクソンは、本発明に記載の基準によって特定することができ、その後、機能遺伝子産物の発現のダウンレギュレーション又は改変が医学的に関連する遺伝子において、治療上非常に関連のある偽エクソンを特定することができる。その後、標準的な合成法を使用してSSOを生成できる。

【0265】

実施例2－SSOの選択パラメータの識別

研究の目的

疾患に関連する疾患の原因となるmRNA又はタンパク質を阻害する一環として、特定の遺伝子を直接標的とする。目的の標的遺伝子内の偽エクソンを活性化することにより、結果として生じるmRNA産物は、NMD経路を介して分解されるか、誤って局在化されるか、不安定化されるか、機能しない、若しくは不安定な、若しくは誤って局在化される、若しくは改変された機能を有するタンパク質に翻訳されるかのいずれかである。我々は、スプライススイッチングアンチセンスオリゴヌクレオチド(SSO)を使用して、標的遺伝子のmRNA転写物に偽エクソンを包含することを目的とした。この戦略は、一次RNA転写物内の標的配列に対する安定性と結合特異性を高めるように改変された配列特異的SSOを使用すると、オフターゲット効果のリスクが最小限に抑えられるため、複数の

タンパク質を標的とする既存の治療法よりも優れている。そこで我々は、偽エクソンドナ一部位（5' スプライス部位）の下流の+9～+39領域（Sweet Spot領域と呼ばれる）に結合するSSOを使用することによって、偽エクソンがmRNAにスプライスされるように、活性化できる偽エクソンを特定することと、これらの偽エクソンを非活性偽エクソンと区別する基準を確立することを目的とした。

【0266】

材料と方法

我々は、公開されているRNAシーケンシングデータ（Geuvadis、EMTAB-2836、EMTAB-513、GSE52946及びGSE124439）を使用し、アダプター汚染と低品質の塩基をbbdukでトリミングした後、STARでマッピングした。HeLa細胞を12ウェルプレートに播種し、Lipofectamine RNAiMAX（Invitrogen社）を使用して、完全なホスホリチオエート骨格を有する20又は40nMの2'-O-メチルSSOを60%のコンフルエンスでフォワードトランスフェクトした。非結合性ctrl SSO（5' GCUCAAUAUGCUACUGCCAUGCUUG3'）（配列番号126）を対照として使用した。48時間後、Trizol（Invitrogen社）とクロロホルムを使用してRNAを単離し、次にイソプロパノールで沈殿させた。相補DNA（cDNA）は、高容量のcDNAキット（Applied Biosystems社）を使用して500ngのRNAから合成された。プライマーは、目的の偽エクソンに隣接する隣り合うエクソンの少なくとも1つのエクソン間接合部をカバーするように設計された。PCRは、Tempase Hot Start DNAポリメラーゼ（アンプリコン）と反応あたり1μLのcDNAを使用して実行された。各プライマーは0.5pmol/μL使用した。PCR産物は2%のSeakem LE（Lonza社）TBEアガロースゲルで80Vで1時間かけて分離された。

【0267】

Sweet Spot領域は、偽エクソンの5' スプライス部位の+9～+39に位置する。

【0268】

すべてのSSOは、各糖部分に2'-O-メチル修飾を有する25nt長のホスホリチオエートRNAオリゴヌクレオチドであった（LGC Biosearch Technologies社製）。SSOは、その遺伝子のSweet Spot領域内の位置+11～+35（偽エクソンの5' スプライス部位に対して）を標的にして使用された。したがって、SSOはSweet Spot内で結合する。

【0269】

結果

複数の組織にわたる偽エクソンを識別するために、多くの異なる細胞タイプを表す公開RNAシーケンシングデータを収集した。ヒトゲノムにマッピングした後、少なくとも2つのスプライシングジャンクションを含む断片のすべての読み取りデータにフィルターをかけた。次に、断片全体のスプライシングジャンクションをマッピングし、最大100bpの断片内の読み取りデータ間のマッピングされていないギャップを許容した。ここから、完全にスプライスされたエクソンの非縮重リストをコンパイルし、そこからイントロン内に含まれる未知のエクソンを抽出した。この二重接合アプローチを使用することで、非常に低いレベルで発現した場合でも、完全にスプライスされた偽エクソンを特定することができた。RNAシーケンシングデータで特定されたランダムに選択された偽エクソンの下流+11～+35のSweet Spot領域を標的とする78個のSSOを試験した。これらのSSOのうち26個は、標的遺伝子のmRNA転写物への偽エクソンの包含を増加させることができたが（以下の表1）、残りの52個のSSOは偽エクソンの包含に影響を与えなかった（以下の表2）。

【0270】

10

20

30

40

50

【表 1 A】

表 1 : Sweet Spot 領域に配置される S S O によって、すべての基準に一致し、すべて活性化された 26 個の偽エクソン Sweet Spot 領域はゲノム配列 (DNA) によってアノテーションが付けられる。

配 列 番 号	遺伝子	hg38 偽エクソン座標	Sweet Spot 配列
1	AG03	chr1:36005718- 36005858 (+)	AAGTTTATAGGTTAAATATTTATTAAAGCCA
2	ARFGEF1	chr8:67226752- 67226866 (-)	ATTGCACAGCCTTCTTCAAGGAGGAGTCCCC
3	ATXN1	chr6:16432945- 16433096 (-)	TGAACTGTGTAGTGCCTCAGAAAAATATCAAG
4	COPS5	chr8:67056866- 67056932 (-)	AATCCAGCCTACAGCCACCAAACCTGGGTGGG
5	CSPP1	chr8:67162175- 67162312 (+)	ATGGCACATGTGGAGAATCTTCCATGGTGTG
6	CTNND2	chr5:11083880- 11083955 (-)	CAGCTCTGGGGTGCCTGCCCCCATGGGGGAA
7	DDR2	chr1:162756536- 162756638 (+)	CAGGAAGGGAGTGTGGAATTACAGCCTTCTA
8	DGCR8	chr22:20109208- 20109297 (+)	GTGCACCTGCCAGGGTTGAATCTGTAGGGCT
9	DMTF1	chr7:87184819- 87184892 (+)	CAGGCAGCGGCAGTGTAGCTTTTCCACTGTC
10	DMTF1	chr7:87167956- 87168043 (+)	ACATGAAAGCACATGAGCTGCTTAATGTTGG
11	EYA4	chr6:133301647- 133301696 (+)	CGGAACTGGGATTTGGACCTACCTTCAGAAC
12	HIF1A	chr14:61724196- 61724230 (+)	AATCAAGCTTAGTTTATGAAGGACTGAACA
13	IIT	chr4:3144777-3144843 (+)	GAGCTCAGCTCCTAAGGATGTGCAGGGGCAG

【 0 2 7 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 B】

14	HTT	chr4:3102605-3102748 (+)	<u>GGGGCACCAAAGTCTTCCCTGTCCCATCCCC</u>
15	LING02	chr9:28370207- 28370262 (-)	<u>GGATAGATAGAGAGGATCCAGAGGCTAAACG</u>
16	NHSL1	chr6:138487729- 138487783 (-)	<u>CAGGATATTGGAAGTCAGGTCCCATCTTCGT</u>
17	NAA25	chr12:112049482- 112049611 (-)	<u>TTGACTATTGGCCTATTTTCCTACTGGGCAA</u>
18	ORC1	chr1:52394553- 52394615 (-)	<u>CAAAAGCCATCTTTATGAGCACTCAGGTGCT</u>
19	RBM22	chr5:150692025- 150692147 (-)	<u>GTGAACTGACATTTGCTTAAGCCCCGTGTCA</u>
20	SLC20A2	chr8:42471066- 42471201 (-)	<u>CTGGTGTACTAAGAATACAGCCACATTCCCC</u>
21	SMAD2	chr18:47868051- 47868097 (-)	<u>GTCTTAGTTGTTGAAGCTAAGCGAGATGCAG</u>
22	STAG2	chrX:124037905- 124037969 (+)	<u>ACAGTGTAGGGAGTTAAAAAGTGCCATGAAT</u>
23	TAF2	chr8:119779073- 119779146 (-)	<u>ACGGAAAAGCGCCTTTCCTCAGTTGTTCTT</u>
24	TRPM7	chr15:50588190- 50588250 (-)	<u>TCTTTAGTATATGCAGAAGTCAGAAAGTCAG</u>
25	ZNF264	chr19:57206109- 57206184 (+)	<u>AGCACCTACTCTCAGTCCACTACATTGAGTC</u>
26	ZNF558	chr19:8814260- 8814371 (-)	<u>TGCTCCCTGCAAGTACTAGGAATGCAGGCTG</u>

下線は、試験済み又はSSOの好ましい結合配列を示す。結合は対応するpre-mRNAに対して行われる。hg38ゲノム座標はBED形式に従う。開始座標はbase、終了座標はbaseである。

【0272】

10

20

30

40

50

【表 2 A】

表 2：基準のすべてには一致せず、Sweet Spot 領域内にあるSSOによって活性化されない52個の偽エクソン

配 列 番 号	遺伝子	hg38 偽エクソン座標	Sweet Spot 配列 (5' ~3')
27	ARFGEF1	chr8:67260568- 67260632 (-)	TAAGTTTACCATCTTATATGGACGTGGTTTG
28	ATXN1	chr6:16442867- 16443008 (-)	TGGATTTTGGTAGAGACGGGGTTTGGCCAT
29	ATXN1	chr6:16488491- 16488637 (-)	ACAGACCACTGAACCAAGAACCAAGAGAGAA
30	ATXN1	chr6:16319358- 16319397 (-)	CCTTTTACATTGGCGTCTCTCACTTAGCGA
31	ATXN1	chr6:16494736- 16494865 (-)	CATCTATATGTTCAACTTACATTTATTTTC
32	ATXN2	chr12:111520393- 111520646 (-)	CACTGTGCCTGGCCGGTTTGTCTTCTAAGT
33	ATXN2	chr12:111554866- 111555074 (-)	TGGCTTCCTACCCCATTTATTTATACTTCAC
34	ATXN2	chr12:111461139- 111461305 (-)	TTCAGATCTTTTGAGCTAGAACAAAAACA
35	ATXN2	chr12:111529929- 111530026 (-)	TGTTAAATCTGATGTTAATGATTATTTTCATC
36	ATXN2	chr12:111482787- 111482831 (-)	ATTATAGAGTTTAATCTTATTTGAGGGCCT
37	ATXN2	chr12:111508911- 111509038 (-)	TCCTCAGCCTGTGTTTGTAGCTTTCTAAATGT

10

20

30

【0273】

40

50

【表 2 B】

38	CACNA1G	chr17:50578805- 50578849(+)	CAGCATGTGGGGAGAGGCGCGTCACTGGGAG
39	CACNA1H	chr16:1217594- 1217708(+)	GCAGGGGCCTCGGCCAGGGGCTCCGACCTC
40	CEP128	chr14:80568955- 80569044(-)	TTTCATAGGTAGGAATATTTAGGATATTTGG
41	CEP128	chr14:80527169- 80527261(-)	CACTGTGTGTAGCCTTCTTCTTCTATGG
42	CSPP1	chr8:67102087- 67102144(+)	AGTTAGCTAATCATTTTCTCTGTTTATTTT
43	CTNND2	chr5:11119101- 11119134(-)	GTAAGACTGACATGCCTTCTACCCTCCAGAA
44	ERAP2	chr5:96902643- 96902842(+)	ACCCTCTAGTATAATATATGCCACATTAATA
45	FKBP5	chr6:35671139- 35671256(-)	CACCATGCCCAACTAAGTTTCTATTTTGTG
46	HTT	chr4:3098129-3098222(+)	TACTGCTAAGTGGCATGTTTTGTTTTATGCT
47	HTT	chr4:3234807-3234939(+)	GACTGGCCTGGGGTGTGGGAATCTAGGGCCT
48	IHTT	chr4:3124250-3124362(+)	CCCCCATTGAGAGCTGTGTCTTCAAACCTCTT
49	HTT	chr4:3213591-3213736(+)	GCTTTGTGGCAGAGAGGGGACTGGCACTTTG
50	IHTT	chr4:3218488-3218645(+)	TATTGATCAGAACCTTGTTTCAGATAACAT
51	HTT	chr4:3223670-3223869(+)	CATTTGGTATTACACCAGGTTTCTTTAGGCA
52	HTT	chr4:3124250-3124305(+)	TCTTCTGGCTGGGACATGGGATATATCCTGT
53	LINGO2	chr9:28436349- 28436392(-)	ACATATGTCTATGTTCAGTGCCAATAGTTAA
54	MAP2K2	chr19:4110359- 4110415(-)	ATGTAGATGCCTTTGGTTTTGTTTTGTTTC
55	MAP2K2	chr19:4109169- 4109284(-)	CCGCCTGCCGCACAGCGTCGTTTGCAAAACC

10

20

30

40

【 0 2 7 4 】

50

【表 2 C】

56	MECP2	chrX:154094378- 154094489 (-)	AGATGTGAACAGGTCCTCTTCTTTGGGCTT
57	MTOR	chr1:11140517- 11140666 (-)	CCTGTTAGGAACCGGGAGGCACAGCAGGAGG
58	MUC16	chr19:8853333- 8853363 (-)	ATTTTATGTTATTTGAGAAATCTCCACGTTT
59	NGLY1	chr3:25761678- 25761708 (-)	ATATTTATGTTTTTAAGAAATTACCAAGCTG
60	NUBPL	chr14:31654070- 31654134 (+)	CATGAATTTTTTGGTTTCCCATTGCATATAA
61	NAA25	chr12:112045827- 112045878 (-)	TATTTTATGTTACTTTTTATTTTGGAGACCT
62	PCSK9	chr1:55045413- 55045449 (+)	ACTCGCTGAAGTGGGGCAGGTTAAGAAGCC
63	PCSK9	chr1:55055176- 55055228 (+)	GCAGCCAAGACTCTGTTCAAGTTTGTGTGGG
64	PSMG2	chr18:12705934- 12706047 (+)	TAAATAGTCTCAAAGGTGGAGGAGGCCCCAG
65	PTBP3	chr9:112300837- 112300928 (-)	CACTGTGCCCGGGTTTTGTACCCCATATAA
66	SCN1A	chr2:166007230- 166007293 (-)	TTACCCCTTTTGCTACCTTTAATCCTTGAC
67	SCN1A	chr2:165992896- 165993078 (-)	CAAGATCATGGGGAGATGAAAGTAGCATCAA
68	SCN9A	chr2:166307149- 166307277 (-)	CTGATATTGATGTGAAAAATTGATATTTGG
69	SCN9A	chr2:166321439- 166321515 (-)	CCCACCTTAGCTACTCTCAAGCAGCTGAGAC
70	SDCCAG8	chr1:243497867- 243497959 (+)	CACTGTTGGGTTGTTTTCTTTTGAAGTGT
71	SNCA	chr4:89771397- 89771585 (-)	AGGCATGCTGGACAAATGGATTACATGTGC

10

20

30

40

【 0 2 7 5 】

50

【表 2 D】

72	SNCA	chr4:89726926- 89726976 (-)	<u>TCATTAATGGTGCATCCGGATCAGAACCTA</u>
73	SNCA	chr4:89836461- 89836529 (-)	<u>CCAACCTTTCTCTCACATAAAATCTGTCTGC</u>
74	SNCA	chr4:89836337- 89836394 (-)	<u>GGGTTAACAAAGTGCTGGCGCGGGTCCGCTA</u>
75	SORT1	chr1:109397207- 109397340 (-)	<u>TCTCTGGGTCACTACTTCCGGGTGGGAGAG</u>
76	SP100	chr2:230436381- 230436405 (+)	<u>ATCATGGGGCAATTCACCCATTCTGTTCTC</u>
77	TMEM243	chr7:87206679- 87206742 (-)	<u>TAAACTGTGCACTGTTCTATGTAATATGATT</u>
78	YIPF6	chrX:68506157- 68506258 (+)	<u>GATCCCATATACACCTCAACAATTATCTA</u>

下線は、試験済み又はSSOの好ましい結合配列を示す。結合は対応するpre-mRNAに対して行われる。hg38ゲノム座標はGFF/GFT形式に従う。開始座標と終了座標は1baseから始まる。

【0276】

これらの結果に基づいて、我々は、Sweet Spot領域を標的とするSSOによって偽エクソンが含まれるために満たさなければならない一連の基準を確立した。これらの基準を使用して、我々は、偽エクソンの包含がヒトの疾患の治療的使用に高い能力を有する場合、疾患原因遺伝子に偽エクソンを包含するための新しい標的を選択した。

【0277】

基準：

偽エクソンの場合：

- ・ 偽エクソンの長さ<160nt、
- ・ 偽エクソンの長さ>30nt、
- ・ 偽エクソンの最後の3ntはTAGと異なり、
- ・ ドナースプライス部位は、MaxEntスコア ≥ 4.33 を有し、
- ・ ドナースプライス部位は、MaxEntスコア ≤ 10.06 を有し、及び
- ・ アクセプタースプライス部位は、MaxEntスコア ≥ 3.63 を有する。

【0278】

上述の偽エクソン(3)の5'スプライス部位に対して下流の遺伝子配列+9~+39の場合

- ・ 総ピリミジン数 ≤ 20 、
- ・ 総チミジン塩基数 ≤ 12 、
- ・ 総チミジン塩基数 ≥ 4 、
- ・ 総グアニン塩基数 ≤ 12 、
- ・ チミジンポリマーの最大長 ≤ 4 、
- ・ ピリミジンポリマーの最大長 ≤ 10 、
- ・ プリンポリマーの最小長 ≥ 3 、及び
- ・ 少なくとも3nt長のグアニンポリマーの最大数 ≤ 2 。

【0279】

10

20

30

40

50

結論

目的の標的遺伝子内の偽エクソンは、疾患原因タンパク質のダウンレギュレーションのメカニズムとして活性化することができる。我々が確立した基準に基づいて偽エクソンを選別することにより、新しい標的候補が選択され、新しい治療薬の発見が可能になる。

【0280】

実施例3-SMAD2

研究の目的

慢性肝疾患は肝臓の炎症と線維化を特徴とする。我々は、インシリコ解析と生体内実験を通じて、組織線維症に重要なTGF- β /Smadシグナル伝達経路(Inagakiら、2007)における偽エクソンの存在を調査することを目的とした。

10

【0281】

材料と方法

我々は、GEUVADISコンソーシアムから公開されているRNA-seqデータ内の完全にスプライスされた偽エクソンを有する断片を特定するために、新しい二重接合アプローチを使用した。HeLa細胞、LX-2細胞、及びHepG2細胞を12ウェルプレートに播種し、Lipofectamine RNAiMAX (invitrogen社)を使用して40nMのSSOで60%のコンフルエンスでフォワードトランスフェクトした。SSO(配列番号21を標的にする、特定の標的化配列に表1の配列番号21に下線が引かれている)は、各糖部分に2'-O-メチル修飾を有する25nt長のホスホロチオエートRNAオリゴヌクレオチドであった(LGC Biosearch Technologies社製)。(実施例2の表も参照のこと)。SSOは、SMAD2遺伝子のSweet Spot領域内の位置+11~+35(偽エクソンの5'スプライス部位に対して)に相補的である(配列番号21)。したがって、SSOはSweet Spot内で結合する。Sweet Spot領域を標的とする最適なSSOを決定するために、PEの5'ssの下流の+9~+14の位置までのSweet Spot領域を標的とする25nt長のSSO(実施例11の表8に列挙される配列番号202~207)を使用していくつかのSSOを試験した。

20

【0282】

同様の改変を有する非結合SSO(5'-GCUCAAUAUGCUCACUGCCAU GCUUG-3') (配列番号126)を陰性対照として使用した。TGF β 刺激の実験では、RNAとタンパク質を採取する前に、細胞を10ng/mlのTGF β (R&D systems社)で16時間刺激した。48時間後、Trizol(Invitrogen社)とクロロホルムを使用してRNAを単離し、次にイソプロパノールで沈殿させた。相補DNA(cDNA)は、高容量のcDNAキット(Applied Biosystems社)を使用して500ngのRNAから合成された。プライマーは、目的の偽エクソンに隣接する隣り合うエクソンの少なくとも1つのエクソン間接合部をカバーするように設計された。PCRは、TEMPase Hot Start DNAポリメラーゼ(アンプリコン)と反応あたり1 μ lのcDNAを使用して実行された。各プライマーは0.5pmol/ μ l使用した。PCR産物は2%のSeakem LE(Lonza社)TBEアガロースゲルで80Vで1時間かけて分離された。リン酸化タンパク質を保存するために、細胞をオカダ酸で溶解することによってタンパク質を抽出し、ベンゾナーゼ処理し、変性タンパク質を4~12%のNuPage SDS-Pageゲルで分離し、対照として、SMAD2、ホスホSMAD2及びアクチンに対する抗体を使用し、ウェスタンブロッティングで分析した。筋線維芽細胞の形成を研究するために、LX-2細胞を20nMのSSOでトランスフェクトした96ウェルプレートで増殖させ、Incucyte装置でインキュベートして4時間ごとに画像を撮影した。画像は、球状(分化)細胞のマスクを作成することによってImageJで分析した。

