

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6618910号

(P6618910)

(45) 発行日 令和1年12月11日(2019.12.11)

(24) 登録日 令和1年11月22日(2019.11.22)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

A 6 1 K 31/712 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 3/08 (2006.01)

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 Z N A Z

A 6 1 K 31/712

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 3/08

A 6 1 P 3/10

請求項の数 18 (全 101 頁)

(21) 出願番号 特願2016-540437 (P2016-540437)  
 (86) (22) 出願日 平成26年9月5日(2014.9.5)  
 (65) 公表番号 特表2016-533761 (P2016-533761A)  
 (43) 公表日 平成28年11月4日(2016.11.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/054384  
 (87) 国際公開番号 W02015/035231  
 (87) 国際公開日 平成27年3月12日(2015.3.12)  
 審査請求日 平成29年9月4日(2017.9.4)  
 (31) 優先権主張番号 61/874,261  
 (32) 優先日 平成25年9月5日(2013.9.5)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/932,195  
 (32) 優先日 平成26年1月27日(2014.1.27)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 515192368  
 サレプタ セラピューティクス、インコー  
 ポレイテッド  
 アメリカ合衆国 O 2 1 4 2 マサチュー  
 セッツ州、ケンブリッジ、スイート 7  
 ファースト ストリート 2 1 5  
 (73) 特許権者 507192415  
 マードック ユニバーシティ  
 オーストラリア国ウェスタンオーストラリ  
 ア州6 1 5 O, マードック, サウス・スト  
 リート  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼにおけるアンチセンス誘導エクソン2 包含

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

10 ~ 40 個のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのアンチセンスオリゴマー化合物であって、

ホスホルアミダートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー (PMO)、ペプチド核酸 (PNA)、ロックド核酸 (LNA)、ホスホロチオアートオリゴマー、トリシクロ-DNAオリゴマー、トリシクロ-ホスホロチオアートオリゴマー、2'-O-Me-ホスホロチオアートオリゴマー、または前記の任意の組み合わせから選択される非天然化学骨格；および

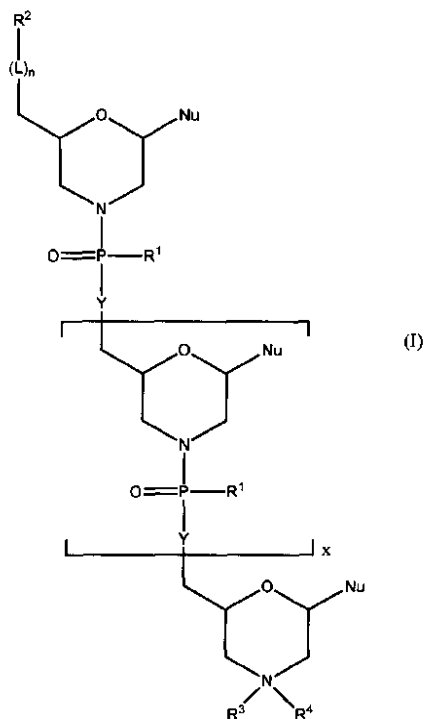
ヒト酸性 $\alpha$ -グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNA のイントロン1 (配列番号1)、イントロン2 (配列番号2)、またはエクソン2 (配列番号3) 内の領域に相補的なターゲティング配列

を含み、前記ターゲティング配列が、配列番号 5、6、9、11、13、24、50、54、72、73、77、82 および 83 (ここで、X がウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される、アンチセンスオリゴマー化合物。

【請求項2】

式 (I) :

## 【化 4 3】



10

20

(式中、

各 Nu は、共にターゲティング配列を形成する核酸塩基であり；

x は 8 ～ 38 の整数であり；

各 Y は、独立して、O または -NR<sup>a</sup> から選択され、R<sup>a</sup> は、水素、-T<sup>1</sup>-NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>、および細胞透過性ペプチドからなる群から選択され；

R<sup>c</sup> は、水素、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub> アルキル、アラルキル、および -C(=NH)NH<sub>2</sub> からなる群から選択され、

R<sup>d</sup> は、水素、アラルキル、および C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub> アルキルからなる群から選択され、または

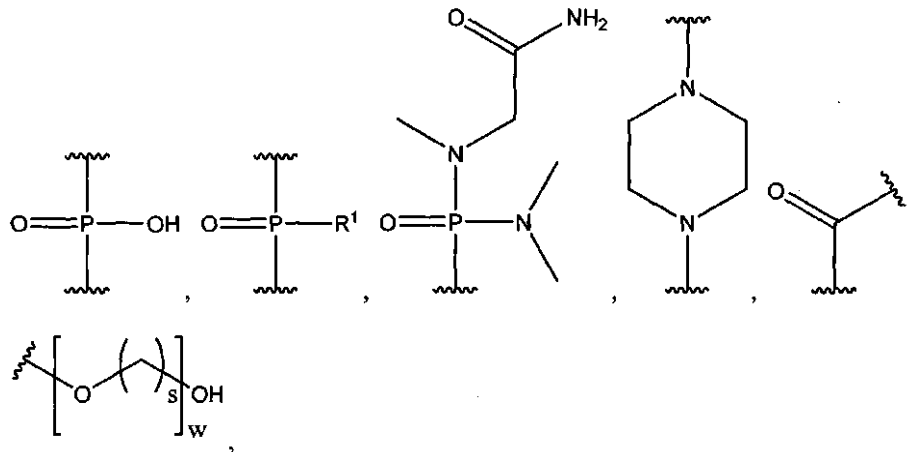
30

R<sup>c</sup> および R<sup>d</sup> がそれぞれ独立して C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub> アルキルまたはアラルキルである場合、R<sup>c</sup> および R<sup>d</sup> は窒素原子と付着して 5～7 員環を形成し、前記環は、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub> アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され、

R<sup>e</sup> は、電子対、水素、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub> アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

各 L は、

## 【化 4 4】



10

および細胞透過性ペプチドからなる群から独立して選択され、 $w$  は 3 ~ 20 から選択される整数であり、 $s$  は 1 ~ 8 から選択される整数であり；