30

40

【0283】

結果

完全にスプライスされた偽エクソンを有する断片を調べることによって、SMAD2遺

50

伝子のイントロン5内に位置し、TGF- β /Smad経路に関与するシグナル伝達タンパク質Mothers against decapentaplegic homolog 2をコードする偽エクソンを特定した。成熟mRNAに偽エクソンを含めると、コード領域に46ntが挿入され、フレームシフトが発生する。終止コドン(UAA)も偽エクソン内に位置し、NMD経路を活性化して転写物の分解を引き起こす可能性がある。

【0284】

SSO(実施例11、表8に列举される配列番号202~207)のトランスフェクションは、すべてが偽エクソンの包含を媒介し、+11及び+12からのSSO標的化がSMAD2転写物への偽エクソンの包含を媒介するのに最適であることを示した(結果は示されていない)。

【0285】

5'スプライス部位の下流の+11~+35の位置に相補的なSSOをHeLa細胞にトランスフェクションすると、偽エクソンが最大90%含まれる結果となった(図8A)。同SSOをLX-2肝星細胞にトランスフェクションすると、より低い濃度のSSOで、偽エクソンの包含が更に高くなった(図8B)。HepG2細胞のタンパク質レベルは、SMAD2タンパク質の大幅な減少を示し、TGF β 刺激下ではリン酸化SMAD2も減少を示す(図8C)。LX-2細胞のTGF β 刺激により、細胞は筋線維芽細胞に分化し、+11SSOのトランスフェクションにより分化は減少した(図8D)。

【0286】

結論

特定のSSOを使用してSMAD2遺伝子の正常な機能が最大90%減少して、偽エクソンの包含を増加し、転写物の分解又は切断された非機能タンパク質の発現によって正常な遺伝子産物の機能が破壊される可能性がある。これは、SMAD2が正の調節因子であるTGF- β 活性の増加に関連する肝線維症やその他の疾患に関連する(Sysaら、2009)。更に、SMAD2のダウンレギュレーションは神経膠腫の成長を低下させる可能性がある(Papachristodoulouら、2019)

Inagaki Yら、Gut. 2007 Feb; 56(2): 284-92. doi: 10.1136/gut.2005.088690

Sysa Pら、2009 Sep; 28(9): 425-34. doi: 10.1089/dna.2009.0884 Papachristodoulou Aら、Clin Cancer Res. 2019 Dec 1; 25(23): 7189-7201. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3024

【0287】

実施例4-ORC1

研究の目的

複製開始点認識複合体(ORC)遺伝子はDNA複製に関与しており、肝細胞癌腫瘍で高発現する(Wangら、2020)。ORC1の発現が低い場合、ORC1発現が高い場合と比較して、一貫して予後が良好であることを示し(Wangら、2020)、一方、ORC1をノックダウンすると、癌細胞に敏感になり、他の抗癌治療に対して脆弱になる(Zimmermanら、2013)。我々は、インシリコ解析と生体内実験を通じて、ORC1遺伝子の発現をダウンレギュレーションするために使用できるORC1遺伝子の偽エクソンの存在を調査することを目的とした。

【0288】

材料と方法

我々は、GEUVADISコンソーシアムから公開されているRNA-seqデータ内の完全にスプライスされた偽エクソンを有する断片を特定するために、新しい二重接合アプローチを使用した。HeLa細胞を12ウェルプレートに播種し、Lipofectamine RNAiMAX(invitrogen社)を使用して40nMのSSOで60%のコンフルエンスでフォワードトランスフェクトした。

【0289】

10

20

30

40

50

SSO（配列番号18を標的にする、特定の標的配列は、表1の配列番号18に下線が引かれている）は、各糖部分に2'-O-メチル修飾を有する25nt長のホスホロチオエートRNAオリゴヌクレオチドであった（LGC Biosearch Technologies社製）。（実施例2の表も参照のこと）。SSOは、ORC1遺伝子のSweet Spot領域内の位置+11～+35（偽エクソンの5'スプライス部位に対して）に相補的である。したがって、SSOはSweet Spot内で結合する。

【0290】

同様の改変を有する非結合SSO（5'GCUCAAUAUGCUCUGCCCAUGCUG3'）（配列番号126）を陰性対照として使用した。48時間後、Trizol（Invitrogen社）とクロロホルムを使用してRNAを単離し、次にイソプロパノールで沈殿させた。相補DNA（cDNA）は、高容量のcDNAキット（Applied Biosystems社）を使用して500ngのRNAから合成された。プライマーは、目的の偽エクソンに隣接する隣り合うエクソンの少なくとも1つのエクソン間接合部をカバーするように設計された。PCRは、TEMPase Hot Start DNAポリメラーゼ（アンブリコン）と反応あたり1μlのcDNAを使用して実行された。各プライマーは0.5pmol/μl使用した。PCR産物は2%のSeakem LE（Lonza社）TBEアガロースゲルで80Vで1時間かけて分離された。

【0291】

結果

完全にスプライスされた偽エクソンを有する断片を調べるために、二重接合アプローチを使用したところ、ORC1遺伝子のイントロン5内に偽エクソンが特定され、その結果、pre-mRNAに62ntが挿入され、フレームシフトが発生した。5'スプライス部位の下流の+11～+35の位置と相補的なSSOをHeLa細胞にトランスフェクションすると、偽エクソンが最大45%多く含まれるようになった（データは示されない）。

【0292】

結論

ORC1遺伝子産物の正常な発現が特定のSSOを使用して最大45%減少して、正常な遺伝子産物の機能を破壊する偽エクソンの包含が増加する場合がある。したがって、SSOを介したORC1発現のダウンレギュレーションは、他の薬物の抗癌効果を高める働きをする可能性がある。

Wang XKら、J Cancer. 2020 Jan 20;11(7):1869-1882. doi:10.7150/jca.39163

Zimmerman, K. M. ら、Mol Cancer Res, 2013. 11(4): p. 370-80.

【0293】

実施例5-LINGO2

研究の目的

LINGO2（ロイシンリッチリピート及び免疫グロブリン様ドメイン含有nogou受容体相互作用タンパク質2）は、腸組織、脳、ニューロン（皮質ニューロン及び後根神経節（DRG）ニューロンなど）を含む多くの組織で高度に発現する（Guillemairaら、2020）。LINGO2の発現は胃癌で増加し、これは予後不良に関連し、LINGO2のダウンレギュレーションは胃癌細胞の増殖を減少させる（Joら、2019）。LINGO2は運動ニューロンの生存と運動ニューロンの軸索の長さも負に制御する。

【0294】

これは、LINGO2発現のノックダウン又は改変が神経疾患や癌に対する新しい治療法になる可能性があることを示唆する。

【0295】

材料と方法：

公開されているRNA-seqデータを分析するために、分析パイプライン（図2）を

使用した。HeLa細胞をRPMIで培養し、Lipofectamineを使用して20nMのSSOでトランスフェクトした。24時間後、細胞を採取し、RNAを精製した。RT-PCRを実行し、得られた産物を2%のアガロースゲル上で視覚化した。Incucyte実験では、U251細胞を5、10、20又は40nMのSSOでトランスフェクトした96ウェルプレートで増殖させ、Incucyte装置でインキュベートし、4時間ごとに画像を撮影した。

【0296】

結果：

ニューロンと脳におけるLINGO2の高発現に基づいて、我々は、SSOに基づくPEの活性化が神経膠芽腫の治療に使用できるのではないかと推測した。配列番号15（特定の標的配列は、表1の配列番号15に下線が引かれている）に記載のSweet Spot領域を標的とするSSOを使用することによって、我々は、U251神経膠芽腫細胞へのhr9:28370208-28370262（-）LINGO2偽エクソンの高レベルの包含を実証した（図3A）。この偽エクソンは、偽エクソンのmRNAのエクソン3と4の間に55bpを導入する。このSSOを用いてU251神経膠芽腫細胞を調査したところ、SSO治療から生じるU251神経膠芽腫細胞の成長と増殖が用量依存的に減少することを観察した（図3B）。

【0297】

結論

したがって、胃癌又は神経膠芽腫などの癌を治療する方法、又は癌細胞若しくは神経細胞などのヒト細胞を、偽エクソンをLINGO2 mRNAに包含させるSSOに接触させることによって、運動ニューロンの生存及び運動ニューロンの軸索成長を促進する方法が、本明細書で提供される。

【0298】

実施例6-TAF2

研究の目的

TAF2遺伝子は、プロモーター配列への結合に関与して、転写を開始する転写因子IID複合体のサブユニットである、Tat-a-box結合タンパク質関連因子2を発現する（Martinezら、1998）TAF2は、高悪性度漿液性卵巢癌（HGSC）の73%でコピー数増加又はmRNAの過剰発現を示し（Ribeiroら、2014）、癌に重要である。

【0299】

材料と方法：

分析パイプライン（図2）を使用して、公開されているRNA-seqデータを分析した。NCI-H358肺癌細胞をRPMIで培養し、リポフェクタミンを使用して20nMのSSOでトランスフェクトした。24時間後、細胞を採取し、RNAを精製した。RT-PCRを実行し、得られた産物を2%のアガロースゲル上で視覚化した。WST-1アッセイはトランスフェクション後48時間実施した。Incucyte実験については、NCI-H358肺癌細胞を10nMのSSOでトランスフェクトした96ウェルプレートで増殖し、Incucyte装置でインキュベートし、4時間ごとに画像を撮影した。

【0300】

結果：

chr8:119779073-119779146（-）TAF2偽エクソンを包含すると、mRNAのエクソン17と18の間に73bpが導入され、エクソン18に未成熟終止コドンを含むシフトした読み取りフレームが生成される。この偽エクソンを含むTAF2 mRNA転写物はナンセンス変異依存mRNA分解機構（NMD）の標的であり、SSO治療によって誘導される偽エクソンの包含が増加すると、TAF2 mRNAの発現が減少する。更に、偽エクソンを含む転写物が翻訳されると、正常なTAF2機能を有さない大幅に切断されたタンパク質が生成される。

【0301】

配列番号23（特定の標的配列は、表1の配列番号23に下線が引かれている）に記載のTAF2 Sweet Spot領域を標的とするSSOを使用することによって、我々は、NCI-H358肺癌細胞へのchr8:119779073-119779146（-）TAF2偽エクソンの高レベルの包含を実証した（図4A）。このSSOを使用してNCI-H358肺癌細胞を調査したところ、incucyteアッセイ（図4B）及びWST-1アッセイ（図4C）によってNCI-H358肺癌細胞の成長と増殖の減少が観察された。

【0302】

結論

TAF2偽エクソンを標的とするSSOを使用すると、偽エクソンの包含が増加し、癌細胞の増殖が減少する。したがって、TAF2偽エクソンを標的とするSSOは、将来の抗癌治療に使用される候補となる可能性がある。

【0303】

実施例7-HTT

研究の目的

HTTはハンチンチンタンパク質をコードし、常染色体優性神経変性疾患であるハンチントン病に関連し、ハンチントン病は、HTT遺伝子内のCAGトリヌクレオチド反復の不安定な拡大によって引き起こされ、異常なポリグルタミン領域を有する細胞傷害性変異タンパク質の翻訳を引き起こす。HTTのダウンレギュレーションは、変異体ハンチンチンのレベルを低下させることによるハンチントン病の治療における潜在的な戦略として研究されてきた。

【0304】

chr4:3102605-3102748（+）HHT偽エクソンを含めると、フレーム内未成熟終止コドンを含むmRNAのエクソン3とエクソン4の間に143bpが導入される。この偽エクソンを含むHTT mRNA転写物はナンセンス変異依存分解機構（NMD）の標的であり、SSO治療によって誘導される偽エクソンの包含が増加すると、HTT mRNAの発現が減少する。ハンチントン病は、HTT mRNAにおけるドミナントネガティブトリヌクレオチド反復の拡大によって引き起こされる常染色体優性疾患である。PEを包含すると、ドミナントネガティブmRNAのレベルが低下し、そのため、治療として使用できる。

【0305】

材料と方法

分析パイプライン（図2）を使用して、公開されているRNA-seqデータを分析した。HeLa細胞をRPMIで増殖し、Lipofectamineを使用して20nMのSSOでトランスフェクトした。24時間後、細胞を採取し、RNAを精製した。RT-PCRを実行し、得られた産物を2%のアガロースゲル上で視覚化した。

【0306】

結果

配列番号14（特定の標的配列は、表1の配列番号14に下線が引かれている）に記載のSweet Spot領域を標的とするSSOを使用することによって、我々は、NMDシステムによってHTT mRNAの分解を引き起こすHeLa細胞のchr4:3102605-3102748（+）HHT偽エクソンの高レベルの包含を実証した（データは示されない）。

【0307】

結論

HTT偽エクソンを標的とするSSOを使用すると、偽エクソンの包含が増加し、ハンチントン病を引き起こすドミナントネガティブmRNAのダウンレギュレーションに適する。

【0308】

実施例 8－更なる関連の標的

以下の追加の Sweet Spot 配列は、本発明に記載の基準を使用して識別された（例えば、実施例 2 を参照のこと）。したがって、これらの標的は、SSO の機能標的となる可能性が非常に高く、成熟 mRNA に偽エクソンを組み込むことが可能になる。

【0309】

【表 3 A】

表 3：関連の標的遺伝子

配 列 番 号	遺伝子	hg38 偽エクソン座標	Sweet Spot 配列
79	ROCK1	chr18:21017021- 21017098 (-)	CTGTGAAGGCCGTGAGGTAAGAGACCTTGAC
80	ROCK1	chr18:21022445- 21022564 (-)	GGAATGGGGGAAATGGAGAATAACCAGTATA
81	OGA	chr10:101795365- 101795480 (-)	AAGGGCGGTAGACATGAACTGAAGTCACGTT
82	OGA	chr10:101795374- 101795480 (-)	GGTAGATTTAAGGGCGGTAGACATGAACTGA
83	TMEM97	chr17:28320422- 28320470 (+)	CGTGTAGCAAGTTGCAGTCTGGGGACTTGGT
84	TXNRD1	chr12:104300119- 104300276 (+)	TGAACCTGGGTAGCAACTCTTGAGCGAAGA
85	SLC7A11	chr4:138191360- 138191415 (-)	TAGATTAGACATCAGTGGTATTGAAATTTAA
86	STAT5B	chr17:42229494- 42229533 (-)	TGCTCAGAGACTGGATCCTTTTAAGAGTGGG
87	MAPKAPK5	chr12:111870683- 111870782 (+)	CTTATAGAGTGAAGGGTCCCTAGGCCAAGAC
88	ZYG11A	chr1:52880598- 52880653 (+)	TTGGAGGAGGGAGAAGCCACCTTTTAAGGA
89	ZYG11A	chr1:52880601- 52880653 (+)	TTGGAGGAGGGAGAAGCCACCTTTTAAGGA
90	MCCC2	chr5:71642612- 71642727 (+)	CAGTGCCATTAGGATGTACTGCATAAGTTT
91	MCCC2	chr5:71642664- 71642727 (+)	CAGTGCCATTAGGATGTACTGCATAAGTTT

【0310】

10

20

30

40

50

【表 3 B】

92	SMYD2	chr1:214334511- 214334649(+)	TGGAGAGTTAGGGTTAGGATGTTAGAATTGC
93	DIAPH3	chr13:59923001- 59923041(-)	TAGCATTAAACAGTATAGGTAGGGAATCTGGT
94	DIAPH3	chr13:59923001- 59923111(-)	TAGCATTAAACAGTATAGGTAGGGAATCTGGT
95	COPS3	chr17:17260072- 17260112(-)	CAAGGCTACATTGGGAGACAGTGAAGGCAG
96	SNX5	chr20:17948072- 17948142(-)	CCAGAAGCAGGATTTCAGGGTAGGGTTATG
97	YBX1	chr1:42699646- 42699724(+)	CACTGTGCCCAACCTTGGAGTGAGATGAATA
98	CHD1L	chr1:147276877- 147276929(+)	GGAGTAATAAATGTCTGTCAAGGGCAGCATC
99	PTPN11	chr12:112456115- 112456268(+)	TCAATGGATGTGCTAGCCGCTCCATTTGGCT
100	UBAP2L	chr1:154241700- 154241797(+)	AATATCTGATTGTCTGGATTATCCCAGGAAG
101	E2F3	chr6:20456984- 20457037(+)	GGCTTCAGAGATGAAGAGAGTATTTCTCCTC
102	SLC2A13	chr12:39831850- 39831885(-)	ATCAGGAAGCTTATGGTAGAAGGCTAAGGGG
103	SLC2A13	chr12:39939133- 39939264(-)	GCTATGTCAGTAGGCAACTGGAGCACAGTCC
104	ASIC1	chr12:50079657- 50079740(+)	TTGGCAGAGTTTAGCATCCAGGCAGGGTGAA
105	LRIG2	chr1:113116745- 113116798(+)	TCAGTAAAGTTTAAAGGGTAGCTAGGAGCCA
106	RNF115	chr1:145784178- 145784251(-)	CAGGCCAGGATAAGTTGTCTGAAGTCACAATG
107	HGS	chr17:81684813- 81684891(+)	GTGCTTCAGGGATGAATCCAGAGGTTAACTA

10

20

30

40

【 0 3 1 1 】

50

【表 3 C】

108	TLK1	chr2:171026752- 171026849(-)	CTGTGTGCCCACTTAAACTGTTTGTATAATG
109	WWTR1	chr3:149571657- 149571724(-)	GAACTCAAGTAGACCCTAGTCAGCTTCAAGT
110	HMGCS1	chr5:43297529- 43297673(-)	TGTCATCCCCACTTTACAGAGAAGTGGGTTA
111	SND1	chr7:127725671- 127725726(+)	GCCTTTTCCAAACCAAGAACAAGCGGGAG
112	HSPG2	chr1:21898326- 21898469(-)	TTTAGGCCAAAGCAGGAATAAGATGTGGACA
113	SLC2A1	chr1:42942082- 42942153(-)	AGTGACTCCCAAGATCAGGGTCCTGTTGG
114	KNTC1	chr12:122595478- 122595600(+)	AGGACTATAGGCTGCGCATAGCTCGAAGGAG
115	FDFT1	chr8:11826877- 11826978(+)	AAACTCCAGGTGTCTGTAATAAGGGACAGGG
116	THOC2	chrX:123683845- 123683911(-)	CCTGAGGTTGGGAGTTTGAGAGCAGCCTGAA
117	THOC2	chrX:123706588- 123706704(-)	GTAGGGAGAAAAAAGCCTGTGCTGTAA
118	SMC1A	chrX:53402287- 53402379(-)	GATGAACACAACACAGTCTTTGCTGAAGGAG
119	PICALM	chr11:85978968- 85979061(-)	GGAGTTTAGAGTAGTGGATTTATGGACTCG
120	PICALM	chr11:85984424- 85984547(-)	GAGGGAGAAAACTTTATCTTGGGGCTACT
121	DYRK1A	chr21:37383084- 37383160(+)	AATCTGTATTCTCTAGTCAAGGAGGGATGGG
122	PHLPP1	chr18:62885960- 62886035(+)	ACTAGTAGATCACACCCTAGATAGTTTAGC
123	AURKA	chr20:56390967- 56391068(-)	AATTGGAGCAAATGCCTGTAGCTTCTGTCAG

【 0 3 1 2 】

10

20

30

40

50

【表 3 D】

124	BAC11	chr21:29372435- 29372563 (+)	TTACAGTCCGTGTGTAATGAGTGACCTAGCG
125	MAP4	chr3:47870692- 47870737 (-)	GCCGGGGCTCTGTAGTGGGTTTGTGCCCA

下線は、試験済み又はSSOの好ましい結合配列を示す。結合は対応する pre-mRNAに対して行われる。hg38ゲノム座標はGFF/GFT形式に従う。開始座標と終了座標は1 baseから始まる。

10

【0313】

標的遺伝子の更なる説明：

ROCK1：

ROCK1はRho関連セリン／スレオニンキナーゼをコードする。ROCK1のシグナル伝達経路は、代謝性疾患並びにハンチントン病、パーキンソン病及びアルツハイマー病などのいくつかの神経変性障害の発症と関連しており、その機能を抑制することで神経変性疾患を治療するための有望な標的である（Kochら、2018）。ROCK1の阻害は、慢性眼科疾患の治療の強力な標的である（Moshirfarら、2018）。肝臓ROCK1は、非アルコール性脂肪性肝疾患及び肝細胞癌の治療の提案された標的である（Huangら、2018；Wuら、2021）。

20

【0314】

chr18:21022445-21022564（-）ROCK1偽エクソンの包含により、mRNAのエクソン11と12の間にフレーム内未成熟終止コドンを含む120bpが導入される。この偽エクソンを含むmRNA転写物は、ナンセンス変異依存分解機構の標的になると予測され、偽エクソンの包含が増加すると遺伝子発現が減少する。

【0315】

chr18:21017021-21017098（-）ROCK1偽エクソンを包含すると、mRNAのエクソン12と13の間に78bpが導入される。タンパク質の翻訳では、アミノ酸配列に26個のアミノ酸が導入される。この導入により、タンパク質機能が破壊される、又は遺正常なタンパク質機能が改変することによって、潜在的に遺伝子発現が低下する。

30

ROCK1 SSO標的化についてのSweet Spotを表3と表6に示す。

Koch JC, Tatenhorst L, Roser AE, Saal KA, Tonges L, Lingor P. ROCK inhibition in models of neurodegeneration and its potential for clinical translation. *Pharmacol Ther*. 2018 Sep;189:1-21. Moshirfar M, Parker L, Birdsong OC, Ronquillo YC, Hofstedt D, Shah TJ, Gomez AT, Hoopes PCS. Use of Rho kinase Inhibitors in Ophthalmology: A Review of the Literature. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol*. 2018 Fall;7(3):101-111. Huang H, Lee SH, Sousa-Lima I, Kim SS, Hwang WM, Dagon Y, Yang WM, Cho S, Kang MC, Seo JA, Shibata M, Cho H, Belew GD, Bhin J, Desai BN, Ryu MJ, Shong M, Li P, Meng H, Chung BH, Hwang D, Kim MS, Park KS, Macedo MP, White M, Jones J, Kim YB. Rho-kinase/AMPK axis regulates

40

50

hepatic lipogenesis during overnutrition. J Clin Invest. 2018 Dec 3;128(12):5335-5350. Wu Hら(2021) Biochemical Pharmacology Volume 184, February 2021, 114353. (<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114353>)
【0316】

OGA

タンパク質のO-GlcNAcグリコシル化は、重要な翻訳後調節修飾である。このプロセスは動的であり、タンパク質O-GlcNAcaseは、OGA遺伝子によってコードされ、そのグループを再び除去する役割を果たす。

【0317】

OGA阻害剤は、アルツハイマー病(AD)の動物モデルにおいて認知機能の低下を阻止し、アミロイドブラークの数を減少させる(Yuzwa、Shanら、2014)、脳内の病的なタウの量を減らす(Graham、Grayら、2014、Hastings、Wangら、2017)。更に、OGAの阻害は、 α -シヌクレイン予備形成原線維の細胞内部移行を減少させ、パーキンソン病(PD)の治療戦略となる可能性がある(Tavassoly、Yueら、2021)。

【0318】

OGAイントロン10に位置するchr10:101795374-101795480(-)及びchr10:101795365-101795480(-)偽エクソンの挿入により、結果として生じる転写物をNMD経路による分解の標的にする未成熟終止コドンが導入される。OGA阻害を機能的に模倣することにより、OGAのSSO媒介ダウンレギュレーションは、ADやPDを含むいくつかの神経障害に対する有望なアプローチとなる可能性がある。

OGA SSO標的化のSweet Spotを表3と表6に示す。

Graham, D. L., ら、2 Neuropharmacology 79:307-313.