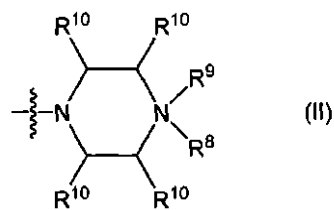
$n$  は 0 ~ 3 の整数であり；

各  $R^1$  は、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-NR^5R^6$ 、 $-OR^7$ 、

式 (II) 部分：

## 【化 4 5】

20



(式中、

$R^8$  は、水素、メチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-Z-T^2-NHC(=NH)NH_2$ 、および細胞透過性ペプチドからなる群から選択され、 $Z$  はカルボニルまたは直接結合であり、

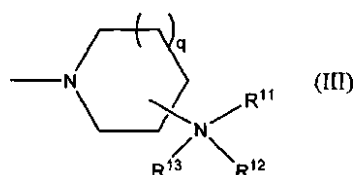
30

$R^9$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

各  $R^{10}$  は、水素またはメチルから独立して選択される)；および

式 (III) 部分：

## 【化 4 6】



40

(式中、

$q$  は 0 ~ 2 の整数であり、

$R^{11}$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、アラルキル、および  $-C(=NH)NH_2$  からなる群から選択され、

$R^{12}$  は、水素、アラルキル、および  $C_1 \sim C_6$  アルキルからなる群から選択され、または

$R^{11}$  および  $R^{12}$  は窒素原子と付着して 5 ~ 7 員環を形成し、前記環は、 $C_1 \sim C_6$

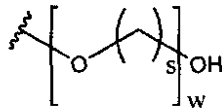
50

アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され、

$R^{1-3}$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択される) からなる群から独立して選択され、

$R^2$  は、水素、OH、ヌクレオチド、細胞透過性ペプチド、式

【化 47】

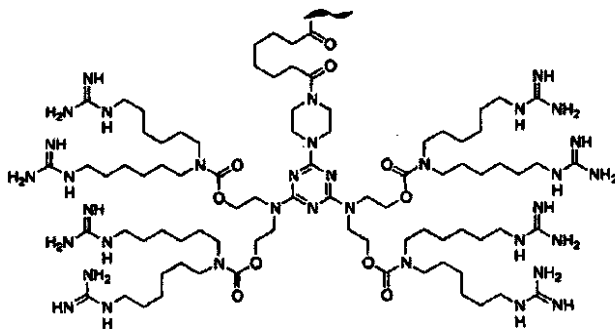


10

の部分、トリチル、 $-C(=O)OR^f$ 、およびアシルからなる群から選択され、 $R^f$  は、1つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分によって必要に応じて置換された  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、または  $R^2$  は存在せず；

$R^3$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ヌクレオチド、細胞透過性ペプチド、 $-C(=NH)NH_2$ 、トリチル、 $-C(=O)OR^g$ 、アシル、および式

【化 48】



20

の部分からなる群から選択され、

$R^g$  は、1つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分によって必要に応じて置換された  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、

$R^4$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアシルからなる群から選択され、

$R^5$  は水素またはメチルから独立して選択され；

$R^6$  および  $R^7$  は、水素または  $-T^3-NR^cR^dR^e$  から独立して選択され；

$T^1$ 、 $T^2$ 、および  $T^3$  の各々は、独立して、アルキル基、アルコキシ基、もしくはアルキルアミノ基、またはその組み合わせを含む 18 原子長までの任意選択的なリンカーであり、

ここで、前記ターゲティング配列が、ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNA のイントロン 1 (配列番号 1)、イントロン 2 (配列番号 2)、またはエクソン 2 (配列番号 3) 内の領域に相補的であり、前記ターゲティング配列が、配列番号 5、6、9、11、13、24、50、54、72、73、77、82 および 83 (ここで、X がウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される) の化合物またはその薬学的に許容され得る塩。

40

【請求項 3】

各  $Nu$  が、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、シトシン、ヒポキサンチン、2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、C5-プロピニル修飾ピリミジン、および 10-(9-(アミノエトキシ)フェノキサジン) からなる群から独立して選択される、請求項 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

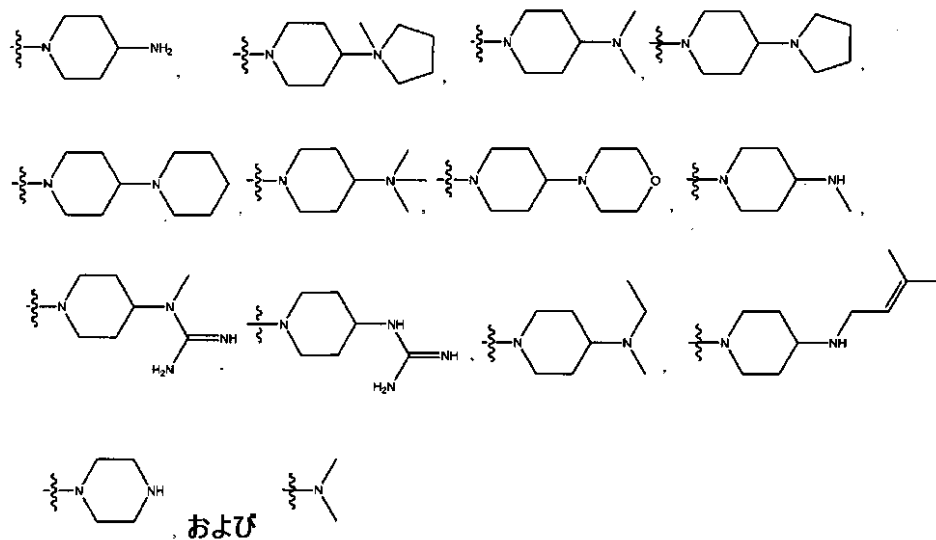
各  $R^1$  が  $-N(CH_3)_2$  である、請求項 2 に記載の化合物。