Hastings, N. B., ら、2017. Mol Neurodegener 12(1):39.

Tavassoly, O., ら、2021. FEBS J 288(2):452-470.

Yuzwa, S. A., ら、2014. Mol Neurodegener 9:42.

【0319】

TMEM97

シグマ-2受容体としても知られる膜貫通タンパク質97(TMEM97)は、コレステロールの恒常性維持に重要な役割を果たす。TMEM97はいくつかの癌で過剰発現していることが示されており、その発現を抑制することで、神経膠腫癌細胞の増殖と転移が阻害される(Qiu、Sunら、2015)。TMEM97はアルツハイマー病などの神経変性疾患の病理にも関与し、その阻害は潜在的な治療法となる可能性がある(Riad、Lengyel-Zhandら2020)。TMEM97の阻害は、C型ニーマン・ピック病に対する潜在的な治療法としても提案されている(Ebrahimi-Fakhari、Wahlsterら、2016)。

【0320】

TMEM97イントロン1へのchr17:28320422-28320470(+)偽エクソンのSSO媒介包含により、生じた転写物がNMD経路による分解を標的とする未成熟終止コドンが導入され、TMEM97遺伝子発現がダウンレギュレーションされる。

TMEM97 SSO標的化のSweet Spotを表3及び表6に示す。

Ebrahimi-Fakhari, D., ら、2016. Hum Mol Genet 25(16):3588-3599.

10

20

30

40

50

Qiu, G., ら、2015. *Tumour Biol* 36 (10) : 8231-8238.

Riad, A., ら、2020. *Mol Neurobiol* 57 (9) : 3803-3813.

【0321】

TXNRD1

チオレドキシン還元酵素1はTXNRD1によってコードされ、肝細胞癌（HCC）患者の予後不良に関連する（Fuら、2017）。HCC組織及び細胞では、TXNRD1が過剰発現し、臨床病期の上昇及び生存期間の短縮と正の相関関係にある（Fuら、2107）。また、HCCを含むいくつかの癌で変異していることも判明している（Jiaら、2020）。したがって、TXNRD1は標的ダウンレギュレーションの有望な治療標的である。

【0322】

参照転写物のイントロン4に配置される158nt長の偽エクソンを含む転写物は、フレームシフトの導入及び結果として得られる未成熟終止コドンにより、NMDシステムによる分解の対象となる。また、還元酵素の活性に必要な活性部位のアミノ酸が欠如している大幅に切断されたタンパク質の生成につながる可能性もある。どちらのシナリオでも、転写物に偽エクソンが含まれていると、遺伝子産物の機能が完全に失われる。

TXNRD1標的化のSweet Spotを表3と表6に示す。

Fu B, ら、*Biomed Res Int*. 2017; 2017: 4698167. doi: 10.1155/2017/4698167.

Jia Y, ら、*Mol Clin Oncol*. 2020 Dec; 13 (6) : 83. doi: 10.3892/mco.2020.2153.

【0323】

SLC7A11

溶質担体SLC7A11は、シスチン／グルタミン酸トランスポーターシステムXc-のメンバーであり、多くの癌で過剰発現し、予後不良のマーカーであるxCTをコードする（Linら、2020によりレビューされた）。神経膠芽腫では、SLC7A11がグルタミン酸分泌の増加及び神経細胞死につながる（Savaskanら、2008）。xCTの阻害は神経膠腫を有するラットの神経細胞死と浮腫を低下し、生存期間を延長する（Savaskanら、2008）。SLC7A11のアップレギュレーションは、細胞内の抗酸化グルタチオンレベルを上昇させることにより、KRAS変異細胞において重要な細胞保護効果も有し（Limら、2019）、SLC7A11のノックダウンにより腫瘍異種移植片の増殖が著しく損なわれる（Limら、2019）。SLC7A11は、一般的に治療抵抗性が高いKRAS誘導性腫瘍と、神経膠腫を含む他の多くの癌の両方に対する治療標的候補である。いくつかのxCT阻害剤が存在するが、それらはSSOを介したSLC7A11のダウンレギュレーションよりも特異性が低く、臨床現場で使用すると、SSOベースの治療と比較して非常により多くの副作用を引き起こす可能性がある。

【0324】

イントロン6に配置される56ntの偽エクソンを包含すると、フレームシフト及び結果として未成熟終止コドンが生じ、NMDに敏感な転写物が生成され、ダウンレギュレーションされる可能性があり、又は切断された非機能タンパク質が発現する可能性がある。

【0325】

SLC7A11 SSO標的化のSweet Spotを表3と表6に示す。

【0326】

したがって、SSOによるSLC7A11のノックダウン治療は、現在のタンパク質阻害剤より特異性がより高く、副作用が少ないため、いくつかの癌に対する有望な治療法になる。

Lin W, ら、*Am J Cancer Res*. 2020 Oct 1; 10 (10) : 3106-3126.

10

20

30

40

50

Savaskan NE, ら、Nat Med. 2008 Jun; 14 (6) : 629-32. doi: 10.1038/nm1772.

Lim JKM, ら、Mol Cell Oncol. 2019 Nov 10; 7 (1) : 1654814. doi: 10.1080/23723556.2019.1654814.

Lim JKM, ら、Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 May 7; 116 (19) : 9433-9442. doi: 10.1073/pnas.1821323116.

【0327】

癌

既知の癌遺伝子STAT5B (de Araujo, Erdogan ら、2019)、MCCC2 (Chen, Zhang ら、2021)、UBAP2L (Li, Wang ら、2018)、SMYD2 (Li, Zhou ら、2018)、YBX1 (Xu, Li ら、2017)、PTPN11 (Chan, Kalaitzidis ら、2008)、DIAPH3 (Rong, Gao ら、2020)、COPS3 (Zhang, Yan ら、2018)、SNX5 (Zhou, Huang ら、2020) 及び ZYG11A (Wang, Sun ら、2016) はすべて、フレーム外PEを含むことになる。したがって、これらのPEを含めると、NMDを介した発癌性mRNAの分解、又は非機能腫瘍タンパク質の生成が起こり、癌治療として包含SSOを活性化するSweet Spot SSOによる治療に適する。

Chan, G., ら、2008. Cancer Metastasis Rev 27 (2) : 179-192.

Chen, ら、2021. Cancer Cell Int 21 (1) : 22.

de Araujo, ED, ら、2019. Nat Commun 10 (1) : 2517.

Li, L. X., ら、2018. Cell Death Dis 9 (3) : 326.

Li, Q., ら、2018. Med Sci Monit 24 : 7109-7118.

Namour, F., ら、2012. Drugs R D 12 (3) : 141-163.

Rong, Y., ら、2020. J Cell Mol Med. doi: 10.1111/jcmm.16196

Wang, X., ら、2016. Oncotarget 7 (7) : 8029-8042.

Xu, L., ら、2018. J Exp Clin Cancer Res 37 (1) : 135.

Zhou, Q., ら、2020. Oncogene 39 (10) : 2140-2155.

【0328】

実施例9-HIF1A

研究の目的

低酸素誘導因子(HIF)は、酸素レベルが低下したとき、又は他の環境の変化に反応して活性化される転写因子である。HIF-1 α は、血管新生、すでに活性化している血管から新しい血管が形成される、細胞の侵襲性、転移、及び腫瘍環境への免疫抑制細胞の動員のシグナル伝達を促進することで、癌における腫瘍の進行に寄与する(Tatrai ら、2014)。これまでの研究では、HIF-1 α のノックダウンによって腫瘍量と癌細胞の移動を減らすことができ、また癌遺伝子の活性化は転移のリスクと高い相関関係にあるため、HIF-1 α は抗癌治療の標的となる可能性があることが示されている(Dai ら、2011)。

【0329】

材料と方法

分析パイプライン(図2)を使用して、公開されているRNA-seqデータを分析した。Panc-1細胞をRPMIで培養し、リポフェクタミンを使用して40nMのSSOでトランスフェクトした。24時間後、細胞を採取し、RNAを精製した。RT-PCRを実行し、得られた産物を2%のアガロースゲル上で視覚化した。Sweet Spot

t領域を標的とする最適なSSOを決定するために、PEの5'ssの下流の+9～+13の位置にあるSweet Spot領域を標的とする25nt長のSSOを採用していくつかのSSOを試験した。これは、+10（配列番号128）からのSSO標的化が、HIF1A転写物への偽エクソンの包含を媒介するのに優れていることを示した。低酸素実験では、トランスフェクトされたPanc-1又はU251細胞をまず常酸素状態で48時間培養し、その後24時間かけて低酸素チャンバーに移した。最適な+10SSOで細胞増殖、生存率、細胞毒性を測定するために、正常酸素状態と低酸素条件下の細胞に対してWST-1アッセイを実施した。タンパク質抽出のために、細胞溶解物は-80℃で急速凍結され、正常酸素条件での時間を制限した。タンパク質溶解物をベンゾナーゼ処理し、変性タンパク質を4～12%のNupage SDSゲルで分離し、対照としてHIF1α及びβ-アクチンに対する抗体を使用してウェスタンブロッティングで分析した。

【0330】

SSO:

すべてのSSOは、各糖部分に2'-O-メチル修飾を有する25nt長のホスホロチオエートRNAオリゴヌクレオチドであった（LGC Biosearch Technologies社製）。SSOは、その遺伝子のSweet Spot領域内の異なる位置を（偽エクソンの5'スプライス部位に対して）標的にして使用された。したがって、SSOはSweet Spot内で結合する。

【0331】

【表4】

表4

配列番号	遺伝子	SSO名	SSO配列5' → 3'
127	HIF1A	SSO +9	guccuucuaaaacuaagcuugaauu
128	HIF1A	SSO +10	aguccuucuaaaacuaagcuugaau
129	HIF1A	SSO +11	caguccuucuaaaacuaagcuugaa
130	HIF1A	SSO +12	ucaguccuucuaaaacuaagcuuga
131	HIF1A	SSO +13	uucaguccuucuaaaacuaagcuug

【0332】

結果:

解析パイプライン（図2）を使用して公開されているRNA-seqデータを解析し、HIF1Aのエクソン4と5の間に34ntの偽エクソン（chr14:61724198-61724230（+））を特定した。偽エクソンはフレームシフトを引き起こし、エクソン5に終止コドン（UAA）を導入する。Sweet Spot領域を標的とする最適なSSOを決定するために、PEの5'ssの下流の+9～+13の位置にあるSweet Spot領域を標的とする25nt長のSSOを使用していくつかのSSOを試験した。これは+10からのSSO標的化が、HIF1A転写物への偽エクソンの包含を媒介するのに優れていることを示した。U251神経膠芽腫細胞を+10SSOでトランスフェクトした結果、偽エクソンが最大60%包含された（図6A）。正常酸素条件下では、HIF-1αは水酸化によって分解されるため、SSOがタンパク質レベルに与える影響を調べるために、Panc-1細胞を低酸素状態に置き、タンパク質を抽出したところ、+10SSOによってHIF1Aタンパク質のレベルが効率的に低下することが示された（図6B）。低酸素条件下で増殖したU251細胞のWST-1アッセイでは、+10SSOで処理した場合の方がctrlSSOで処理した場合よりも低い生存率を有した（図6C）。

【0333】

結論

H I F 1 A の結合領域内の結合部位を最適化できることが観察できる。最も優れた S S O は「H I F 1 A + 1 0」（配列番号 1 2 8）であった。

【0334】

実施例 1 0 - T R P M 7

研究の目的

T R P M 7 は、膜を介した異なるイオンの移動を司るタンパク質スーパーファミリー T r a n s i e n t R e c e p t o r P o t e n t i a l (T R P) に属する。T R P タンパク質はセンサーやトランスデューサーとして機能し、活性化されるとイオンの膜貫通型の流れを引き起こし、関連する経路やさまざまな生理学的反応を制御する (L i u ら、2 0 1 4) 。T R P M 7 はカスパーゼによって切断され、キナーゼドメインが膜の孔から分離される。研究により、T R P M 7 は脳組織で高度に発現しており、このチャネルの調節異常は筋萎縮性側索硬化症 (A L S) 、パーキンソン病性認知症、及びアルツハイマー病などの神経変性疾患に関与することがわかっている。T R P M 7 は、C a 2 + 流入を媒介してカルシウム過負荷を引き起こし、酸化ストレス、一酸化窒素の産生、及び細胞死をもたらすことで、虚血の場合の神経細胞死に重要な役割を果たしていることが分かった (L e n g ら、2 0 1 5 ; S u n ら、2 0 0 9) 。T R P M 7 のノックダウンは、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、及び脳卒中患者に特徴的な神経細胞死の遅延を抑制する。これは、T R P M 7 のノックダウンが神経疾患に対する新たな治療法となる可能性があることを示唆する。T R P M 7 は、多形性神経膠芽腫 (G B M) 、網膜芽細胞腫、鼻咽頭癌、白血病、胃癌、前立腺癌、膵臓癌、乳癌、頭頸部癌など、いくつかの種類の癌においても重要な役割を果たし、膵臓癌細胞及び肺癌細胞で過剰発現する。最後に、T R P M 7 は糖尿病、腎臓病、及び炎症性疾患において役割を担う。

【0335】

材料と方法

公開されている R N A - s e q データを分析するために、分析パイプライン (図 2) を使用した。H e L a 細胞及び U 2 5 1 細胞を R P M I で培養し、L i p o f e c t a m i n e を使用して 2 0 n M 又は 4 0 n M の S S O でトランスフェクトした。2 4 時間後、細胞を採取し、R N A を精製した。R T - P C R を実行し、得られた産物を 2 % のアガロースゲル上で可視化した。I n c u C y t e 実験では、U 2 5 1 細胞を 2 0 n M 及び 4 0 n M の S S O でトランスフェクトした 9 6 ウェルプレートで増殖させ、I n c u C y t e 装置でインキュベートして 4 時間ごとに画像を撮影した。P E の 5 ' s s の下流の + 9 ~ + 1 3 の位置までの S w e e t S p o t 領域を標的とする 2 5 n t 長の S S O を使用して、小規模な S S O ウォークが実行された。

【0336】

S S O :

すべての S S O は、各糖部分に 2 ' - O - メチル修飾を有する 2 5 n t 長のホスホロチオエート R N A オリゴヌクレオチドであった (L G C B i o s e a r c h T e c h n o l o g i e s 社製) 。S S O は、その遺伝子の S w e e t S p o t 領域内の異なる位置を (偽エクソンの 5 ' スプライス部位に対して) 標的にして使用された。したがって、S S O は S w e e t S p o t 内で結合する (表 5 を参照のこと) 。

【0337】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5 :

配列番号	遺伝子	SSO 名	SSO 配列 5' → 3'
132	TRPM7	SSO +9	uucugacuucugcauauacuaaaga
133	TRPM7	SSO +10	uuucugacuucugcauauacuaaag
134	TRPM7	SSO +11	cuuucugacuucugcauauacuaaaa
135	TRPM7	SSO +12	acuuucugacuucugcauauacuaa
136	TRPM7	SSO +13	gacuuucugacuucugcauauacua

10

【0338】

結果:

解析パイプライン (図 2) を使用して、TRPM7 のエクソン 27 と 28 の間に位置する 60 nt の偽エクソン (chr15:50588192-50588250 (-)) を特定した。偽エクソンにより、TRPM7 タンパク質のチャネルドメインとキナーゼドメインの間の切断部位の領域に 20 個のアミノ酸が導入される。Sweet Spot 領域を標的とする最適な SSO を決定するために、PE の 5' ss の下流の +9 ~ +13 の位置にある Sweet Spot 領域を標的とするいくつかの 25 nt 長の SSO を試験した (図 5 A 及び B)。このことは、+13 からの SSO 標的化が、TRPM7 転写物への偽エクソンの包含を媒介するのに優れていることを示した。最適な +13 標的化 SSO で HeLa 細胞又は U251 神経膠芽腫細胞をトランスフェクションすると、偽エクソンが多く含まれ、癌細胞の成長及び増殖が減少した (図 5 C)。

20

【0339】

結論

TRPM7 タンパク質の正常な発現は、+13 の位置から結合し、高レベルの偽エクソンの包含を媒介する SSO を使用することによって最も効率的に減少する。

30

【0340】

参考文献:

Tatrai E, ら、Oncotarget 2017, 8:44498-44510.

Dai Y, ら、International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics 2011, 81:521-528.

40

Liu M, ら、Cell Signal 2014, 26:2773-2781.

Leng TD, ら、CNS Neurosci Ther 2015, 21:252-261.

Sun HS, ら、Nat Neurosci 2009, 12:1300-1307.

【0341】

実施例 11 - 実験的に検証された更に関連する標的

以下の Sweet Spot 配列は、本発明に記載の基準を使用して疾患関連遺伝子において特定され (例えば、実施例 2 を参照のこと)、機能試験によって、成熟 mRNA への偽エクソンの組み込みを可能にする、SSO の標的であることが実証された。

【0342】

50

材料と方法

公開されているRNAシーケンシングデータ（Geuvadis、EMTAB-2836、EMTAB-513、GSE52946、及びGSE124439）を使用し、アダプター汚染と低品質の塩基をbbdukでトリミングした後、STARでマッピングした。HeLa細胞を12ウェルプレートに播種し、Lipofectamine RN AiMAX（Invitrogen社）を使用して、完全なホスホロチオエート骨格を有する20又は40nMの2'-O-メチルSSOを60%のコンフルエンスでフォワードトランスフェクトした。非結合性ctrl SSO（5' GCUCAAUAUGC UACUGCCAUGC UUG3'）（配列番号126）を対照として使用した。48時間後、Trizol（Invitrogen社）とクロロホルムを使用してRNAを単離し、次にイソプロパノールで沈殿させた。相補DNA（cDNA）は、高容量のcDNAキット（Applied Biosystems社）を使用して500ngのRNAから合成された。プライマーは、目的の偽エクソンに隣接する隣り合うエクソンの少なくとも1つのエクソン間接合部をカバーするように設計された。PCRは、TEMPase Hot Start DNAポリメラーゼ（アンプリコン）と反応あたり1µlのcDNAを使用して実行された。各プライマーは0.5pmol/µl使用した。PCR産物は2%のSeakem LE（Lonza社）TBEアガロースゲルで80Vで1時間かけて分離された。

10

【0343】

Sweet Spot領域は、偽エクソンの5' スプライス部位の+9～+39に位置する。

20

【0344】

すべてのSSOは、各糖部分に2'-O-メチル修飾を有する25nt長のホスホロチオエートRNAオリゴヌクレオチドであった（LGC Biosearch Technologies社製）。SSOは、その遺伝子のSweet Spot領域内の位置+11～+35（偽エクソンの5' スプライス部位に対して）を標的にして使用された。したがって、SSOはスイートスポット内で結合する。

【0345】

結果

二重接合方法を使用して、更に46個の完全にスプライスされた偽エクソンを特定し、RNAシーケンシングデータで特定された選択された偽エクソンの+11～+35下流のSweet Spot領域を標的とするSSOを試験した（表6）。これら選択された46個のSSOはすべて、標的遺伝子のmRNA 転写物への偽エクソンの包含を増加させることができた（以下の表6）。

30

【0346】

表6： 46個の偽エクソンは基準のすべてに一致し、Sweet Spot領域に位置するSSOによっていずれも活性化される。Sweet Spot領域はゲノム配列（DNA）によってアノテーションが付けられる。

【0347】

40

【表 6 A】

表 6 : Sweet Spot 配列を標的とする S S O に応答して機能的に検証された標的

SSO 配列番号	遺伝子	hg38 偽エクソン座標	Sweet Spot 配列 (+9 ~ +39)
79*	ROCK1	chr18:21017021-21017098 (-)	CTGTGAAGGCCGTGAGGTAAGAGACCTTGAC
80*	ROCK1	chr18:21022445-21022564 (-)	GGAATGGGGGAAATGGAGAATAACCAGTATA
81*	OGA	chr10:101795365-101795480 (-)	AAGGGCGGTAGACATGAAGTGAAGTCACGTT
82*	OGA	chr10:101795374-101795480 (-)	GGTAGATTTAAGGGCGGTAGACATGAAGTGA
83*	TMEM97	chr17:28320422-28320470 (+)	CGTGTAGCAAGTTGCAGTCTGGGGACTTGGT
85*	SLC7A11	chr4:138191360-138191415 (-)	TAGATTAGACATCAGTGGTATTGAAATTTAA
87*	MAPKAPK5	chr12:111870683-111870782 (+)	CTTATAGAGTGAAGGGTCCCTAGGCCAAGAC
90*	MCCC2	chr5:71642612-71642727 (+)	CAGTGCCATTTAGGATGTACTGCATAAGTTT
91*	MCCC2	chr5:71642664-71642727 (+)	CAGTGCCATTTAGGATGTACTGCATAAGTTT
93*	DIAPH3	chr13:59923001-59923041 (-)	TAGCATTAACAGTATAGGTAGGGAATCTGGT
94*	DIAPH3	chr13:59923001-59923111 (-)	TAGCATTAACAGTATAGGTAGGGAATCTGGT
99*	PTPN11	chr12:112456115-112456268 (+)	TCAATGGATGTGCTAGCCGCTCCATTTGGCT
100*	UBAP2L	chr1:154241700-154241797 (+)	AATATCTGATTGTCGGATTTATCCCAGGAAG
105*	LRIG2	chr1:113116745-113116798 (+)	TCAGTAAAGTTTAAAGGGTAGCTAGGAGCCA
106*	RNF115	chr1:145784178-145784251 (-)	CAGGCCAGGATAAGTTGTGCGAAGTCACAATG
107*	HGS	chr17:81684813-81684891 (+)	GTGCTTCAGGGATGAATCCAGAGGTAACTA
110*	HMGCS1	chr5:43297529-43297673 (-)	TGTCATCCCCACTTTACAGAGAAGTGGGTAA
111*	SND1	chr7:127725671-127725726 (+)	GCCTTTTCCAAACCAAGAACAAGCGGGAG
114*	KNTC1	chr12:122595478-122595600 (+)	AGGACTATAGGCTGCGCATAGCTCGAAGGAG
117*	THOC2	chrX:123706588-123706704 (-)	GTAGGGAGAAAAAAAAAGCCTGTGCTGTAA
118*	SMC1A	chrX:53402287-53402379 (-)	GATGAACACAACACAGTCTTTGCTGAAGGAG

10

20

30

40

【 0 3 4 8 】

50

【表 6 B】

122*	PHLPP1	chr18:62885960- 62886035 (+)	ACTAGTAGATCACACCCCTAGATAGTTTAGC
123*	AURKA	chr20:56390967- 56391068 (-)	AATTGGAGCAAATGCCTGTAGCTTCTGTCAG
137	ATXN7	chr3:63921276- 63921329 (+)	TTTAACCAGTGGTCCCCAGGCTTATATTTTC
138	DDR2	chr1:162666267- 162666368 (+)	TTGTGGAATGAATGAATGAGCAAATGAAAGGA
139	HIF1A	chr14:61724148- 61724230 (+)	AATTCAGCTTAGTTTATGAAGGACTGAACA
140	IIT	chr4:3223670- 3223729 (+)	GAAAGCTGGAACGTGACAGGAAGTACGTGG
141	LRRK2	chr12:40362438- 40362491 (+)	AAAATACATTGTCCTCATCCTTATGAAATTA
142	LRRK2	chr12:40362410- 40362491 (+)	AAAATACATTGTCCTCATCCTTATGAAATTA
143	RAP1GDS1	chr4:98419239- 98419331 (+)	TACTGCACCAGGCCTTAGGCATCTTTAGTTG
144	TTBK2	chr15:42809105- 42809208 (-)	TGGGTGTGTTCTAATGACTAGTATCAATGTG
145	TTK	chr6:80034193- 80034275 (+)	CCATAAACTAACAAATCACAACTCTGACAC
146	BUD31	chr7:99419162- 99419275 (+)	CTATATGGCATGGTGGCAGGTCCTTCGTGGG
147	CD44	chr11:35188146- 35188238 (+)	TTGTCCCTGACCTGTGCCTTGCAATAGGAAG
148	CDKL5	chrX:18623879- 18624001 (+)	TTTATGTATGGTAGCCCTGAAAAGTCTCC
149	ITGBL1	chr13:101705140- 101705240 (+)	GTGGTATAACCCAGGGAAAATCTCTCTTATT
150	LRP6	chr12:12149294- 12149360 (-)	AAGAAATACTCCTTAAGACTTGAGAGAGCCT
151	MELK	chr9:36654164- 36654224 (+)	AGAAAGCTATTAGATACGTATACCTCTATGC
152	PDE4D	chr5:59036523- 59036587 (-)	TGCCACACCTTCAGTCTGAACTGGAAATGTG
153	PMPCB	chr7:103305205- 103305273 (+)	AGAAGGTTTCCTTGAGGTCATGTTGAAGCC
154	RBPJ	chr4:26388182- 26388277 (+)	CACGGTGGCCAGCCTAAACAGTTATTATAT
155	ROCK2	chr2:11198121- 11198215 (-)	CTAGATACTCTTCACTGTGTTGCACATAGA
156	TASP1	chr20:13415123- 13415262 (-)	GCATCTTAAATATTTAAATTTTAAAACTA

10

20

30

40

【 0 3 4 9 】

50

【表 6 C】

157	ATP5F1C	chr10:7805451-7805532(+)	ATTGAGACCATCCTGGCTAACTCGGTGAAAC
158	LRRK2	chr12:40362438-40362491(+)	AAAATACATTGTCCTCATCTTTATGAAATTA
159	LRRK2	chr12:40362410-40362491(+)	AAAATACATTGTCCTCATCTTTATGAAATTA

*表 3 にも含まれる。
下線は、試験済みの S S O の結合配列を示す。結合は対応する p r e - m R N A に対して行われる。h g 3 8 ゲノム座標は G F F / G F T 形式に従う。開始座標と終了座標は 1 b a s e から始まる。

10

【 0 3 5 0 】

表 6 では、配列番号 1 4 1 及び 1 4 2 の S w e e t S p o t は r s 1 7 4 4 4 2 0 2 の主要な対立遺伝子 (C) に対応する。配列番号 1 5 8 及び 1 5 9 の S w e e t S p o t は、 r s 1 7 4 4 4 2 0 2 のマイナー対立遺伝子 (T) に対応する。

【 0 3 5 1 】

表 7 の配列番号 1 6 0 ~ 1 8 0 は、更に、 S w e e t S p o t を標的とする S S O に
よって少なくとも 1 つの他の偽エクソンがすでに活性化されている遺伝子 (表 1 及び表 6
に列挙される遺伝子) の偽エクソンである。表 7 の配列番号 1 8 1 ~ 2 0 1 は、本発明に
記載の基準を使用して特定された追加の S w e e t S p o t 配列である (例えば、実施
例 2 を参照のこと) 。したがって、これらの標的は、 S S O の機能標的となる可能性が非
常に高く、成熟 m R N A に偽エクソンを組み込むことが可能になる。

20

【 0 3 5 2 】

30

40

50

【表 7 A】

表 7 : 関連する標的偽エクソン

SSO 配列 番号	遺伝子	hg3 座標	Sweet Spot 配列
160	RNF115	chr1:145794074- 145794196(-)	<u>TTCCGAGACCAGCCTGGCCATCGTGCCGAAAC</u>
161	RNF115	chr1:145784113- 145784251(-)	<u>TTCCAGGGCTTACCTCTAGTCAACACAGTAG</u>
162	RNF115	chr1:145780773- 145780881(-)	<u>AAGAGGGCAGGGTGCTCTGAGCTGATTATA</u>
163	RNF115	chr1:145759389- 145759535(-)	<u>GGAGGAAAATATTTAAGAGTTCATTTCAGTTT</u>
164	LRP6	chr12:12184211- 12184244(-)	<u>TTTGGCTTATCACAGTTGTTTCATGTTATGGT</u>
165	LRP6	chr12:12212260- 12212305(-)	<u>AGACCATTATTAAATATTTGAGTGCTGACTG</u>
166	LRP6	chr12:12197784- 12197878(-)	<u>CACCATGCCTGGCCATAAATTTAATTCTTAT</u>
167	UBAP2L	chr1:154249958- 154250030(+)	<u>TCACTTAATGTCATTGATAGGTTCTTGCGAC</u>
168	UBAP2L	chr1:154249997- 154250030(+)	<u>TCACTTAATGTCATTGATAGGTTCTTGCGAC</u>
169	UBAP2L	chr1:154222819- 154222986(+)	<u>CAAGATTCTTCATCTCCAGTGTGATAGCTGG</u>
170	UBAP2L	chr1:154241738- 154241797(+)	<u>AATATCTGATTGTCGGATTATCCCAGGAAG</u>
171	UBAP2L	chr1:154262173- 154262202(+)	<u>GACCATACTTAATAGAGTGGGAATTGGACTG</u>
172	ZNF558	chr19:8831564- 8831582(-)	<u>AGTCATGGCCACAGGCTGGGCCCTTATTAC</u>
173	ZNF558	chr19:8831564- 8831647(-)	<u>AGTCATGGCCACAGGCTGGGCCCTTATTAC</u>

【 0 3 5 3 】

10

20

30

40

50

【表 7 B】

174	ZNF558	chr19:8831564- 8831642 (-)	AGTCATGGCCACAGGCTGGGCCCTTATTAC
175	KNTC1	chr12:122585408- 122585420 (+)	ATGAGGCCACTTCTCTGTTCCAGTCACTTGA
176	KNTC1	chr12:122564657- 122564756 (+)	CCCAGTGCTCATTCTTTAACACAAATATTT
177	KNTC1	chr12:122621236- 122621288 (+)	ACCAGTAGATAGAGATCTACATAAATGAACA
178	KNTC1	chr12:122620698- 122620759 (+)	GAAAGATAGATTAAGGTCCAGCTGAGGGCTG
179	KNTC1	chr12:122554273- 122554359 (+)	CACCATACCCAGCAAGAATAATTCTGTGTAT
180	KNTC1	chr12:122528435- 122528583 (+)	AACTAAATTAGTCCCTTGGTATTGGTATCCA
181	SMC1A	chrX:53404716- 53404804 (-)	TTGGAGACCAGCCTGGCCAAACCTGTCTCTA
182	SMC1A	chrX:53407427- 53407474 (-)	GAAGAGATGTGAAGCTTCCATGCCCAATCTG
183	SMC1A	chrX:53407371- 53407474 (-)	ACACAGGGGCTTCATTATGTAGTCATGATTG
184	FLT1	chr13:28337518- 28337637 (-)	CTCTGATTGATTAAACGTGGGAGCAAGGAGGC
185	FLT1	chr13:28414636- 28414760 (-)	CTCTCGATGAAATCAGATAATAAACTGACAA
186	FLT1	chr13:28435084- 28435140 (-)	TGAGTTAATGTTATGAATCTTGGAGGACCTG
187	FLT1	chr13:28435084- 28435205 (-)	TGAGTTAATGTTATGAATCTTGGAGGACCTG
188	EFEMP1	chr2:55870349- 55870498 (-)	CACTAATCATTGATGGTTAATTAATTATACA
189	CLCN1	chr7:143319065- 143319127 (+)	TAAAGGAAAGAGGTTAATGGGCCACAGTT

10

20

30

40

【 0 3 5 4 】

50

【表 7 C】

190	CD5L	chr1:157836389- 157836492 (-)	CTAATTATCTAGCTGTGGGAAGAAGTAGATG
191	A2M	chr12:9072149- 9072182 (-)	AAGTAGAGTTTCTTGACAGGGTACCATTAAAG
192	MAOB	chrX:43778486- 43778558 (-)	TTCCCTCAATAACAACCTAAGTAAATATTACC
193	MAOB	chrX:43837770- 43837923 (-)	ACTTGCAATATGCTGTGGTTTAGGTGATGCT
194	HSP90AA1	chr14:102117585- 102117727 (-)	CACAGGAACCTTATTCCTCACTGGGTAGAAAAC
195	ALK	chr2:29253737- 29253814 (-)	TTTCTGCAGCTGGGGGGTGTTCAGCTCCTAG
196	JPH3	chr16:87695507- 87695657 (+)	AGCCTGGGTCTGCAGAACAGGTTTCAAGGAA
197	IINF1B	chr17:37711993- 37712084 (-)	TCTGTAGGGCAGCACCCACCCCTGCCGTCCT
198	P2RX7	chr12:121149278- 121149369 (+)	TAAAGGAAAGAGGTTTAATGGGCCCACAGTT
199	P2RX7	chr12:121175867- 121175980 (+)	CAGCACCTTCGATCTGACCAGTTTAGCAACC
200	DBI	chr2:119369029- 119369176 (+)	TACAGTGAGTTCGTAAACTCTGTCCTTCCAG
201	DBI	chr2:119371982- 119372085 (+)	GATACTGTCTCCTGTAATTAGTAGAATCTCA

下線は、試験済みの S S O の結合配列を示す。結合は対応する p r e - m R N A に対して行われる。h g 3 8 ゲノム座標は G F F / G F T 形式に従う。開始座標と終了座標は 1 b a s e から始まる。

【 0 3 5 5 】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8：SMAD2 及び LRRK2 を標的とする SS0

配列番号	遺伝子	SS0 名	SS0 配列 5' → 3'
202	SMAD2	SMAD2SS0+9	UCUCGCUUAGCUUCAACAACUAAGAC
203	SMAD2	SMAD2SS0+10	AUCUCGCUUAGCUUCAACAACUAAGA
204	SMAD2	SMAD2SS0+11	CAUCUCGCUUAGCUUCAACAACUAAG
205	SMAD2	SMAD2SS0+12	GCAUCUCGCUUAGCUUCAACAACUAA
206	SMAD2	SMAD2SS0+13	UGCAUCUCGCUUAGCUUCAACAACUA
207	SMAD2	SMAD2SS0+14	CUGCAUCUCGCUUAGCUUCAACAACU
208	LRRK2	LRRK2SS0+11	UUCAUAAAGACGAGGACAAUGUAUU
209	LRRK2	LRRK11CSSOC	UUCAUAAGGACGAGGACAAUGUAUU
210	LRRK2	LRRK11CSSOT	UUCAUAAAGACGAGGACAAUGUAUU
211	LRRK2	LRRK9CSSOC	CAUAAGGACGAGGACAAUGUAUUUU
212	LRRK2	LRRK9CSSOT	CAUAAAGACGAGGACAAUGUAUUUU
213	LRRK2	LRRK13CSSOC	AUUUCAUAAGGACGAGGACAAUGUA
214	LRRK2	LRRK13CSSOT	AUUUCAUAAAGACGAGGACAAUGUA
215	LRRK2	LRRK11SSOC	UUCAUAAGGAUGAGGACAAUGUAUU
216	LRRK2	LRRK11SSOT	UUCAUAAAGAUGAGGACAAUGUAUU

【0356】

実施例 12－RNF115

RNF115 (Ring Finger Protein 115) は、以前は Breast Cancer Associated 2 (BCA2) と呼ばれ、基質のポリユビキチン化を媒介すRING-finger E3ユビキチンである。RNF115は、乳癌において腫瘍抑制因子p21のユビキチン化及びプロテアソーム分解を引き起こす (Wangら、2013)。肺癌では、RNF115は大腸腺腫 (APC) のユビキチン化を介してWnt/β-カテニン経路を制御し、増殖を増加させる癌遺伝子としても機能する (Wuら、2021)。

【0357】

RNF115は乳癌に関連する。RNF115は、浸潤性乳癌の50%以上で過剰発現し、そのアップレギュレーションはエストロゲン受容体陽性 (ER+) 状態及び予後不良と相関する。

【0358】

したがって、RNF115の活性を阻害すると、β-カテニンが阻害され、肺癌及び乳癌などの癌を抑制するように機能する。

【0359】

我々は、インシリコ解析と生体内での実験を通じて、RNF115遺伝子の発現をダウ

ンレギュレーションするために使用できる RNF115 遺伝子の偽エクソンの存在を調査することを目的とした。

【0360】

材料と方法

GEUVADIS コンソーシアムから公開されている RNA-seq データ、EMTAB-2836、EMTAB-513、GSE52946 及び GSE124439 の完全にスプライスされた偽エクソンを有する断片を特定するために、新しい二重接合アプローチを使用した。HeLa 細胞及び NCI-H23 肺癌細胞を 12 ウェルプレートに播種し、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen 社) を使用して 5 nM、10 nM、又は 20 nM の SSO で 60 % のコンフルエンスでフォワードトランスフェクトした。

10

【0361】

SSO (配列番号 106 を標的とする、特定の標的配列は、表 3 及び表 6 の配列番号 106 に下線で引かれている) は、各糖部分に 2'-O-メチル修飾を有する 25 nt 長のホスホロチオエート RNA オリゴヌクレオチドであった (LGC Biosearch Technologies 社製)。SSO は、RNF115 遺伝子の Sweet Spot 領域内の位置 +11 ~ +35 (偽エクソンの 5' スプライス部位に対して) に相補的である。したがって、SSO は Sweet Spot 内で結合する。

【0362】

同様の修飾を有する非結合 SSO (5' GCUCAAUAUGCUCACUGCC AUGCUUG3') (配列番号: 126 を陰性対照として使用した。48 時間後、Trizol (Invitrogen 社) とクロロホルムを使用して RNA を単離し、次にイソプロパノールで沈殿させた。相補 DNA (cDNA) は、高容量の cDNA キット (Applied Biosystems 社) を使用して 500 ng の RNA から合成された。プライマーは、目的の偽エクソンに隣接する隣り合うエクソンの少なくとも 1 つのエクソン間接合部をカバーするように設計された。PCR は、Tempase Hot Start DNA ポリメラーゼ (アンブリコン) と反応あたり 1 µl の cDNA を使用して実行された。各プライマーは 0.5 pmol / µl 使用した。PCR 産物は 2 % の Seakem LE (Lonza 社) TBE アガロースゲルで 80 V で 1 時間かけて分離された。72 時間後にウェスタンブロッティングのためにタンパク質を採取し、変性したタンパク質を 4 ~ 12 % の NuPAGE SDS ゲルで分離した。ウェスタンブロット分析は、RNF115 (ab187642、Abcam 社)、β-カテニン (#9587、Cell Signaling Technology 社)、対照のための β-アクチン (ab8229、Abcam 社) に対する抗体を使用して実施した。

20

30

【0363】

最適な +11 SSO による細胞増殖、生存率、細胞毒性を測定するために、NCI-H23 細胞を濃度勾配で SSO で逆トランスフェクトし、トランスフェクション後 48 時間で細胞に対して WST-1 アッセイ (Roche 社) を実施した。