50

## 【請求項 5】

少なくとも 1 つの  $R^1$  が、

## 【化 49】



10

からなる群から選択される、請求項 2 に記載の化合物。

## 【請求項 6】

20

50 ~ 90 % の  $R^1$  基が  $-N(CH_3)_2$  である、請求項 2 に記載の化合物。

## 【請求項 7】

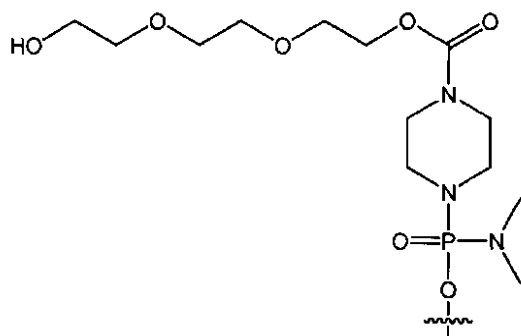
66 % の  $R^1$  基が  $-N(CH_3)_2$  である、請求項 2 に記載の化合物。

## 【請求項 8】

$n$  は 2 であり；

$R^2$  と  $L$  が共に式：

## 【化 50】



30

を形成し；

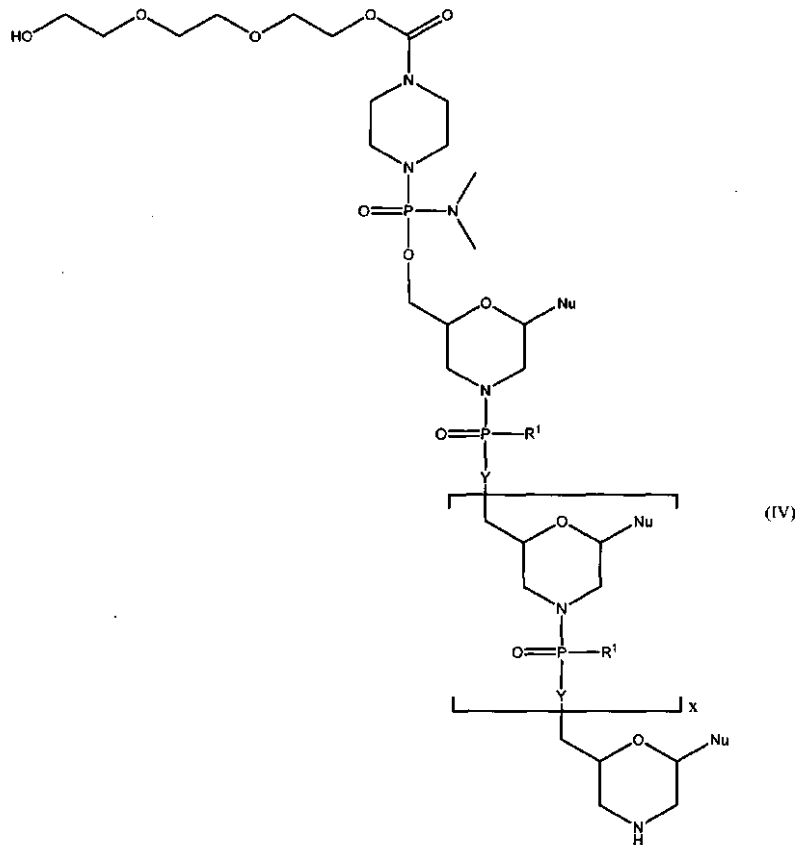
$Y$  は各部位で  $O$  である、請求項 2 に記載の化合物。

## 【請求項 9】

40

式 (IV)：

## 【化 5 1】



(式中、

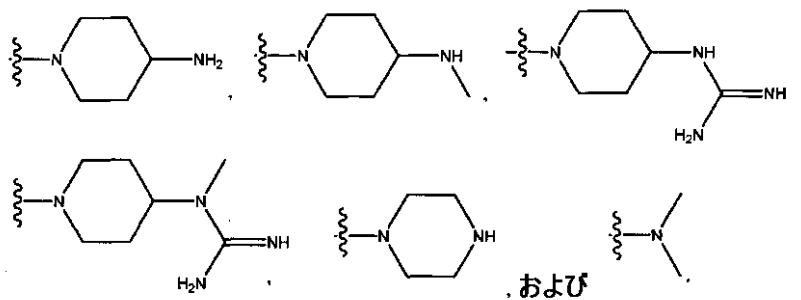
各 Nu は、共にターゲティング配列を形成する核酸塩基であり；

x は 15 ~ 25 の整数であり；

各 Y は O であり；

各 R<sup>1</sup> は、：

## 【化 5 2】



からなる群から独立して選択され、

少なくとも 1 つの R<sup>1</sup> は -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> であり、

ここで、前記ターゲティング配列は配列番号 5、6、9、11、13、24、50、54、72、73、77、82 および 83 (ここで、X はウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される) の化合物またはその薬学的に許容され得る塩。

## 【請求項 10】

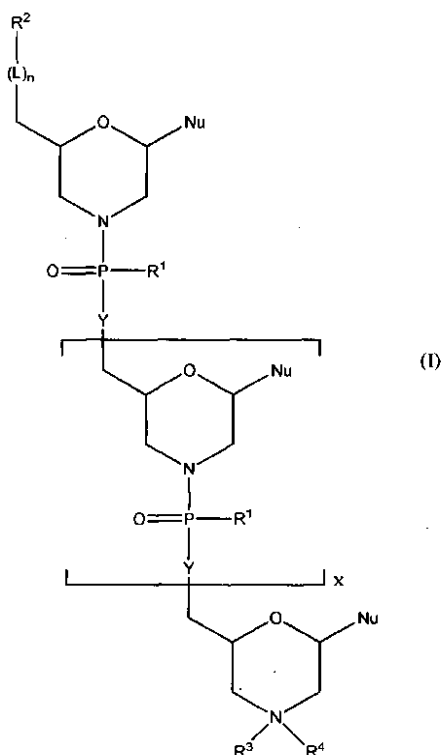
10 ~ 40 個のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのアンチセンスオリゴマー化合物および薬学的に許容され得るキャリアを含む薬学的組成物であって、前記化合物が、ホスホルアミダートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー (PMO)、ペプチド核酸 (PNA)、ロックド核酸 (LNA)、ホスホロチオアートオリゴマー、トリシクロ-DNAオリゴマー、トリシクロ-ホスホロチオアートオリゴ