【0364】

結果

完全にスプライスされた偽エクソンを有する断片を調べるために二重接合アプローチを使用し、RNF115 遺伝子のイントロン 3 内に偽エクソンを特定した。

40

【0365】

chr1:145784178-145784251 RNF115 偽エクソンを包含すると、mRNA のエクソン 3 と 4 の間に 74 bp が導入される。これにより、リーディングフレームのシフトが発生し、未成熟終止コドンが生成され、NMD システムによる分解が起こる。また、機能ドメインを欠いた大幅に切断されたタンパク質 (わずか 84 個のアミノ酸) の生成にもつながる。この切断されたタンパク質は基質に結合することによってデコイとして機能し、ポリユビキチン化を阻害し、癌を抑制するように機能する可能性がある (表 3 及び表 6)。

50

【0366】

NCI-H23 癌細胞を 5' スプライス部位の下流の +11 ~ +35 の位置に相補的な SSO (配列番号 106) でトランスフェクションした結果、偽エクソンの包含が最大 90% 以上になった (図 7A)。

【0367】

NCI-H23 癌細胞の増殖は、WST-1 アッセイによって示されるように、SSO を介したダウンレギュレーションによる治療によって阻害される (図 7B)。更に、ウェスタンブロットティングで示されるように、NCI-H23 肺癌細胞の処置後、RNF115 タンパク質レベルは大幅に減少する (図 7C)。機能的 RNF115 のレベルの低下は、ウェスタンブロットティングによって示されるように β -カテニンのレベルの低下を引き起こした (図 7C)。

10

【0368】

結論

RNF115 遺伝子産物の正常な発現が特定の SSO を使用して少なくとも 90% 減少して、偽エクソンの包含が増加し、正常な遺伝子産物の機能が破壊される。これにより、 β -アクチンの発現及び RNF115 偽エクソンの SSO ベースの活性化を示す肺癌細胞の増殖が癌を抑制するように働く。

【0369】

同様に、chr1:145794075-145794196 RNF115 偽エクソンの包含によって、mRNA のエクソン 1 と 2 の間に 122 bp が導入される。これにより、リーディングフレームのシフトが発生し、未成熟終止コドンが生成され、NMD システムによる分解が起こる。また、機能ドメインを欠いた大幅に切断されたタンパク質の生成にもつながる。この切断されたタンパク質は、基質に結合することによってデコイとして機能し、ポリユビキチン化を阻害して癌を抑制するように機能する可能性がある (表 7)。

20

【0370】

同様に、chr1:145784114-145784251 RNF115 偽エクソンの包含によって、mRNA のエクソン 3 と 4 の間に 138 bp が導入される。これにより、グルタミン酸 73 のわずか 12 コドン下流に未成熟終止コドンが生じ、NMD システムによる分解が起こる。また、機能ドメインを欠いた大幅に切断されたタンパク質 (わずか 84 個のアミノ酸) の生成にもつながる。この切断されたタンパク質は、基質に結合することによってデコイとして機能し、ポリユビキチン化を阻害して癌を抑制するように機能する可能性がある (表 7)。

30

【0371】

同様に、chr1:145780774-145780881 RNF115 偽エクソンの包含によって、mRNA のエクソン 3 と 4 の間に 108 bp が導入される。これにより、グルタミン酸 73 のわずか 24 コドン下流に未成熟終止コドンが生じ、NMD システムによる分解が起こる。また、機能ドメインを欠いた、大幅に切断されたタンパク質 (わずか 96 個のアミノ酸) の生成にもつながる。この切断されたタンパク質は基質に結合することによってデコイとして機能し、ポリユビキチン化を阻害し、癌を抑制するように機能する可能性がある (表 7)。

40

【0372】

同様に、chr1:145759390-145759535 RNF115 偽エクソンの包含によって、mRNA のエクソン 4 と 5 の間に 146 bp が導入される。これにより、グリシン 143 の後に読み取りフレームシフトが発生し、94 コドン下流に未成熟終止コドンが生じ、NMD システムによる分解が起こる。また、機能ドメインを欠いた、大幅に切断されたタンパク質 (226 個のアミノ酸) の生成にもつながる。この切断されたタンパク質は、基質に結合することによってデコイとして機能し、ポリユビキチン化を阻害して癌を抑制するように機能する可能性がある (表 7)。

【0373】

50

Wang Z, Nie Z, Chen W, Zhou Z, Kong Q, Seth AK, ら (2013) RNF115/BCA2 E3 ubiquitin ligase promotes breast cancer cell proliferation through targeting p21Waf1/Cip1 for ubiquitin-mediated degradation. *Neoplasia*. 15 (9) : 1028-35.

【0374】

Wu XT, Wang YH, Cai XY, Dong Y, Cui Q, Zhou YN, Yang XW, Lu WF, Zhang M. (2021) RNF115 promotes lung adenocarcinoma through Wnt/ β -catenin pathway activation by mediating APC ubiquitination. *Cancer Metab.* 9 (1) : 7.

10

【0375】

実施例13-LRRK2

研究の目的

パーキンソン病は、運動制御に影響を及ぼすドーパミン作動性ニューロンの喪失を特徴とする進行性の神経変性疾患である。ロイシンリッチリピートキナーゼ2 (LRRK2) 遺伝子の変異は、パーキンソン病に関連する一般的な危険因子の原因となる (Alessi & Sammler, 2018)。LRRK2の優性遺伝性及び散発性の病原性変異は、LRRK2キナーゼの過剰活性化を引き起こし、LRRK2遺伝子発現のダウンレギュレーションは潜在的な治療戦略である。

20

【0376】

材料と方法

解析パイプライン (図2) を使用して、公開されているRNA-seqデータ内で完全にスプライスされた偽エクソンを有する断片を特定した。HeLa細胞及びU251細胞を、Lipofectamine RNAiMAX (invitrogen社) を使用して、20nMのSSOでリバーストランスフェクトした (配列番号141及び配列番号142を標的とし、特定の標的配列には、表6の配列番号141及び配列番号142に下線が引かれている)。非標的SSO (5'-GCUCAUAUGCUACUGCCCAUGCUUG-3') (配列番号126) を陰性対照として使用した。細胞は48時間後にTrizol (Invitrogen社) を使用して収集され、クロロホルム及びイソプロパノールを使用してRNAが抽出された。相補DNA (cDNA) は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems社) を使用して合成され、TEMPase Hot Start DNA Polymerase (Ampliqon社) を使用してLRRK2エクソン47及び48のプライマーでPCRが実行された。PCR産物は1.5%のSeaKem LE (Lonza) TBEアガロースゲルで分離された。

30

【0377】

結果

分析パイプライン (図2) を使用して、Sweet Spotを標的とするSSOによって活性化できる2つのLRRK2偽エクソンを特定した。2つの偽エクソン、chr12:40362438-40362491 (+) 及びchr12:40362410-40362491 (+) はイントロン47内に位置し、同じ5'スプライス部位を有する。HeLa細胞及びU251細胞を、5'スプライス部位 (配列番号215) の下流の+11~+35の位置に相補的なSSOでトランスフェクトした結果、LRRK2mRNA転写物のエクソン47と48の間にある両方の偽エクソンの包含が増加した (図9)。chr12:40362438-40362491 (+) LRRK2偽エクソンは54ntの長さで、偽エクソンを包含すると、翻訳されたLRRK2タンパク質のWD40ドメインに18個のアミノ酸が導入される。chr12:40362410-40362491 (+) LRRK2偽エクソンは82ntの長さで、偽エクソンを包含すると、フレームシ

40

50

フトと未成熟終止コドンの挿入が起こり、ナンセンス変異依存mRNA分解機構による分解のために転写物が標的となる。

【0378】

驚いたことに、特定されたSweet Spot配列はSNP、rs17444202を保持していた。したがって、rs17444202のメジャー対立遺伝子に対応する配列番号141及び142のいずれかを標的とするSSO、又はrs17444202のマイナー対立遺伝子に対応する配列番号158及び159を標的とするSSOを使用した（実施例11の表6を参照のこと）。更に、メジャー対立遺伝子又はマイナー対立遺伝子のいずれかを優先的に標的とするために、追加のミスマッチを有するSSOを使用した。すべてのSSOは、chr12:40362438-40362491(+)LRRK2偽エクソン及びchr12:40362410-40362491(+)LRRK2偽エクソンの挿入を誘導した（結果は示していない）。使用されたSSOの配列は、実施例11の表8に配列番号208～216と共に列挙される。

10

【0379】

結論

Sweet Spotを標的とする特定のSSOを使用することによってLRRK2の正常機能と過剰活性化機能が低下して、偽エクソンの包含を誘導し、それによって正常なLRRK2遺伝子産物の発現と活性が低下する。翻訳された配列にアミノ酸を導入する偽エクソンの挿入は、タンパク質機能の破壊によって潜在的に遺伝子発現を低下させる、又は正常なタンパク質機能を改変する。未成熟終止コドンの挿入でフレームシフトを引き起こす偽エクソンの包含は、転写物の分解又は切断された非機能的タンパク質の翻訳によって遺伝子発現を減少させる。

20

【0380】

理論に縛られることなく、Sweet Spot領域のSNPを特定することによって、SSOを選択して治療を開始する前に対象のSNPの状態をスクリーニングすることによって、対立遺伝子特異的標的化（又は少なくとも対立遺伝子を好む標的化）を行うことができる。

参考文献：Alessi, D. R. & Sammler E (2018) Science, 360 (6384): 36-37. DOI: 10.1126/science.aar5683

30

【0381】

実施例14-LRP6

LRP6 (LDL受容体関連タンパク質6) は、低密度リポタンパク質 (LDL) 受容体遺伝子ファミリーのメンバーである。LRP6は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達カスケードにおけるWntの受容体及び共受容体として機能し、細胞の分化、増殖、及び移動の制御の役割を果たす。また、グルコース及び脂質代謝シグナル伝達にも関与する。LRP6の阻害は、乳癌、肝臓癌、大腸癌などの癌、並びに代謝性疾患や神経変性疾患の治療選択肢となり得る (Jeong and Jho 2021によりレビューされた)。

【0382】

chr12:12149294-12149360(-)LRP6偽エクソンを包含すると、mRNAのエクソン13と14の間に67bpが導入される。これにより、リーディングフレームのシフトが発生し、未成熟終止コドンが生成され、NMDシステムによる分解が起こる。また、膜貫通ドメインと細胞質ドメインを欠いた大幅に切断されたタンパク質（わずか1006個のアミノ酸）の生成にもつながる。この切断されたタンパク質は、Wntタンパク質のデコイ受容体として機能し、それによってWntシグナル伝達を阻害し、癌やその他の疾患を抑制するように機能する可能性がある。（表6-機能的に検証済み）

40

【0383】

同様に、chr12:12184211-12184244(-)LRP6偽エクソンを包含すると、mRNAのエクソン4と5の間に34bpが導入される。これにより、リ

50

ーディングフレームのシフトが発生し、未成熟終止コドンが生成され、NMDシステムによる分解が起こる。また、膜貫通ドメインと細胞質ドメインが欠いた大幅に切断されたタンパク質の生成にもつながる。この切断されたタンパク質は、Wntタンパク質のデコイ受容体として機能し、それによってWntシグナル伝達を阻害し、癌やその他の疾患を抑制するように機能する可能性がある（表7）。

【0384】

同様に、chr12:12212260-12212305（-）LRP6偽エクソンを包含すると、mRNAのエクソン1と2の間に46bpが導入される。これにより、リーディングフレームのシフトが発生し、未成熟終止コドンが生成され、NMDシステムによる分解が起こる。また、膜貫通ドメインと細胞質ドメインが欠いた大幅に切断されたタンパク質の生成にもつながる。この切断されたタンパク質は、Wntタンパク質のデコイ受容体として機能し、それによってWntシグナル伝達を阻害し、癌やその他の疾患を抑制するように機能する可能性がある（表7）。

【0385】

同様に、chr12:12197784-12197878（-）LRP6偽エクソンを包含すると、mRNAのエクソン3と4の間に95bpが導入される。これにより、リーディングフレームのシフトが発生し、未成熟終止コドンが生成され、NMDシステムによる分解が起こる。また、膜貫通ドメインと細胞質ドメインが欠いた大幅に切断されたタンパク質の生成にもつながる。この切断されたタンパク質は、Wntタンパク質のデコイ受容体として機能し、それによってWntシグナル伝達を阻害し、癌やその他の疾患を抑制するように機能する可能性がある（表7）。

【0386】

実施例15-LRRK2-SNP

研究の目的

パーキンソン病は、運動制御に影響を及ぼすドーパミン作動性ニューロンの喪失を特徴とする進行性の神経変性疾患である。ロイシンリッチリピートキナーゼ2（LRRK2）遺伝子の変異は、パーキンソン病に関連する一般的な危険因子の原因となる（Alessi & Sammler, 2018）。LRRK2の優性遺伝性及び散発性の病原性変異は、LRRK2キナーゼの過剰活性化を引き起こし、LRRK2遺伝子発現のダウンレギュレーションは潜在的な治療戦略である。対立遺伝子特異的標的化は、野生型への影響を最小限に抑える、又はまったく影響を与えずに、活性化過剰の疾患対立遺伝子のダウンレギュレーションに特に有望である。

【0387】

材料と方法

RNA-seq分析を使用して、独占的かつ公開されているRNA-seqデータに完全に含まれる偽エクソンを有する断片を特定し、dbSNPデータベース（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>）を使用して、3'又は5'スプライス部位を強化する（MaxEntスコアが増加する）SNPを特定した。このようなSNPにより、他の点では反応しない偽エクソンをSSO治療の機能標的とし、成熟mRNAに所与の偽エクソンを包含する、又は包含を増加させることが可能になる。

【0388】

A549細胞を逆トランスフェクトし、LX-2細胞を、Lipofectamine RNAiMAX（Invitrogen社）を使用して、30nMのSSO（5'-CAGACUACCAAGACAUCUGACUAGAA-3'）（配列番号333）（配列番号217を標的化する、特定の標的配列は、表9の配列番号217に下線で引かれている）でトランスフェクトした。非標的SSO（5'-GCUCAAU AUGCUACUGCCCAUGCUUG-3'）（配列番号126）を陰性対照として使用した。A549細胞はトランスフェクション後48時間で収集され、LX-2細胞はTrizol（Invitrogen社）を使用してトランスフェクション後24時間で収集された。RNAはクロロホルム及びイソプロパノールを使用して抽出され、相補DNA（cDNA）はHi

【 0 3 8 9 】

我々は、LRRK2遺伝子のイントロン37に偽エクソン(chr12:40322690-40322887(+))を特定した。共通のSNPであるrs10878372 A/Gによって、偽エクソン5'スプライス部位の強度が増加し(頻度:A=0.77/G=0.23、1000 Genomes European population)、「A対立遺伝子」についてはMaxEntスコアが-4.26、「G対立遺伝子」については4.84に変化した。この偽エクソンは、特定されたSNP(G対立遺伝子)を有する遺伝子対立遺伝子のSweet Spot領域のみを標的とするSSOによって活性化できる。これにより、ヘテロ接合体(1000 Genomes European populationの35%に等しい)における偽エクソンのG対立遺伝子特異的活性化、及びG対立遺伝子にホモ接合性である個体における両方の対立遺伝子からの偽エクソンの活性化が可能になるが、SSOはA対立遺伝子にホモ接合性である個体における偽エクソンを活性化しない。

【 0 3 9 0 】

5' スプライス部位の下流の+11~+35の位置に相補的なSSO (配列番号217) によるA549細胞及びLX-2細胞のトランスフェクションによって、rs10878372 A/G SNPにヘテロ接合性であるLX-2細胞におけるLRRK2偽エクソンの包含が増加し、A対立遺伝子にホモ接合性であるA549細胞における偽エクソンの包含には影響を及ぼさなかった (図10Aと10Bを比較されたい)。LRRK2偽エクソンを包含すると、成熟mRNAのエクソン37と38の間に198 ntが導入され、これにはいくつかのフレーム内未熟翻訳終止コドンが含まれる。

【 0 3 9 1 】

Sweet Spot領域を標的とするSSOを使用することによって、LRRK2の活性及び機能を減少させて、偽エクソンの包含を誘導し、それによって対立遺伝子特異的標的化のために特定されたSNP(G)を保持するLRRK2遺伝子対立遺伝子の発現を低下させる。フレーム内未成熟終止コドンを導入する偽エクソンの包含によって、転写物の分解又は切断された非機能タンパク質の翻訳によって遺伝子発現が減少する。

【 0 3 9 2 】

偽エクソンの3'又は5'スプライス部位を強化するSNPを特定し、偽エクソンをSO治療の機能標的にして、偽エクソンの包含を誘導することによって、治療を開始する前に、特定のSNP及び優性病原性変異を同対立遺伝子に有する対象をスクリーニングすることにより、対立遺伝子特異的標的化（又は少なくとも対立遺伝子を好む標的化）を実行することができる。

参考文献：Alessi, D. R. & Sammler E (2018) Science, 360 (6384) : 36–37. DOI:10.1126/science.aar5683

【 0 3 9 3 】

研究の目的

多くの常染色体優性遺伝疾患では、変異対立遺伝子がドミナントネガティブ効果を有するタンパク質を生成し、それが野生型対立遺伝子から生成される正常なタンパク質を妨害するため、疾患を引き起こす（変異）対立遺伝子のみからの発現の対立遺伝子特異的ダウンレギュレーションが好ましい。同様に、遺伝子重複によって引き起こされる疾患では、

疾患の病理が遺伝子量感受性によるものであるため、1つの対立遺伝子のみの対立遺伝子特異的ダウンレギュレーションが好ましい。変異体又は過剰発現した対立遺伝子からの転写物に未成熟終止コドンを導入する偽エクソンのスプライシングの活性化は、変異体の転写物の分解又は切断された非機能的タンパク質の翻訳によって遺伝子発現を減少させる。

【0394】

23merの3'スプライス部位（イントロン-エクソン境界の-20~+3nt）又は9merの5'スプライス部位（エクソン-イントロン境界の-3~+6nt）にあるSNPは、所与のスプライス部位の強度に影響する（MaxEntスコアを変化させる）。これは、対立遺伝子特異的な偽エクソンの活性化に利用でき、なぜなら、このような高MaxEntスコアのSNP変異体は、他の点では応答しない偽エクソンをSSO治療の機能標的にすることができ、それによって、成熟mRNA転写物に対立遺伝子特異的な包含、又は所与の偽エクソンの包含の増加を可能にするためである。本発明の原理を図11に示す。

10

【0395】

したがって、Sweet Spotに結合するSSOによる処理を開始する前に、特定の高MaxEntスコアのSNP変異体を有する対象をスクリーニングすることにより、対立遺伝子特異的標的化（又は少なくとも対立遺伝子を好む標的化）を実行することができる。

【0396】

材料と方法

20

RNA-seq分析を使用して、独占的かつ公開されているRNA-seqデータに完全に含まれる偽エクソンを有する断片を特定し、dbSNPデータベース（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>）を使用して、3'又は5'スプライス部位を強化する（MaxEntスコアが増加する）SNPを特定した。実施例15に示すように、このような高MaxEntスコアのSNP変異体により、他の点では応答しない偽エクソンをSSO治療の機能的標的にし、成熟mRNAに所与の偽エクソンを包含する、又は包含を増やすことができる。

【0397】

結果

我々は、Sweet Spot領域に結合するSSOによる対立遺伝子特異的活性化がスプライス部位配列のSNP変異によって決定される場合、以下の標的偽エクソンの追加例を特定した（表9）。

30

【0398】

40

50

【表 9 A】

表 9 : スプライス部位配列の SNP 変異体によって対立遺伝子特異的活性化が決定される標的偽エクソン

SSO 配列 番号	遺伝子	hg38 座標	SNP ID	Sweet Spot 配列
217	LRRK2- SNP	chr12:4032269 0-40322887 (+)	rs1087837 2	CTTTCTAGTCAGATGTCTGGTAGTCTGCAGC
218	LMNB1	chr5:12680426 3- 126804357 (+)	rs3048533 1	CTGCGCTCAGCATGATATCCTGACTTACAGT
219	ATXN2- SNP	chr12:1115057 33- 111505834 (-)	rs1084995 3	GTTTCTGTTTCTCCACATCCTTGCTAACACT
220	C3	chr19:6699217 -6699330 (-)	rs1166656 3	TCATACTCAAGTAGTTGCAAAAATACTTAAA
221	INPP5D	chr2:23316194 3- 233162017 (+)	rs2875196 0	AACGAGCTTTGGGACTATCGTACCCCAAGAG
222	ELM01	chr7:36884178 -36884307 (-)	rs1022648 4	TTTGATTTTTAGCAGAGATGGGATTTCACC
223	SCN9A- SNP	chr2:16629060 5- 166290765 (-)	rs6728078	TAAAAAGTTGAGAAACAATAGATTCTGGTGA
224	RBF0X1	chr16:6876662 -6876743 (+)	rs9938245	TGTGCTTTTCTTATTATATTGCATTACA
225	SCN1A- SNP	chr2:16602512 3- 166025259 (-)	rs1510718 89	ATGTTAAGATGCTGGGTGTATGCTCATTGT
226	TRPM7	chr15:5065485 6-50654997 (-)	rs1077514 3	TTGTGGTTTTTTTAGTAGAGATGGGGTTTC
227	LING01	chr15:7762883 7-77628904 (-)	rs9920127	CCAGCTTGCAAGCCTGCGGTTCACTCTAGAA