ヒト酸性 - グルコシダーゼ ( G A A ) 遺伝子のプレ - m R N A のイントロン 1 ( 配列番号 1 )、イントロン 2 ( 配列番号 2 )、またはエクソン 2 ( 配列番号 3 ) 内の領域に相補的なターゲティング配列

【請求項 1 1】

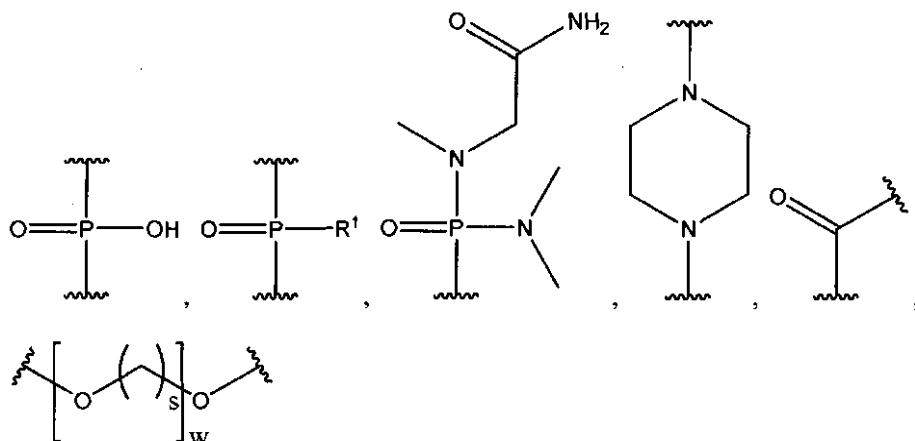
10

【化 5 3】



各  $L$  は、

## 【化 5 4】



10

および細胞透過性ペプチドからなる群から独立して選択され、 $w$  は 3 ~ 20 から選択される整数であり、 $s$  は 1 ~ 8 から選択される整数であり；

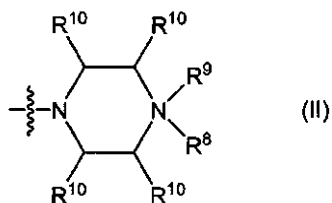
$n$  は 0 ~ 3 の整数であり；

各  $R^1$  は、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-NR^5R^6$ 、 $-OR^7$ 、

式 (I I) 部分：

## 【化 5 5】

20



(式中、

$R^8$  は、水素、メチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-Z-T^2-NHC(=NH)NH_2$ 、および細胞透過性ペプチドからなる群から選択され、 $Z$  はカルボニルまたは直接結合であり、

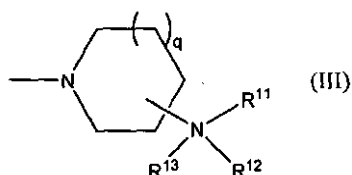
30

$R^9$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

各  $R^{10}$  は、水素またはメチルから独立して選択される)；および

式 (I I I) 部分：

## 【化 5 6】



40

(式中、

$q$  は 0 ~ 2 の整数であり；

$R^{11}$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、アラルキル、および  $-C(=NH)NH_2$  からなる群から選択され、

$R^{12}$  は、水素、アラルキル、および  $C_1 \sim C_6$  アルキルからなる群から選択され、または

$R^{11}$  および  $R^{12}$  は窒素原子と付着して 5 ~ 7 員環を形成し、前記環は、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必

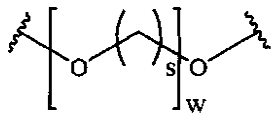
50



要に応じて置換され；

$R^{13}$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択される）からなる群から独立して選択され；

$R^2$  は、水素、OH、ヌクレオチド、細胞透過性ペプチド、式【化57】

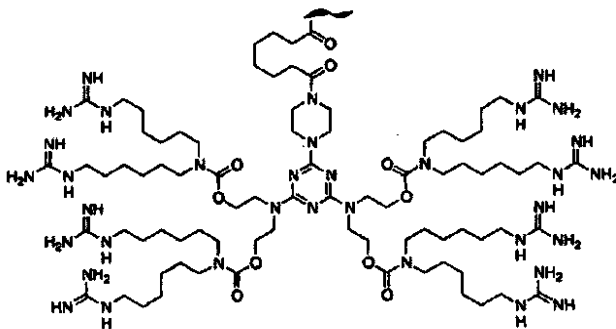


10

の部分、トリチル、 $-C(=O)OR^f$ 、およびアシルからなる群から選択され、 $R^f$  は、1つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分によって必要に応じて置換された  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、または  $R^2$  は存在せず；

$R^3$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ヌクレオチド、細胞透過性ペプチド、 $-C(=NH)NH_2$ 、トリチル、アシル、および式

【化58】



20

の部分からなる群から選択され、

$R^8$  は、1つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分によって必要に応じて置換された  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり；

30

$R^4$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアシルからなる群から選択され、

$R^5$  は水素またはメチルから独立して選択され；

$R^6$  および  $R^7$  は、水素または  $-T^3-NR^cR^dR^e$  から独立して選択され；

$T^1$ 、 $T^2$ 、および  $T^3$  の各々は、独立して、アルキル基、アルコキシ基、もしくはアルキルアミノ基、またはその組み合わせを含む18原子長までの任意選択的なリンカーであり、

ここで、前記ターゲティング配列が、ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNAのイントロン1 (配列番号1)、イントロン2 (配列番号2)、またはエクソン2 (配列番号3) 内の領域に相補的である) の化合物またはその薬学的に許容され得る塩、および

40

薬学的に許容され得るキャリア

を含み、前記ターゲティング配列が、配列番号5、6、9、11、13、24、50、54、72、73、77、82および83 (ここで、Xがウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される、薬学的組成物。