10

20

30

40

【 0 3 9 9 】

【表 9 B】

228	RBF0X1 - SNP	chr16:7707752 -7707876(+)	rs758497	CTTGCACAGGAATCTATTCCAGTATCAGCTT
229	GRIN2A	chr16:9792916 -9793121(-)	rs7202848	TGGCTCTAGTTCATCTGAGTCCAATTCTGAT
230	INPP5D -SNP	chr2:23315716 0- 233157272(+)	rs3614583 5	CCAAGGTAAAGGCTGTGCCTCGGCCCTTGA
231	NIPA1	chr15:2281438 7-22814505(+)	rs8026280	ATATGTATATTTTAAAAAGCAGTTCTGTTCTT
232	NIPA1- 2	chr15:2281439 0-22814505(+)	rs8026280	ATATGTATATTTTAAAAAGCAGTTCTGTTCTT
233	SMARCA 2	chr9:2058740- 2058881(+)	rs3793485	TTTGAAGCCTCTGGTGCTTATCTTTCTTTT
234	SMARCA 2-1	chr9:2187241- 2187291(+)	rs7026165	CTCCATTGTTTGACCCTAGTTCAGCCGTGA
235	CACNA1 H-SNP	chr16:1216278 -1216392(+)	rs7636459 5	CCCAGCGGGGCAGTGTGTGCAAAATGCTGGGG
236	GABRA4	chr4:46965556 -46965691(-)	rs2280073	CATGCTTTTAAACCTTTATAGAAAACCAATC
237	RYR1	chr19:3849579 0-38495905(+)	rs7449301 9	CACCACGCCTGGCTAATTTTGTATTTTATAG
238	RYR1-1	chr19:3850664 7-38506678(+)	rs2915957	ATGAGCACCAGCAAGCAATGTTTCGGTTATT
239	GNE	chr9:36235079 -36235352(-)	rs7850891	TACAGAATAACAAATATTTCAAAATCCAAAA
240	TNNT2	chr1:20137118 3- 201371324(-)	rs1498129 65	TCAGCATGTGGCATGTAGATATTAGGAGAAG
241	RUNX3	chr1:24905894 -24906104(-)	rs7406046 8	AGGAGCCCTGCACGCTGTGCTCACGCCACC
242	PDE3A	chr12:2064289 9-20643080(+)	rs1073470 6	TACCATGTGCTAGTGTATGCATGTGCGTCTA

10

20

30

40

【 0 4 0 0 】

50

【表 9 C】

243	KIF21A	chr12:3935297 2-39353016 (-)	rs5857936 9	ATAATTGTATTTTGTATGGTTAAATCAAGT
244	ABCA1	chr9:10482735 4- 104827513 (-)	rs1099138 3	CTTATCTTCTTTAGGATGGTAATGATCAGTT
245	RBF0X1 -SNP1	chr16:7596461 -7596528 (+)	rs7348866 9	TGAAGTCCATCTGCCGTTTCACGTATTTAGT
246	INPP5D -SNP1	chr2:23319522 0- 233195283 (+)	rs6219289 5	TATTCAGTGTGCAGCTTCAGCCTGCAAAATGG
247	INPP5D -SNP2	chr2:23319522 0- 233195283 (+)	rs1383051 44	TATTCAGTGTGCAGCTTCAGCCTGCAAAATGG
248	SETX	chr9:13233325 4- 132333350 (-)	rs6142101 4	CACCATACCTGGCTAATTTTGTATTTTAG
249	RYR2	chr1:23744025 1- 237440408 (+)	rs7432894 9	GGCTTTTTCATTGCTGCTTTAGGGACTGTAC
250	EPAS1	chr2:46383277 -46383409 (+)	rs1703509 1	GGCCTGAAAATAATTCGTGGTTTATGGAAAA
251	ADCY5	chr3:12335026 6- 123350425 (-)	rs5934097 9	TCCTCACACACAGTTAACAGGCCACTGATGT
252	INPP5- SNP3	chr2:23317426 4- 233174308 (+)	rs1017930 4	TGTGTTGCGCTGTGACGTGATGACAGCTACA
253	SPTLC1	chr9:92033796 -92033843 (-)	rs5624878 4	ATCACTTGAGCCCAGGAGTACAAGACCAGCC

10

20

30

40

【 0 4 0 1 】

50

【表 9 D】

254	GLUD1	chr10:8707001 6-87070105 (-)	rs6586053	CTAAAGGAATGGAAAGTGAGCAAATAGGAGC
255	CHN1	chr2:17481613 2- 174816212 (-)	rs6713884	TCTATCATCTATGCCCATCCTACAGCTACAT
256	HTT- SNP1	chr4:3160124- 3160157 (+)	rs363141	ACGGCGCCGCACAGTGGAGGCATCTGCTGCA
257	HTT- SNP2	chr4:3231898- 3232034 (+)	rs5958863 8	CCACCGTTGTGAAATCCGTGCCACCCGAGAG
258	CACNA1 D	chr3:53746649 -53746685 (+)	rs1380612	CCTGGCATTTGGCGTGAGGACACTGTTTCTTC
259	SMARCA 2-SNP1	chr9:2187241- 2187291 (+)	rs7132940 3	CTCCATTGTTTGACCCTAGTTCCAGCCGTGA
260	RYR1- SNP1	chr19:3852675 2-38526791 (+)	rs2254484	GTGACCCTCCGGCCCTCTAGGACCCCTTCT
261	CHRNA3	chr15:7859989 2-78600013 (-)	rs5700547 6	CCGCTACCATGCCTAATTTTTGTATTTTA
262	LRRK2	chr12:4036241 0-40362491 (+)	rs1117619 5	AAAATACATTGTCCTCATCCTTATGAAATTA
263	SNCA- SNP1	chr4:89791054 -89791125 (-)	rs2572320	ATTAAACTTCTTTCTTTATAAAAAAAAAAAAA
264	VWF	chr12:6030332 -6030439 (-)	rs1282714 9	GCAGTGTCAACTGCATTTCAAAGAACAGCTC
265	RET	chr10:4312041 1-43120519 (+)	rs3026769	TCTGATATGACCTTAGCTCTTTTCTCAAAGA
266	EIF2AK 2	chr2:37135964 -37136142 (-)	rs4648202	ATAGTTTTATAAAGAAAAAGTTGGCTGGGT
267	PDE3A- SNP1	chr12:2065555 3-20655674 (+)	rs7144670 7	TGTGGCTTTTACTCTGAGTAAGATGGGAAAT
268	MYC	chr8:12773968 5- 127739832 (+)	rs5894898	TGGCATCAATGTCCTATCCTGGGAAGTTGCA

10

20

30

40

【 0 4 0 2 】

50

【表 9 E】

269	LRRK2- SNP2	chr12:4036047 5-40360605(+)	rs1078453 6	ATCTGATGCAATTTTCCTGCTTAAACCCCTT
270	COL6A1 -SNP1	chr21:4598927 2-45989324(+)	rs2277813	CCCTGCCAGGGAGGGGCTGGGTGGGGAGGTG
271	COL6A1 -SNP2	chr21:4598931 0-45989324(+)	rs2277813	CCCTGCCAGGGAGGGGCTGGGTGGGGAGGTG
272	GNE- SNP1	chr9:36235079 -36235096(-)	rs7850891	TACAGAATAACAAATATTTCAAAATCCAAAA
273	BPGM	chr7:13466589 9- 134666020(+)	rs4728331	CACCACACCTGGCTAATTTTTGTAATTTTTT
274	PTPRD	chr9:8351243- 8351310(-)	rs1073916 0	TGTTATGTTATATATATTGTTCTGCAATATA
275	EVI5	chr1:92711525 -92711647(-)	rs6665579	CAGTGTATTTAGCTTCCCAGGTGTTTGTATC
276	HKDC1	chr10:6923856 0-69238683(+)	rs5843613 7	ATTAGAGCATTCCTTTGAGAGAGGTAGGGAG
277	KITLG	chr12:8853847 0-88538514(-)	rs1110493 8	GTCAAACCAGACTGAATTTATAGAAATTATC
278	GNA11	chr19:3120650 -3120739(+)	rs1682801	AGAGCCCCAGGTTGGAGGCCTGGGCCGTGAC
279	RAB5A	chr3:19962022 -19962119(+)	rs4241539	CTTTTATGACTTTGCTCCAGAAGTCACATAG
280	RPS6KB 1	chr17:5993757 8-59937788(+)	rs180520	TTTTTTGGGGTGGGTAAGGCACACGATTCA
281	PABPC1	chr8:10071418 5- 100714254(-)	rs3133580	GTCATATTTTCTTGACTTTGGCCTCAGGAGA
282	PFKFB3	chr10:6218474 -6218523(+)	rs2148289	GATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAATAGCTG
283	IIK1	chr10:6939584 6-69395909(+)	rs1082335 9	AAACAAAAGCAATTGTGCAAAATACTGTGTTC
284	ADCY5- SNP1	chr3:12338699 5- 123387105(-)	rs9856983	CTTCTTATGGATCCTAGTGTTGCATGAGC
285	GRIN2B	chr12:1387992 7-13880010(-)	rs7952915	AGTTTTCAGCTTTCAACATTTAATTTAAGGT
286	MDM2	chr12:6882088 5-68820910(+)	rs1201644	ATAAGTGTTTTACAACCTACTTTCCATGAGA

10

20

30

40

【 0 4 0 3 】

50

【表 9 F】

287	RNF115 -SNP1	chr1:14578293 8- 145783156(-)	rs3554543 2	AGATCGCACTACTGCACTCCAGCCTGGGTGA
288	FLT1- SNP11	chr13:2831774 4-28317857(-)	rs880704	AGATCTGTTGTAATCCCTGGGAATTTATTAC
289	ATXN10	chr22:4579716 3-45797226(+)	rs7388961 8	TAGTGAACACTGCACCAATAACAGCATGTAT
290	DIAPH3 -SNP1	chr13:6016166 8-60161732(-)	rs2210990	TTATCTTTGTAAGCTCATTGCTTTATCTTCA
291	TRPM7- SNP1	chr15:5058537 8-50585394(-)	rs3131596	AATGGTAGAGTGGGCCAGGTGGCTTACGCCT
292	ERBB4	chr2:21163376 2- 211633784(-)	rs3863853	ATGTCTATCTTTTAATATTGTTTAAGATAAT
293	SREBF1	chr17:1782697 9-17827055(-)	rs7329785 9	TGTCAGAGATGGATCTGGGTTCTGTGGACAA
294	INSIG2	chr2:11810375 7- 118103854(+)	rs1704775 7	TTTCAAAGTTTATTGTTTGAAGATTCAGAC

SNP IDは、dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) のSNP番号を指す。

下線は、試験済みのSSOの結合配列を示す。結合は対応するpre-mRNAに対して行われる。hg38ゲノム座標はGFF/GFT形式に従う。開始座標と終了座標は1baseから始まる。

遺伝子名は、場合によっては配列コードで拡張されている。

【0404】

10

20

30

40

50

【表 10A】

表 10：偽エクソンの対立遺伝子特異的活性化を実行できる SSO

配 列 番 号	遺伝子	SSO 名	SSO 配列 5' → 3'
295	ABCA1	ABCA1 SSO +11	GAUCAUUACCAUCCUAAAAGAAAGUA
296	ADCY5	ADCY5 SSO1 +11	CAGUGGCCUGUUAACUGUGUGAG
297	ADCY5	ADCY5 SSO2 +11	AUGCAAACACUAGGAUCCAUAAGAA
298	ATXN10	ATXN10 SSO +11	AUGCUGUUAUUGGUGCAGUGUUCAC
299	ATXN2	ATXN2 SSO +11	UUAGCAAGGAUGUGGAGAAACAGAA
300	BPGM	BPGM SSO +11	AAUUACAAAAAUAGCCAGGUGUGG
301	C3	C3 SSO +11	AGUAAUUUUGCAACUACUUGAGUAU
302	CACNA1D	CACNA1D SSO +11	AAACAGUGUCCUCACGCCAAUGCCA
303	CACNA1H	CACNA1H SSO +11	AGCAUUUGCACACACUGCCCCGCUG
304	CHN1	CHN1 SSO +11	AGCUGUAGGAUGGGCAUAGAUGAU
305	CHRNA3	CHRNA3 SSO +11	AAUACAAAAAUUAGGCAUGGUAGC
306	COL6A1	COL6A1 SSO +11	UCCCCACCCAGCCCCUCCUGGCAG
307	DIAPH3	DIAPH3 SSO +11	GAUAAAGCAUGAGCUUACAAAGAU
308	EIF2AK2	EIF2AK2 SSO +11	AGCCAACUUUUUCUUUUAUAAACU
309	ELM01	ELM01 SSO +11	AAAUCCCAUCUCUGCUAAAAAUACA
310	EPAS1	EPAS1 SSO +11	CCAUAAACCACGAAUUAUUUCAGG
311	ERBB4	ERBB4 SSO +11	UCUUAACAUAUUAUAAAGAUAGAC
312	EVI5	EVI5 SSO +11	CAAAACACCUGGGAAGCUAAAUACAC
313	FLT1	FLT1 SSO +11	UAAAUUCCAGGGAUUAACAACAGAU
314	GABRA4	GABRA4 SSO +11	GGGUUUUCUAAUAAAGGUUAAAAGCA
315	GLUD1	GLUD1 SSO +11	CUAUUUGCUCACUUCCAUCCUUU
316	GNA11	GNA11 SSO +11	CGGCCCAGGCCUCCAACCUGGGGCU
317	GNE	GNE SSO +11	GGAUUUUGAAAUUUUGUUAUUCUG
318	GRIN2A	GRIN2A SSO +11	GAAUUGGACUCAGAUAACUAGAGC
319	GRIN2B	GRIN2B SSO +11	UAAAUUAAUUGUUGAAAGCUGAAAA
320	HK1	HK1 SSO +11	ACAGUAUUUGCACAAUUGCUUUUGU
321	HKDC1	HKDC1 SSO +11	CUACCUCUCUCAAAGGAAUGCUCUA
322	HTT	HTT SSO1 +11	GCAGAUGCCUCCACUGUGCGGCGCC
323	HTT	HTT SSO2 +11	CGGGUGGCACGGAUUUCACAACGGU
324	INPP5D	INPP5D SSO1 +11	UGGGGUACGAUAGUCCCAAAGCUCG
325	INPP5D	INPP5D SSO2 +11	AGGGCCGAGGCACAGCCUUUACCUU
326	INPP5D	INPP5D SSO3 +11	UUGCAGGCUGAAGCUGCACAGUGAA
327	INPP5D	INPP5D SSO4 +11	GCUGUCAUCACGUCACAGCGCAACA
328	INSIG2	INSIG2 SSO +11	GAAUCUCAAACAUAUAAACUUUGA
329	KIF21A	KIF21A SSO +11	GAUUUAAACCAUCAAAAAUACAAUU
330	KITLG	KITLG SSO +11	AUUUCUAUAAAUUCAGUCUGGUUUG
331	LING01	LING01 SSO +11	AGACUGAACCGCAGGCUUGCAAGCU
332	LMNB1	LMNB1 SSO +11	UAAGUCAGGAUAUCAUGCUGAGCGC
333	LRRK2	LRRK2 SSO1 +11	CAGACUACCAGACAUUGACUAGAA
334	LRRK2	LRRK2 SSO2 +11	UUCAUAAGGAUGAGGACAAUGUAUU

【0405】

10

20

30

40

50

【表 10B】

335	LRRK2	LRRK2 SS03 +11	GUUUUAAGCAGGAAAAUUGCAUCAG
336	MDM2	MDM2 SS0 +11	AUGGAAAGUAGGUUGUAAAACACUU
337	MYC	MYC SS0 +11	ACUCCCCAGGAUAGGACAUUGAUGC
338	NIPA1	NIPA1 SS0 +11	ACAGAACUGCUUUUAAAAUUAUACAU
339	PABPC1	PABPC1 SS0 +11	CUGAGGCCAAAGUCAAGAAAAUUG
340	PDE3A	PDE3A SS01 +11	CGCACAUGCAUACACUAGCACAUGG
341	PDE3A	PDE3A SS02 +11	CCCAUCUUACUCAGAGUAAAAAGCCA
342	PFKFB3	PFKFB3 SS0 +11	UAUUCGGGAGGCUGAGGCAGGAGAA
343	PTPRD	PTPRD SS0 +11	UUGCAGAACAAUUAUUAUAAACAUAA
344	RAB5A	RAB5A SS0 +11	GUGACUUCUGGAGCAAAGUCAUAAA
345	RBFOX1	RBFOX1 SS01 +11	AUGCAAAUUAUAAUAAAGAAAAAGCA
346	RBFOX1	RBFOX1 SS02 +11	UGAUACUGGAAUAGAUAUCCUGUGCA
347	RBFOX1	RBFOX1 SS03 +11	AAUACGUGAAACGGCAGAUGGACUU
348	RET	RET SS0 +11	UGAGAAAAGAGCUAAGGUCAUUUA
349	RNF115	RNF115 SS0 +11	CCAGGCUGGAGUGCAGUAGUGCGAU
350	RPS6KB1	RPS6KB1 SS0 +11	UCGUGUGCCUUAACCAACCCCAAAA
351	RUNX3	RUNX3 SS0 +11	GGCGUGAGCACAGCGUGCAGGGCUC
352	RYR1	RYR1 SS01 +11	AAAUACAAAAUUAGCCAGGCGUGG
353	RYR1	RYR1 SS02 +11	ACGGAAACAUUGCUUGCUGGUGCUC
354	RYR1	RYR1 SS03 +11	GGGGUCCUAGAGGGGCCGGAGGGUC
355	RYR2	RYR2 SS0 +11	AGUCCCUAAAGCAGCAAUGAAAAAG
356	SCN1A	SCN1A SS0 +11	AUGAGCAUACACCCAGCAUCUUAAAC
357	SCN9A	SCN9A SS0 +11	CAGAAUCUAUUGUUUCUACAUUUU
358	SETX	SETX SS0 +11	AAAUACAAAAUUAGCCAGGUAUGG
359	SMARCA2	SMARCA2 SS01 +11	AGAAAGAUUAGCACCAGAGGCUUCA
360	SMARCA2	SMARCA2 SS02 +11	GGCUGGAACUAGGGUCAACAAUGG
361	SNCA	SNCA SS0 +11	UUUUUUUUAUAAAGAAAGAAGUUUA
362	SPTLC1	SPTLC1 SS0 +11	GGUCUUGUACUCCUGGGCUCAAGUG
363	SREBF1	SREBF1 SS0 +11	CCACAGAACCCAGAUCCAUCUCUGA
364	TNNT2	TNNT2 SS0 +11	UCCUAAUUCUACAUGCCACAUGCU
365	TRPM7	TRPM7 SS01 +11	CCCCAUCUCUACUAAAAAAACCAC
366	TRPM7	TRPM7 SS02 +11	GUAAGCCACCUGGCCACUCUACCA
367	VWF	VWF SS0 +11	UGUUCUUUGAAUGCAGUUGACACU

10

20

30

【0406】

選択例

LMNB1B:

ラミンB1はLMNB1遺伝子によってコードされる。ラミンB1の過剰発現は進行性の中樞神経系の脱髄を引き起こし、常染色体優性成人発症脱髄性白質ジストロフィー（ADLD）につながる（Giorgioら、2015；Giorgioら、2019）。ADLDは、中樞神経系（CNS）のミエリンに影響を及ぼす遺伝性、進行性、致命的な障害である。LMNB1対立遺伝子の1つを対立遺伝子特異的にダウンレギュレーションすることは、ADLDに適切で有望な治療選択肢となる可能性がある（Giorgioら、2019）。

40

【0407】

更に、LMNB1の発現は癌に増加し、癌ステージ及び患者の予後に関連する。LMNB1のダウンレギュレーションにより、癌細胞の増殖と移動、及び腫瘍の成長が減少する。そのため、LMNB1のダウンレギュレーションは癌における有望な治療戦略でもある

50

(Liら、2022)。

【0408】

我々は、LMNB1遺伝子、chr5:126804263-126804357(+)のイントロン1に偽エクソンを特定した。偽エクソン5'スプライス部位の強度は、共通のSNP、rs30485331--/insTT(頻度:--=0.80/insTT=0.2、1000Genomes European population)によって決定される。insTT変異体は、--対立遺伝子のMaxEntスコアを7.10に、insTT対立遺伝子のMaxEntスコアを-20.37に変化させる(低MaxEntスコアSNP変異体)。この偽エクソンは、特定されたSNP(insTT対立遺伝子)を有さない遺伝子対立遺伝子でのみ、Sweet Spot領域を標的とするSSOによって活性化できる。これにより、ヘテロ接合体(=1000Genomes European populationの32%)における偽エクソンの対立遺伝子特異的活性化、及び--対立遺伝子(高MaxEntスコアSNP変異体)のホモ接合体である個体における両方の対立遺伝子からの偽エクソンの活性化が可能になるが、SSOはinsTT対立遺伝子(低MaxEntスコアSNP変異体)のホモ接合体である個体の偽エクソンを活性化しない。

10

【0409】

chr5:126804263-126804357(+)LMNB1偽エクソンを包含すると、mRNAのエクソン1とエクソン2の間に95bpが導入される。これにより、mRNA転写物にインフレーム未成熟終止コドンが導入される。したがって、この偽エクソンの包含を有するLMNB1 mRNA転写物は、ナンセンス変異依存分解機構の標的になると予測され、偽エクソンの包含が増加すると、LMNB1遺伝子発現が減少することになる。

20

LMNB1SSO標的化のSweet Spotを表9に示す。

【0410】

参考文献:

Giorgio E, Robyr D, Spielmann M, Ferrero E, Di Gregorio E, Imperiale D, Vaula G, Stamo ulis G, Santoni F, Atzori C, Gasparini L, Ferrera D, Canale C, Guipponi M, Pennacchio L A, Antonarakis SE, Brussino A, Brusco A. A l a r g e g e n o m i c d e l e t i o n l e a d s t o e n h a n c e r a d o p t i o n b y t h e l a m i n B 1 g e n e : a s e c o n d p a t h t o a u t o s o m a l d o m i n a n t a d u l t - o n s e t d e m y e l i n a t i n g l e u k o d y s t r o p h y (A D L D) . H u m M o l G e n e t . 2 0 1 5 J u n 1 ; 2 4 (1 1) : 3 1 4 3 - 5 4 . d o i : 1 0 . 1 0 9 3 / h m g / d d v 0 6 5 . E p u b 2 0 1 5 F e b 2 0 . P M I D : 2 5 7 0 1 8 7 1 ; P M C I D : P M C 4 4 2 4 9 5 2 .

30

Giorgio E, Lorenzati M, Rivetti di Val Cer vo P, Brussino A, Cernigoj M, Della Sala E, Bartoletti Stella A, Ferrero M, Caiazzo M, Capellari S, Cortelli P, Conti L, Cattaneo E, Buffo A, Brusco A. Allele-specific silen c i n g a s t r e a t m e n t f o r g e n e d u p l i c a t i o n d i s o r d e r s : p r o o f - o f - p r i n c i p l e i n a u t o s o m a l d o m i n a n t l e u k o d y s t r o p h y . B r a i n . 2 0 1 9 J u l 1 ; 1 4 2 (7) : 1 9 0 5 - 1 9 2 0 . d o i : 1 0 . 1 0 9 3 / b r a i n / a w z 1 3 9 . P M I D : 3 1 1 4 3 9 3 4 .

40

Li J, Sun Z, Cui Y, Qin L, Wu F, Li Y, Du N, Li X. Knockdown of LMNB1 Inhibits the Prolif

50

eration of Lung Adenocarcinoma Cells by Inducing DNA Damage and Cell Senescence. Front Oncol. 2022 May 31;12:913740. doi:10.3389/fonc.2022.913740. PMID:35712471; PMCID:PMC9194513.

【0411】

ATXN2:

アタキシン-2はATXN2遺伝子によってコード化される。脊髄小脳失調症2 (SCA2)は、1つのATXN2対立遺伝子における32超のCAGリピートの拡大によって引き起こされる常染色体優性致死性疾患である (Laffita-Mesaら、2021) (10)。ATXN2における中程度 (29以上のCAG/CAAリピート)の拡大を有する対立遺伝子は、他の多くの神経疾患のリスクを高める。筋萎縮性側索硬化症 (ALS)のマウスでATXN2発現を低下させると生存期間が延長することから、ATXN2疾患対立遺伝子発現の低下は、ALSとSCA2の両方の治療に関連している可能性があることが示唆される (Laffita-Mesaら、2021)。

【0412】

したがって、ATXN2疾患関連対立遺伝子の1つを対立遺伝子特異的にダウンレギュレーションすることは、SCA2、ALS、及びその他の神経変性疾患の適切な治療選択肢となる可能性がある。

【0413】

我々は、ATXN2遺伝子、chr12:111505733-111505834 (-)のイントロン14に偽エクソンを特定した。偽エクソン5'スプライス部位の強度は、共通のSNP、rs10849953 A/G (頻度: A=0.58/G=0.42、1000 Genomes Japanese population)によって決定される。G変異体は、A対立遺伝子のMaxEntスコアを-1.34に、G対立遺伝子のMaxEntスコアを6.84 (高MaxEntスコアSNP変異体)に変化させる。したがって、この偽エクソンは、特定されたSNP (G対立遺伝子)を有する遺伝子の対立遺伝子におけるSweet Spot領域のみを標的とするSSOによって活性化できる。これにより、ヘテロ接合体 (1000 Genomes Japanese populationの49%)における偽エクソンの対立遺伝子特異的活性化と、G対立遺伝子のホモ接合体である個体における両方の対立遺伝子からの偽エクソンの活性化が可能になるが、SSOはA対立遺伝子のホモ接合体である個体 (低MaxEntスコアSNP変異体)の偽エクソンを活性化しない。

【0414】

chr12:111505733-111505834 (-)の包含
ATXN2偽エクソンは、mRNAのエクソン14とエクソン15の間に102bpを導入する。これにより、mRNA転写物にインフレームの未成熟終止コドンが導入される。したがって、この偽エクソンの包含を有するATXN2 mRNA転写物は、ナンセンス変異依存分解機構の標的になると予測され、偽エクソンの包含が増加するとATXN2遺伝子発現が減少することになる。

ATXN2SSO標的化のSweet Spotを表9に示す。

【0415】

参考文献: Laffita-Mesa JM, Paucar M, Svenningson P. Ataxin-2 gene: a powerful modulator of neurological disorders. Curr Opin Neurol. 2021 Aug 1;34(4):578-588. doi:10.1097/WCO.0000000000000959. PMID:34010218; PMCID:PMC8279897.

10

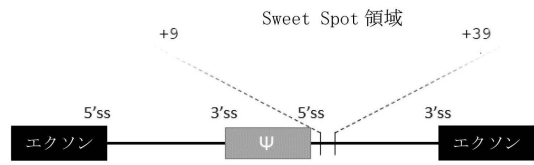
20

30

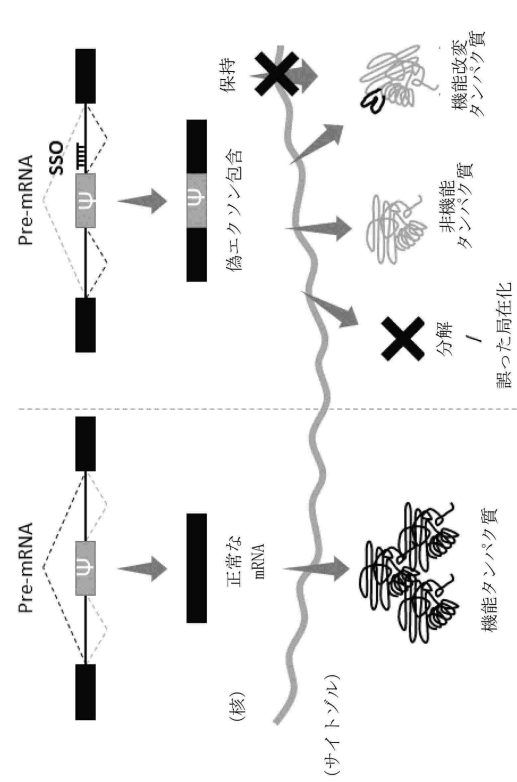
40

50

【図面】
【図 1 A】



【図 1 B】



10

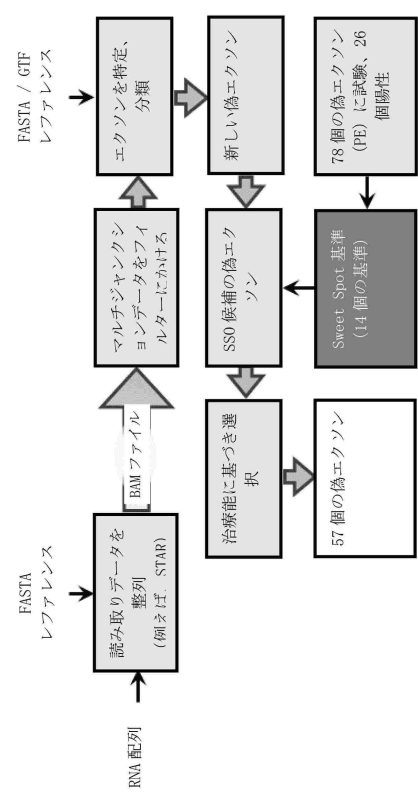
20

30

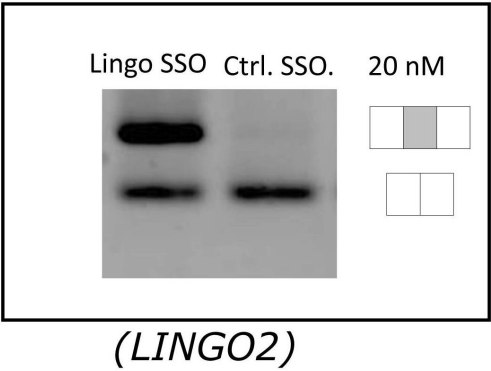
40

50

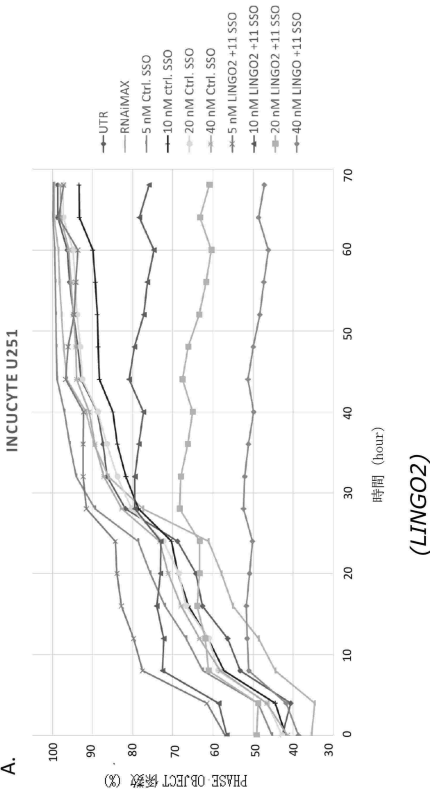
【図 2】



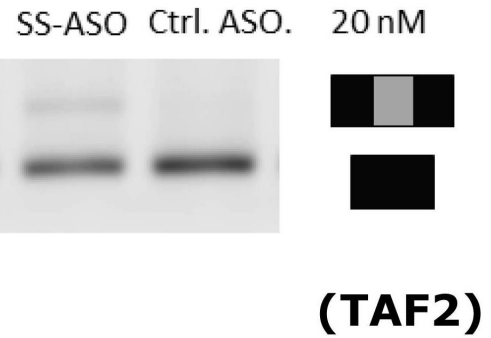
【図 3 A】



【図 3 B】



【図 4 A】



10

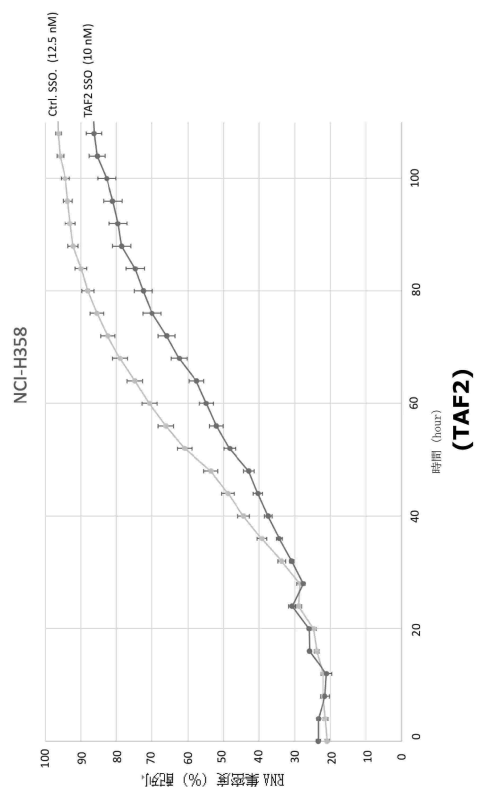
20

30

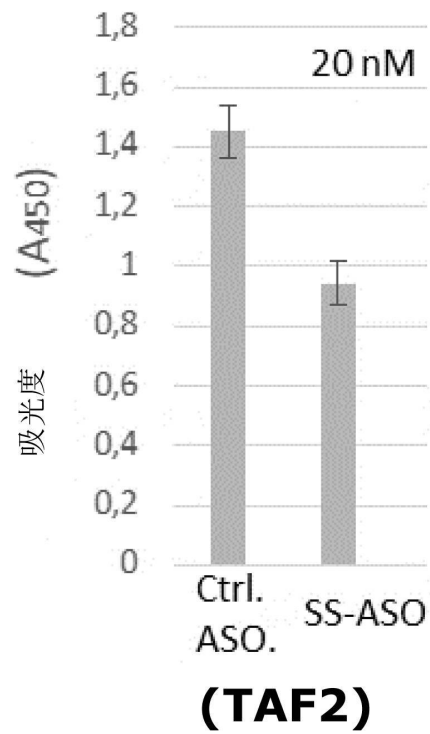
40

50

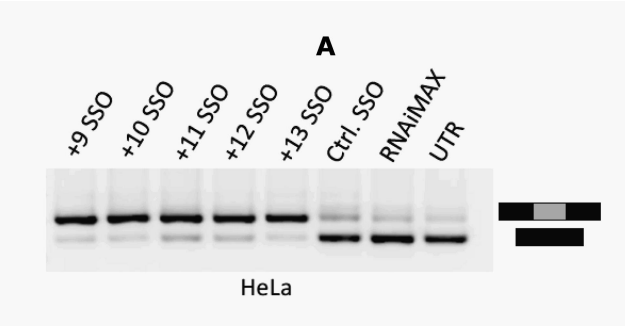
【 図 4 B 】



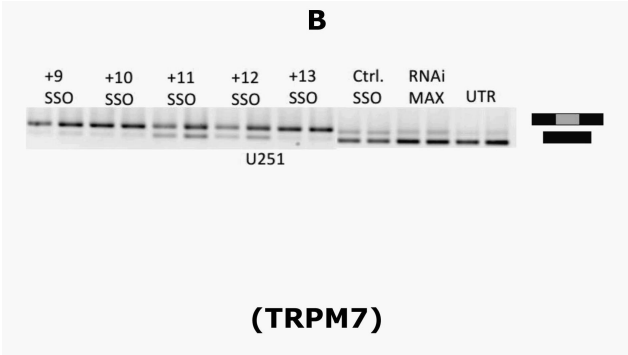
【 図 4 C 】



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



10

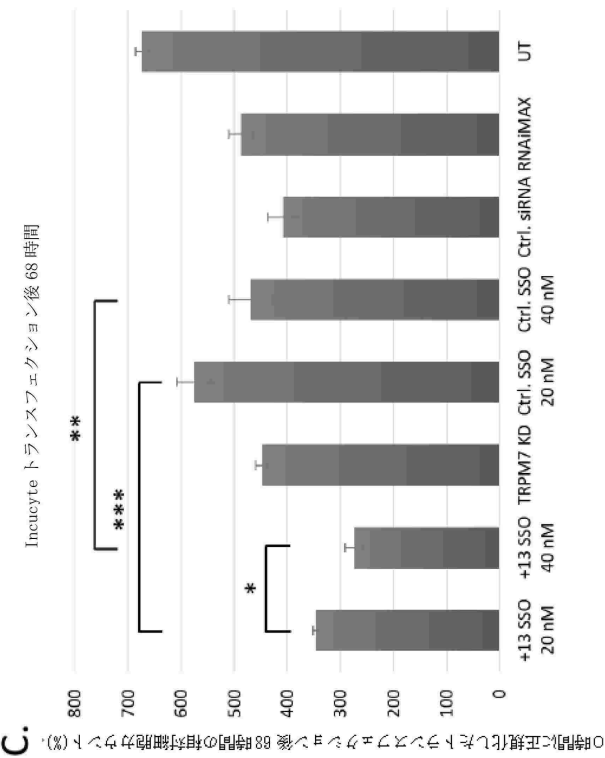
20

30

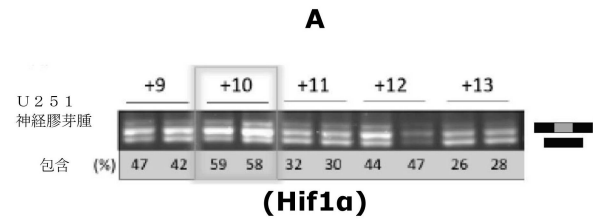
40

50

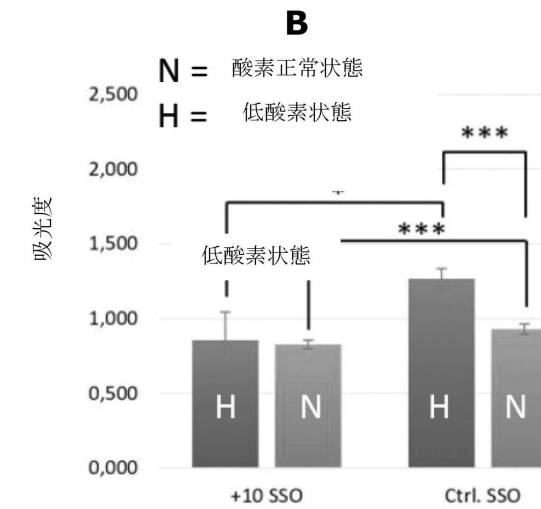
【図 5 C】



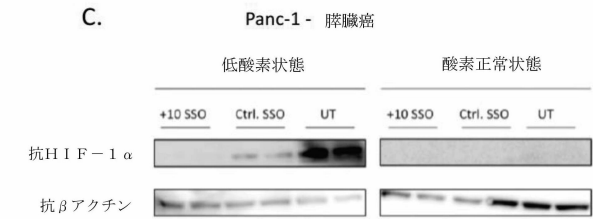
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 6 C】