【請求項12】

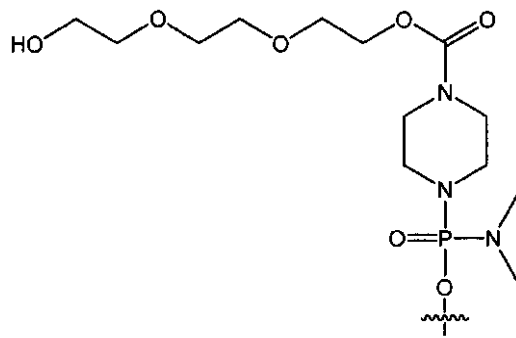
各  $R^1$  が  $-N(CH_3)_2$  である、請求項11に記載の薬学的組成物。

【請求項13】

nは2であり；

$R^2$  とLが共に式：

## 【化 5 9】



10

を形成し；

Y は各部位で O である、請求項 11 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 14】

II 型糖原貯蔵障害の処置を必要とする被験体における II 型糖原貯蔵障害の処置のための組成物であって、有効量の以下：

ホスホリアミダートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー（PMO）、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、ホスホロチオアートオリゴマー、トリシクロ-DNAオリゴマー、トリシクロ-ホスホロチオアートオリゴマー、2'-O-Me-ホスホロチオアート（phosphorothioate）オリゴマー、または前記の任意の組み合わせから選択される非天然化学骨格；および

20

ヒト酸性-グルコシダーゼ（GAA）遺伝子のプレ-mRNAのイントロン1（配列番号1）、イントロン2（配列番号2）、またはエクソン2（配列番号3）内の領域に相補的なターゲティング配列

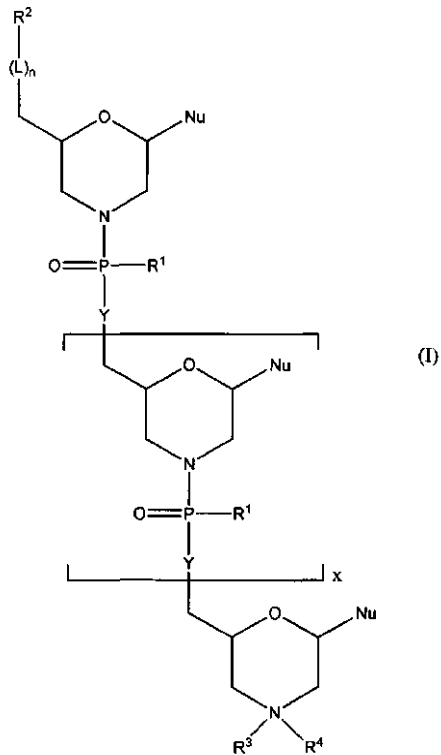
を含む10～40個のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのアンチセンスオリゴマー化合物を含み、前記ターゲティング配列が、配列番号5、6、9、11、13、24、50、54、72、73、77、82および83（ここで、Xがウラシル（U）またはチミン（T）から選択される）から選択される、組成物。

## 【請求項 15】

30

II 型糖原貯蔵障害の処置を必要とする被験体における II 型糖原貯蔵障害の処置のための組成物であって、有効量の式（I）：

## 【化 60】



10

20

(式中、

各 Nu は、共にターゲティング配列を形成する核酸塩基であり；

x は 8 ～ 38 の整数であり；

各 Y は、独立して、O または -NR<sup>a</sup> から選択され、R<sup>a</sup> は、水素、-T<sup>1</sup>-NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>、R<sup>e</sup>、および細胞透過性ペプチドからなる群から選択され；

R<sup>c</sup> は、水素、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub> アルキル、アラルキル、および -C(=NH)NH<sub>2</sub> からなる群から選択され、

R<sup>d</sup> は、水素、アラルキル、および C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub> アルキルからなる群から選択され、または

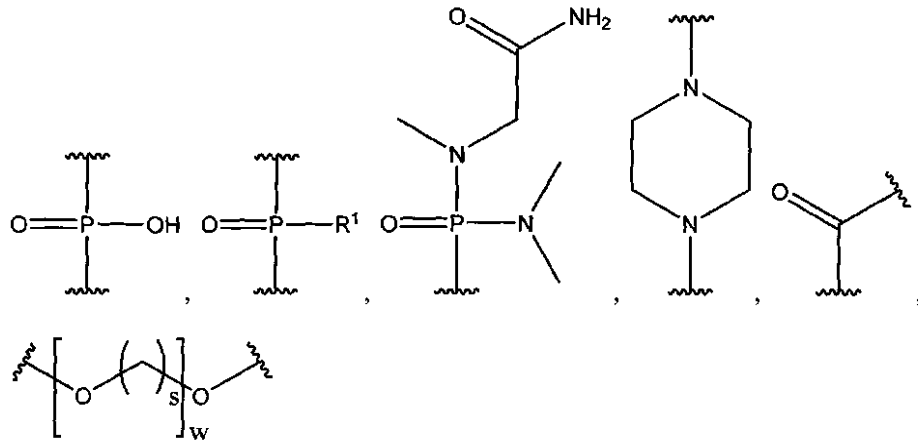
30

R<sup>c</sup> および R<sup>d</sup> がそれぞれ独立して C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub> アルキルまたはアラルキルである場合、R<sup>c</sup> および R<sup>d</sup> は窒素原子と付着して 5～7 員環を形成し、前記環は、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub> アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され、

R<sup>e</sup> は、電子対、水素、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub> アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

各 L は、

## 【化 6 1】



10

および細胞透過性ペプチドからなる群から独立して選択され、 $w$  は 3 ~ 20 から選択される整数であり、 $s$  は 1 ~ 8 から選択される整数であり；

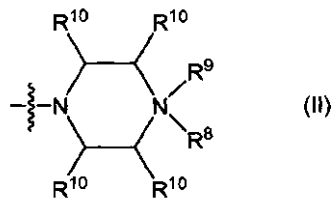
$n$  は 0 ~ 3 の整数であり；

各  $R^1$  は、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-NR^5R^6$ 、 $-OR^7$ 、