10

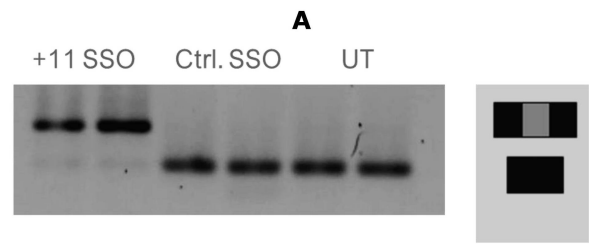
20

30

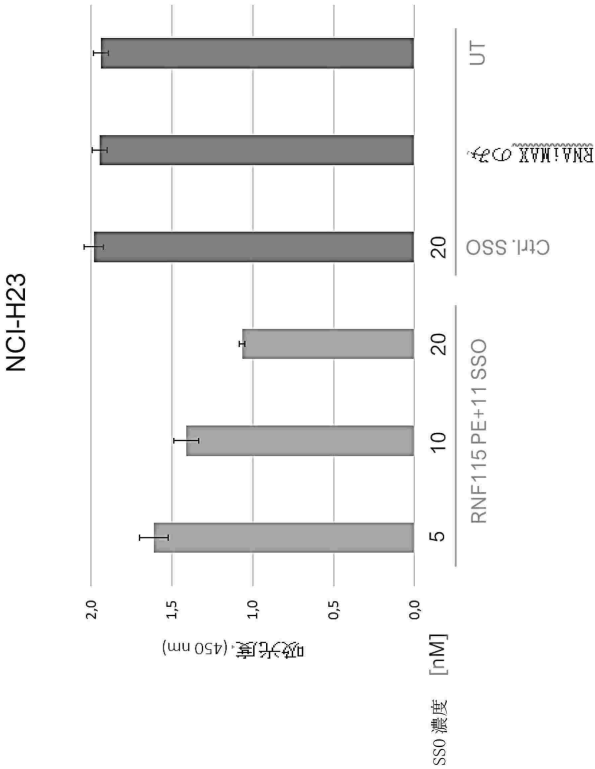
40

50

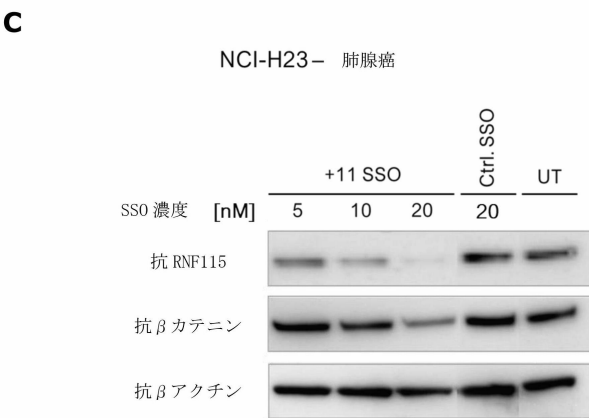
【図 7 A】



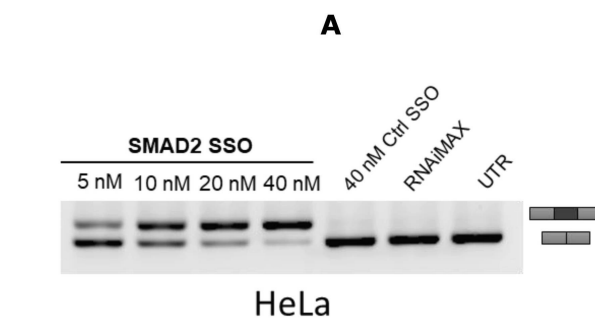
【図 7 B】



【図 7 C】



【図 8 A】



10

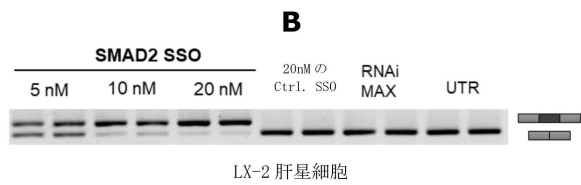
20

30

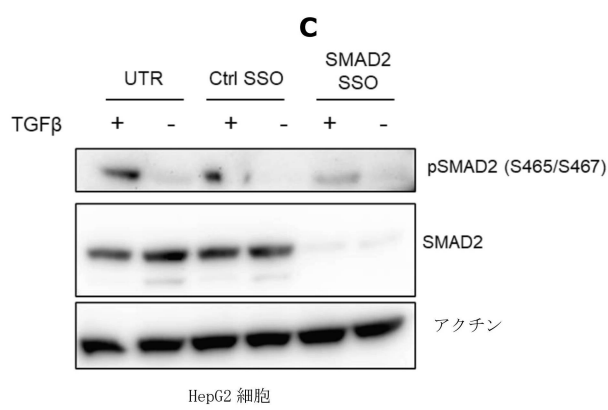
40

50

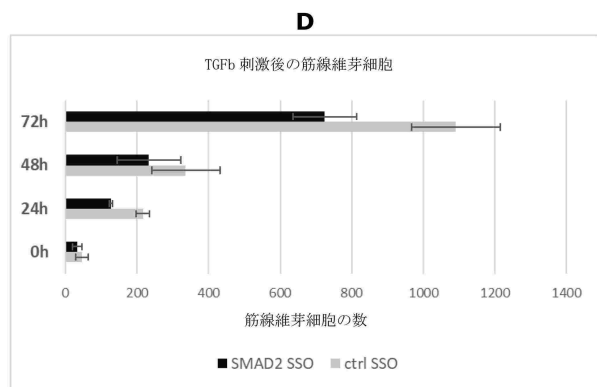
【図 8 B】



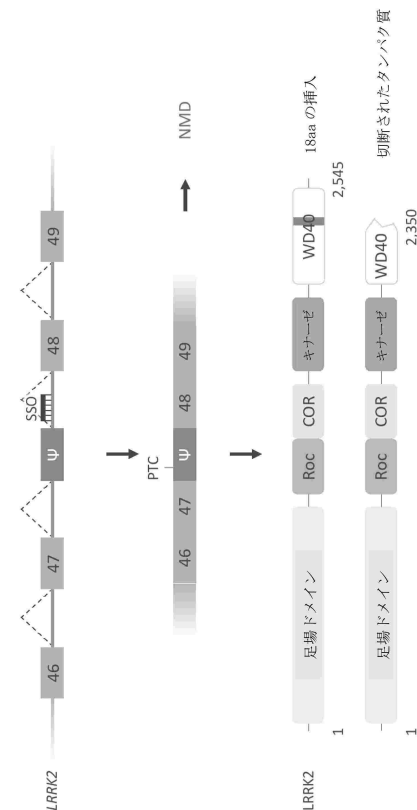
【図 8 C】



【図 8 D】



【図 9 A】



10

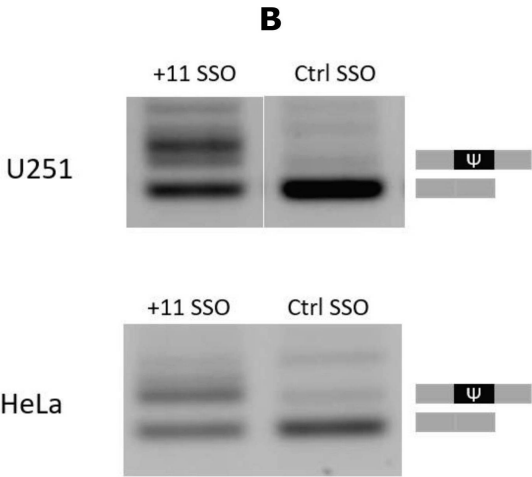
20

30

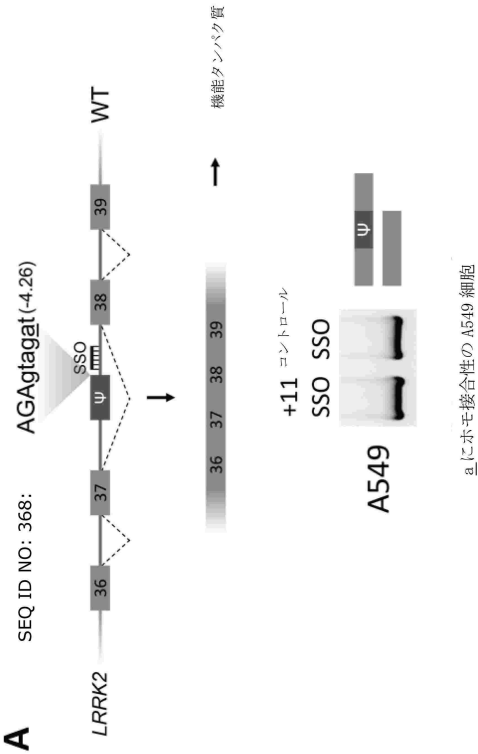
40

50

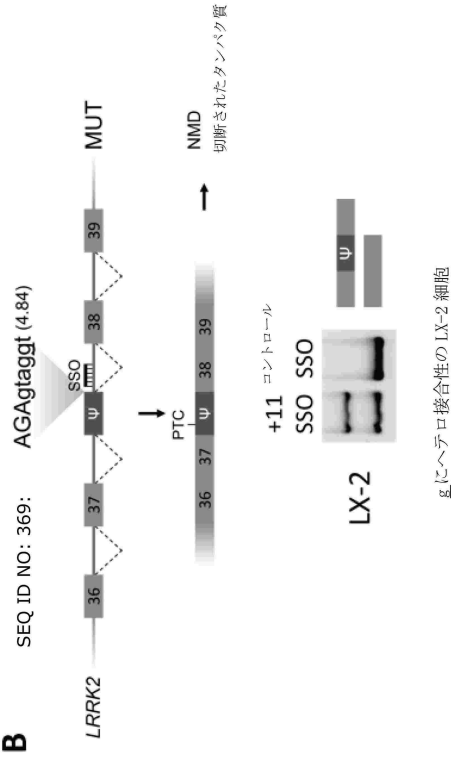
【図 9 B】



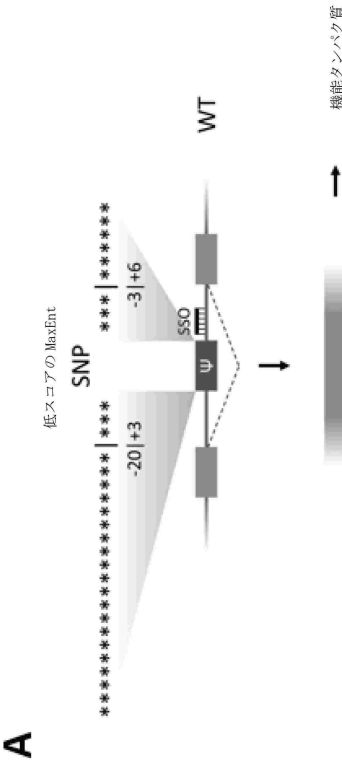
【図 10 A】



【図 10 B】



【図 11 A】



10

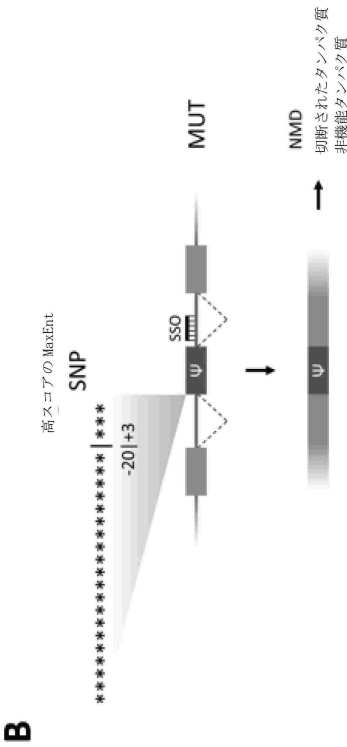
20

30

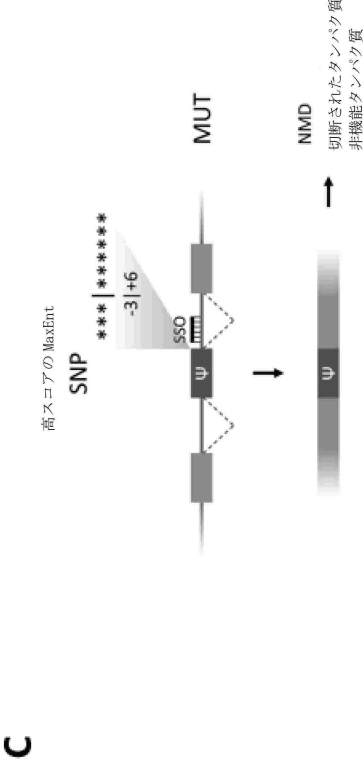
40

50

【図 1 1 B】



【図 1 1 C】



【配列表】

2025504661000001.xml

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/11 C12N15/113 A61K31/7088 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017/060731 A1 (UNIV SOUTHAMPTON [GB]) 13 April 2017 (2017-04-13) paragraph [0189] - paragraph [0194]; claims 13-16, 22, 44-46, 48, 53 paragraph [0203] - paragraph [0204] -----	1-24
A	WO 2020/191212 A1 (HARVARD COLLEGE [US]; CHILDRENS MEDICAL CT CORP [US] ET AL.) 24 September 2020 (2020-09-24) claims 40-57, 71-77 ----- -/--	1-24
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 April 2023		Date of mailing of the international search report 03/07/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bucka, Alexander

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/051916

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SANAKER PETTER SCHANDL ET AL: "Antisense oligonucleotide corrects splice abnormality in hereditary myopathy with lactic acidosis", GENE, vol. 494, no. 2, 1 December 2011 (2011-12-01), pages 231-236, XP028888226, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/J.GENE.2011.11.021 figures 1,3	1-24
A	WO 2019/040923 A1 (STOKE THERAPEUTICS INC [US]) 28 February 2019 (2019-02-28) paragraphs [0082], [0098] - [0101], [0107]	1-24
A	BRUUN GITTE H. ET AL: "Global identification of hnRNP A1 binding sites for SSO-based splicing modulation", BMC BIOLOGY , vol. 14, no. 1 5 July 2016 (2016-07-05), XP055816845, DOI: 10.1186/s12915-016-0279-9 Retrieved from the Internet: URL:https://bmcbiol.biomedcentral.com/trac k/pdf/10.1186/s12915-016-0279-9.pdf pages 9, 11; figures 4,5 page 12, right-hand column - page 13, left-hand column	1-24
X	WO 2020/006267 A1 (IONIS PHARMACEUTICALS INC [US]) 2 January 2020 (2020-01-02) pages 6,39,40; claims 1-18,36,61-64,73,74; sequence 2814	1-11,22
A		12-21, 23,24
A	Reble Emma: "Investigation of Gene Splicing Variants Contributing Risk to Psychiatric Disorders", M. Sc. thesis, November 2017 (2017-11), XP093040726, ISBN: 978-0-355-45470-3 Retrieved from the Internet: URL:https://tspace.library.utoronto.ca/bit stream/1807/79394/3/Reble_Emma_C_201711_MS c_thesis.pdf [retrieved on 2023-04-20] table 3	1-24
13	WO 2017/087282 A1 (UNIV ROSALIND FRANKLIN MEDICINE & SCIENCE [US] ET AL.) 26 May 2017 (2017-05-26) claims 1-27,33; figure 1; examples 1,2	1-24
1	----- -/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/051916

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BISKUP S ET AL: "Zeroing in on LRRK2-linked pathogenic mechanisms in Parkinson's disease", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE, AMSTERDAM, NL, vol. 1792, no. 7, 10 October 2008 (2008-10-10), pages 625-633, XP026191873, ISSN: 0925-4439, DOI: 10.1016/J.BBADIS.2008.09.015 [retrieved on 2008-10-10] table 1	1-24
A	CORO PAISÁN-RUIZ ET AL: "Parkinson's Disease and Low Frequency Alleles Found Together Throughout LRRK2", ANNALS OF HUMAN GENETICS, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 73, no. 4, 21 May 2009 (2009-05-21), pages 391-403, XP071046629, ISSN: 0003-4800, DOI: 10.1111/J.1469-1809.2009.00524.X table 1	1-24
A	SECHELKUNOVA ALEKSANDRA ET AL: "Tuning of Alternative Splicing - Switch From Proto-Oncogene to Tumor Suppressor", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES, vol. 9, no. 1, 19 December 2012 (2012-12-19), pages 45-54, XP055817243, Australia ISSN: 1449-2288, DOI: 10.7150/ijbs.5194 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ijbs.com/v09p0045.pdf figure 1	1-24
A	PETERSEN ULRIKA S. S. ET AL: "Pseudoexon activation in disease by non-splice site deep intronic sequence variation - wild type pseudoexons constitute high-risk sites in the human genome", HUMAN MUTATION, vol. 43, no. 2, 27 November 2021 (2021-11-27), pages 103-127, XP055920770, US ISSN: 1059-7794, DOI: 10.1002/humu.24306 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/humu.24306 the whole document	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/051916

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2022/162020 A2 (UNIV SYDDANSK [DK]) 4 August 2022 (2022-08-04) the whole document -----	1-24
X,P	WO 2022/119881 A1 (EMENDOBIO INC [US]; EMMANUEL RAFI [IL]; GOLAN MASHIACH MICHAL [IL]) 9 June 2022 (2022-06-09) claims 1-16; sequence 64903 -----	1-24
T	Petersen Ulrika: "Pseudoexon activation, an underreported disease mechanism with a unique potential for tailored therapy", Ph. D. thesis, 14 March 2023 (2023-03-14), XP093040720, DOI: 10.21996/0zmx-jz18 Retrieved from the Internet: URL:https://findresearcher.sdu.dk/ws/porta lfiles/portal/226583494/PhD_thesis_Ulrika_ Petersen_e_pub.pdf [retrieved on 2023-04-20] the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/051916

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/051916**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-24 (partially)

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2023/051916

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-24 (partially)

A composition comprising a splice switching oligonucleotide (SSO) for use as a medicament, said composition comprising an SSO complementary or substantially complementary to a region within a nucleic acid having at least 90% sequence identity to any of SEQ ID NO: 217.

2-30. claims: 1-24 (partially)

A composition comprising a splice switching oligonucleotide (SSO) for use as a medicament, wherein in each separate invention said composition comprises an SSO complementary or substantially complementary to a region within a nucleic acid selected from the group consisting of a nucleic acid sequence having at least 90% sequence identity to any of SEQ ID NOs: 218-294.

31. claims: 25-42

A method for identifying a subject who is likely eligible for allele-specific SSO-based pseudoexon inclusion treatment of a dysfunctional or disease-causing gene, the method comprising- determining in a biological sample from said subject the presence of absence of heterozygosity in a pseudoexon of the dysfunctional or disease-causing gene; wherein if the subject is heterozygous for a sequence variation (SNP) in the 5' splice site and/or the 3' splice site, preferably the 5' splice site of the function-disabling pseudoexon, said subject is likely eligible for allele-specific SSO-based pseudoexon inclusion treatment; or wherein if the subject is not heterozygous for a sequence variation (SNP) in the 5' splice site and/or the 3' splice site of the function-disabling pseudoexon, said subject is likely not eligible for allele-specific SSO-based pseudoexon inclusion treatment; wherein said SSO is complementary or substantially complementary to a target pre-mRNA of the dysfunctional or disease-causing gene, said target pre-mRNA comprising:- a function-disabling pseudoexon comprising: o at the 5'-end a 3' splice site; and o at the 3'-end a 5' splice site.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/051916

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017060731 A1	13-04-2017	AU 2016334804 A1	26-04-2018
		AU 2022204606 A1	21-07-2022
		CA 3000971 A1	13-04-2017
		CN 108603230 A	28-09-2018
		EP 3359685 A1	15-08-2018
		IL 258528 A	31-05-2018
		JP 6923517 B2	18-08-2021
		JP 2018531600 A	01-11-2018
		JP 2021180669 A	25-11-2021
		KR 20180098528 A	04-09-2018
		KR 20220105174 A	26-07-2022
		SG 11201802870R A	30-05-2018
		US 2017101641 A1	13-04-2017
		US 2019264211 A1	29-08-2019
		US 2021155936 A1	27-05-2021
		WO 2017060731 A1	13-04-2017
WO 2020191212 A1	24-09-2020	CA 3162618 A1	24-09-2020
		EP 3942049 A1	26-01-2022
		US 2021380982 A1	09-12-2021
		US 2022154182 A1	19-05-2022
		WO 2020191212 A1	24-09-2020
WO 2019040923 A1	28-02-2019	AU 2018322319 A1	09-04-2020
		AU 2021261909 A1	02-12-2021
		BR 112020003591 A2	01-09-2020
		CA 3073515 A1	28-02-2019
		CN 111278991 A	12-06-2020
		CN 114645048 A	21-06-2022
		EP 3673080 A1	01-07-2020
		GB 2582457 A	23-09-2020
		GB 2594767 A	10-11-2021
		GB 2599884 A	13-04-2022
		IL 272761 A	30-04-2020
		JP 6827148 B2	10-02-2021
		JP 2020189874 A	26-11-2020
		JP 2020534802 A	03-12-2020
		KR 20200045517 A	04-05-2020
		KR 20210130274 A	29-10-2021
		SG 10202108375X A	29-09-2021
		SG 11202001590R A	30-03-2020
		US 2020024603 A1	23-01-2020
		US 2020024606 A1	23-01-2020
		US 2021309996 A1	07-10-2021
		WO 2019040923 A1	28-02-2019
WO 2020006267 A1	02-01-2020	AR 116102 A1	31-03-2021
		AU 2019294838 A1	07-01-2021
		BR 112020024564 A2	06-04-2021
		CA 3104676 A1	02-01-2020
		CL 2020003309 A1	19-07-2021
		CN 112400019 A	23-02-2021
		CO 2020015256 A2	21-12-2020
		CR 20210044 A	24-06-2021
		EA 202190140 A1	20-05-2021
		EP 3814503 A1	05-05-2021
		IL 279632 A	01-03-2021
		JP 2021530204 A	11-11-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/051916

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		KR 20210025055 A	08-03-2021
		PE 20210518 A1	17-03-2021
		PH 12021500003 A1	13-09-2021
		SG 11202011864X A	30-12-2020
		TW 202035691 A	01-10-2020
		US 11332746 B1	17-05-2022
		US 2023114930 A1	13-04-2023
		UY 38282 A	31-12-2019
		WO 2020006267 A1	02-01-2020

WO 2017087282 A1	26-05-2017	EP 3377629 A1	26-09-2018
		US 2017137826 A1	18-05-2017
		WO 2017087282 A1	26-05-2017

WO 2022162020 A2	04-08-2022	NONE	

WO 2022119881 A1	09-06-2022	NONE	

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 3/00 (2006.01)
 A 6 1 P 1/16 (2006.01)
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7088(2006.01)
 A 6 1 K 31/712 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6869 Z
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 3/00
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 27/02
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 31/712
 A 6 1 P 29/00

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

レゴーズヴェンゲット 4 8

(72)発明者 ホルム リセ ローレ

デンマーク王国 4 7 0 0 ネストヴェズ テグルヴェアクスバイ 6 4

(72)発明者 ペーターセン ウルリカ シモーネ スパングスベルグ

デンマーク王国 5 0 0 0 オーデンセ シー 3 . 4 . ホルセドーレ 1 8

(72)発明者 ブルーン ギッテ ホフマン

デンマーク王国 5 2 6 0 オーデンセ エス ルグマルケン 2 2

F ターム (参考) 4B063 QQ02 QQ42 QQ49 QQ52 QR32 QS24 QS34

4C086 AA01 AA02 EA16 NA14 ZA01 ZA15 ZA33 ZA75 ZB11 ZB26
 ZC21