式 (II) 部分：

## 【化 6 2】

20



(式中、

$R^8$  は、水素、メチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-Z-T^2-NHC(=NH)NH_2$ 、および細胞透過性ペプチドからなる群から選択され、 $Z$  はカルボニルまたは直接結合であり、

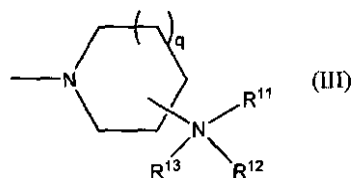
30

$R^9$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

各  $R^{10}$  は、水素またはメチルから独立して選択される)；および

式 (III) 部分：

## 【化 6 3】



40

(式中、

$q$  は 0 ~ 2 の整数であり；

$R^{11}$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、アラルキル、および  $-C(=NH)NH_2$  からなる群から選択され、

$R^{12}$  は、水素、アラルキル、および  $C_1 \sim C_6$  アルキルからなる群から選択され、または

$R^{11}$  および  $R^{12}$  は窒素原子と付着して 5 ~ 7 員環を形成し、前記環は、 $C_1 \sim C_6$

50

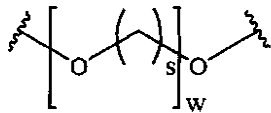
アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され；

$R^{13}$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択される) からなる群から独立して選択され；

$R^2$  は、水素、OH、ヌクレオチド、細胞透過性ペプチド

式

【化 6 4】

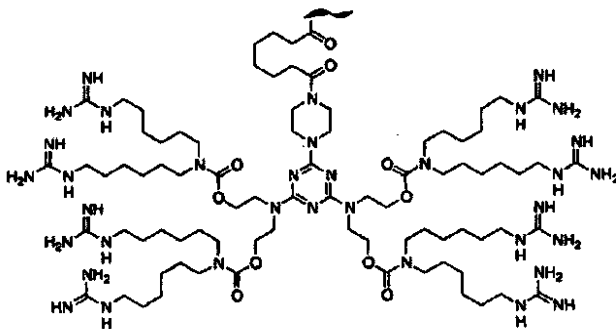


10

の部分、トリチル、 $-C(=O)OR^f$ 、およびアシルからなる群から選択され、 $R^f$  は、1つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分によって必要に応じて置換された  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、または  $R^2$  は存在せず；

$R^3$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ヌクレオチド、細胞透過性ペプチド、 $-C(=NH)NH_2$ 、トリチル、アシル、および式

【化 6 5】



20

の部分からなる群から選択され、

$R^g$  は、1つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分によって必要に応じて置換された  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、

$R^4$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアシルからなる群から選択され、

$R^5$  は水素またはメチルから独立して選択され；

$R^6$  および  $R^7$  は、水素または  $-T^3-NR^cR^dR^e$  から独立して選択され；

$T^1$ 、 $T^2$ 、および  $T^3$  の各々は、独立して、アルキル基、アルコキシ基、もしくはアルキルアミノ基、またはその組み合わせを含む 18 原子長までの任意選択的なリンカーであり、

ここで、前記ターゲティング配列が、ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNA のイントロン 1 (配列番号 1)、イントロン 2 (配列番号 2)、またはエクソン 2 (配列番号 3) 内の領域に相補的である) のアンチセンスオリゴマー化合物またはその薬学的に許容され得る塩を含み、前記ターゲティング配列が、配列番号 5、6、9、11、13、24、50、54、72、73、77、82 および 83 (ここで、X がウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される、組成物。

【請求項 16】

各  $R^1$  が  $-N(CH_3)_2$  である、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

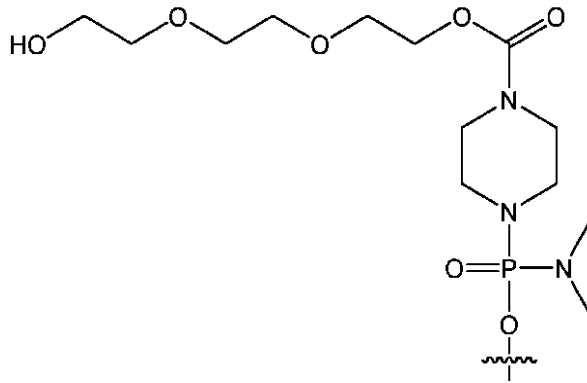
n は 2 であり；

$R^2$  と L は共に式：

30

40

## 【化 6 6】



10

を形成し；

Y は各部位で O である、請求項 15 に記載の組成物。

## 【請求項 18】

ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ - mRNA のイントロン 1 (配列番号 1)、エクソン 2 (配列番号 2)、またはイントロン 2 (配列番号 3) 内の領域に特異的にハイブリッド形成するのに十分な長さおよび相補性のターゲティング配列を含むアンチセンスオリゴマーであって、前記ターゲティング配列が、配列番号 5、6、9、11、13、24、50、54、72、73、77、82 および 83 (ここで、X がウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される、アンチセンスオリゴマー。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2013 年 9 月 5 日に出願された米国特許出願第 61/874,261 号および 2014 年 1 月 27 日に出願された米国特許出願第 61/932,195 号の、35 U.S.C. § 119 (e) の下での優先権を主張し、それぞれの出願は、その全体が参考として援用される。

30

## 【0002】

配列表についての記載

本願に付随する配列表は、紙のコピーの代わりにテキストフォーマットで提供され、そして本明細書に参考として援用される。配列表を含むテキストファイルの名称は SATH\_001\_02WO\_ST25.txt である。テキストファイルは約 62 KB であり、2014 年 9 月 5 日に作成され、EFS-Web を通じて電子的に提出されている。

## 【0003】

背景

開示の分野

本開示は、II 型糖原貯蔵障害 (GSD-II) (ポンペ病、糖原病 II、酸性マルターゼ欠損症 (AMD)、酸性 - グルコシダーゼ欠損症、およびリソソーム - グルコシダーゼ欠損症としても公知) の処置のためのエクソン包含の誘導のためのアンチセンスオリゴマーおよび関連組成物ならびに方法に関し、より具体的には、エクソン 2 の包含を誘導し、それにより、回復レベルの GAA 遺伝子によってコードされる酵素的に活性な酸性 - グルコシダーゼ (GAA) タンパク質を得ることに関する。

40

## 【背景技術】

## 【0004】

関連技術の説明

選択的スプライシングにより、単一遺伝子から複数のタンパク質が産生されるので、ヒトゲノムが多数のタンパク質をコードすることができる。不適切な選択的スプライシング

50

は、ますます多くのヒト疾患にも関連する。

【0005】

GSD - II は、酸性 - グルコシダーゼ (GAA) と呼ばれる酵素の欠損に原因する遺伝性の常染色体劣性リソソーム貯蔵障害である。体内での GAA の役割は、グリコーゲンを分解することである。GAA 活性の減少または GAA 活性が存在しないことにより、罹患組織 (心臓、骨格筋 (呼吸に關与する骨格筋が含まれる)、肝臓、および神経系が含まれる) 内にグリコーゲンが蓄積される。このグリコーゲン蓄積は、GSD - II 罹患個体における進行性の筋力低下および呼吸機能不全の原因となると考えられている。GSD - II は、乳児、幼児、または成人において生じ得、発病時期および症状の重症度によって予後は様々である。臨床的には、GSD - II は、重篤 (乳児型) からより軽度 (遅発性の成人型) までの広範且つ連続的な重症度の範囲で発症し得る。患者は、最終的に呼吸機能不全で死亡する。疾患の重症度と残存する酸性 - グルコシダーゼ活性との間の相関性が高く、この活性は、遅発型で正常の 10 ~ 20 % であり、早期発症型で正常の 2 % 未満である。GSD - II は全世界での罹患数がおおよそ 5,000 ~ 10,000 人であると推定されている。

10

【0006】

この疾患の成人発症型に関連する変異は、IVS1 - 13T > G が最も一般的である。成人発症型 GSD - II 患者の 2 / 3 超で認められるので、この変異は、ヘテロ接合体で選択的に優位であり得るか、非常に古い変異である。この変異を有する成人発症型 GSD - II 個体は民族間の変動が大きく、共通始祖とすることには否定的である。

20

【0007】

GAA 遺伝子は 20 エクソンからなり、約 20 kb にわたる。3.4 kb の mRNA は、分子量がおおよそ 105 kD のタンパク質をコードする。IVS1 - 13T > G 変異により、開始コドン AUG を含むエクソン 2 (577 塩基) を喪失する。

【0008】

GSD - II の処置には薬物処置ストラテジー、食事療法、および骨髄移植が行われてきたが、大きな成果は挙げられていない。近年、GSD - II 患者にとっての新たな希望として酵素代償療法 (ERT) が実施されている。例えば、Myozyme (登録商標) (組換え GAA タンパク質薬) は、米国および欧州において 2006 年に GSD - II 疾患患者での使用が承認された。Myozyme (登録商標) は、リソソームへの送達のための GAA タンパク質表面上のマノース - 6 - リン酸 (M6P) を拠り所とする。

30

【0009】

主に RNA 下方制御のために使用されているアンチセンステクノロジーは、最近、スプライシング過程を変化させるために採用されている。多数の遺伝子の一次遺伝子転写物 (プレ - mRNA) のプロセッシングは、イントロンの除去およびエクソンの正確なスプライシングを含み、ドナースプライス部位がアクセプタースプライス部位に接合する。スプライシングは、ポジティブエクソンスプライスエンハンサー (主にエクソン内に存在する) とネガティブスプライスマチーフ (スプライスサイレンサーは主にイントロン中に存在する) とのバランスを取りながらドナースプライス部位およびアクセプタースプライス部位ならびに分枝部位 (アクセプタースプライス部位の上流) を協調的に認識する精密な過程である。

40

【0010】

GAA プレ - mRNA のスプライシングを変化させることができる有効な薬剤は、GSD - II 処置の改善に治療的に有用である可能性が高い。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

概要

本開示の実施形態は、細胞内のエクソン 2 含有 GAA コード mRNA レベルを増加させるためのアンチセンスオリゴマーおよび関連組成物ならびに方法であって、GAA 遺伝子

50

のブレ - m R N A 内の領域に特異的にハイブリッド形成するのに十分な長さおよび相補性のアンチセンスオリゴマーと細胞を接触させることを含み、アンチセンスオリゴマーの前記領域への結合が細胞内のエクソン 2 含有 G A A コード m R N A レベルを増加させる、アンチセンスオリゴマーおよび関連組成物ならびに方法に関する。

【 0 0 1 2 】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示は、ヒト酸性 - グルコシダーゼ ( G A A ) 遺伝子のブレ - m R N A のイントロン 1 ( 配列番号 1 )、エクソン 2 ( 配列番号 2 )、またはイントロン 2 ( 配列番号 3 ) 内の領域に特異的にハイブリッド形成するのに十分な長さおよび相補性のターゲティング配列を含む 1 0 ~ 4 0 個のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのアンチセンスオリゴマーに関する。

10

【 0 0 1 3 】

一定の実施形態では、本開示は、アンチセンスオリゴマー化合物であって、ホスホルアミダートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー ( P M O )、ペプチド核酸 ( P N A )、ロックド核酸 ( L N A )、ホスホロチオアートオリゴマー、トリシクロ - D N A オリゴマー、トリシクロ - ホスホロチオアートオリゴマー、2' O - M e 修飾オリゴマー、または前記の任意の組み合わせから選択される非天然化学骨格；および

ヒト酸性 - グルコシダーゼ ( G A A ) 遺伝子のブレ - m R N A のイントロン 1 ( 配列番号 1 )、イントロン 2 ( 配列番号 2 )、またはエクソン 2 ( 配列番号 3 ) 内の領域に相補的なターゲティング配列を含むアンチセンスオリゴマー化合物に関する。

20

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、表 1 に記載の G A A 配列のイントロン 1、エクソン 2、および / またはイントロン 2 内の領域に特異的にハイブリッド形成する。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、イントロンスプライスサイレンサーエレメントまたはエクソンスプライスサイレンサーエレメントに特異的にハイブリッド形成する。一定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、表 2 に記載のターゲティング配列、表 2 中のターゲティング配列の少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチドのフラグメント、または表 2 中のターゲティング配列と少なくとも 8 0 % の配列が同一のバリエーションを含む。特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、表 2 に記載のターゲティング配列からなるか、本質的になる。

30

【 0 0 1 5 】

一定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホルアミダートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー ( P M O )、P M O - X、P P M O、ペプチド核酸 ( P N A )、ロックド核酸 ( L N A )、ホスホロチオアートオリゴマー、トリシクロ - D N A オリゴマー、トリシクロ - ホスホロチオアートオリゴマー、2' O - M e 修飾オリゴマー、または前記の任意の組み合わせである。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0、または約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 個以下のカチオン性ヌクレオシド間連結を含む。一定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約または少なくとも約 1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、または 1 0 0 % のカチオン性ヌクレオシド間連結を含む。一定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約 p K a 4 . 5 と約 p K a 1 2 との間を示す約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 個、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 個、または約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 個以下のヌクレオシド間連結を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約 p K a 4 . 5 と約 p K a 1 2 との間を示す約または少なくとも約 1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、

40

50

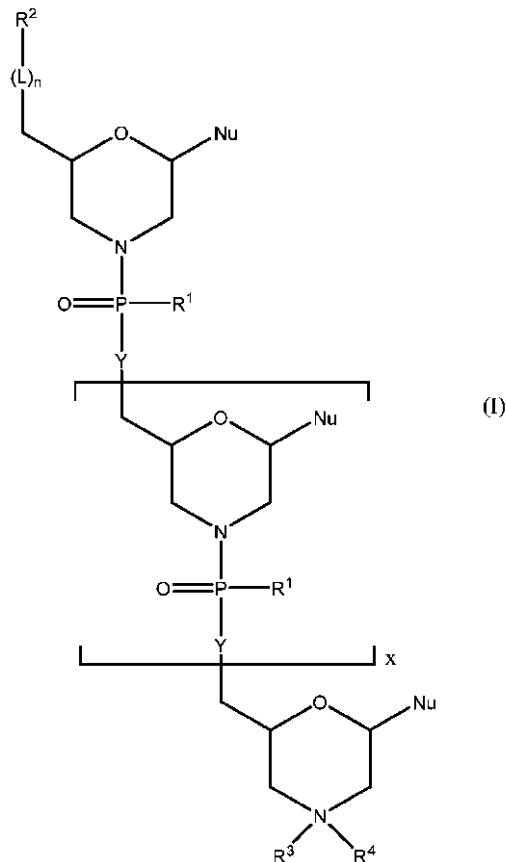


85%、90%、95%、または100%のヌクレオシド間連結を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、塩基性の窒素およびアルキル基、アリール基、またはアラルキル基の両方を含むヌクレオシド間連結を有する。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーはモルホリノを含む。

【0017】

一定の実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式(I)：

【化1】



(式中、

各Nuは、共にターゲティング配列を形成する核酸塩基であり；

xは8～38の整数であり；

各Yは、独立して、Oまたは-NR<sup>a</sup>から選択され、R<sup>a</sup>は、水素、-T<sup>1</sup>-NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>R<sup>e</sup>、および-[(C(O)CHR'<sup>1</sup>NH)<sub>m</sub>]R'<sup>1</sup>からなる群から選択され；

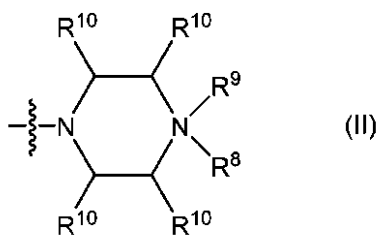
R'<sup>1</sup>は、天然に存在するアミノ酸またはその1炭素ホモログもしくは2炭素ホモログの側鎖であり、R'<sup>1</sup>は水素またはアシルから選択され、mは1～60の整数であり、R<sup>c</sup>は、水素、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、アラルキル、および-C(=NH)NH<sub>2</sub>からなる群から選択され、R<sup>d</sup>は、水素、アラルキル、およびC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルからなる群から選択され、またはR<sup>c</sup>およびR<sup>d</sup>がそれぞれ独立してC<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキルまたはアラルキルである場合、R<sup>c</sup>およびR<sup>d</sup>は窒素原子と付着して5～7員環を形成し、前記環は、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され、R<sup>e</sup>は、電子対、水素、C<sub>1</sub>～C<sub>6</sub>アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

各Lは、-P(O)<sub>2</sub>OH-、-P(O)<sub>2</sub>R<sup>1</sup>-、ピペラジニル基、カルボニル基、H(O(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>O)<sub>w</sub>-、-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>w</sub>、および-[(C(O)CHR'<sup>1</sup>NH)<sub>m</sub>]R'<sup>1</sup>からなる群から独立して選択され、wは3～20から選択される整数であり、sは1～8から選択される整数であり；

nは0～3の整数であり；

各  $R^1$  は、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-NR^5R^6$ 、 $-OR^7$ 、  
式 (II) 部分：

【化 2】

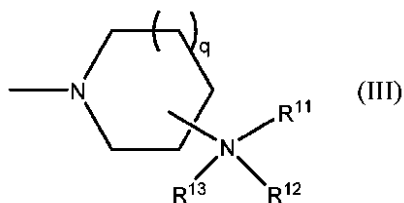


10

(式中、  
 $R^8$  は、水素、メチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-Z-T^2-NHC(=NH)NH_2$ 、  
および  $-(C(O)CHR'NH)_mR''$  からなる群から選択され、 $Z$  はカルボニルまたは直接結合であり、 $R^9$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され、各  $R^{10}$  は、水素またはメチルから独立して選択される)；  
および

式 (III) 部分：

【化 3】



20

(式中、  
 $q$  は 0 ~ 2 の整数であり、 $R^{11}$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、アラルキル、および  $-C(=NH)NH_2$  からなる群から選択され、 $R^{12}$  は、水素、アラルキル、および  $C_1 \sim C_6$  アルキルからなる群から選択され、または  $R^{11}$  および  $R^{12}$  は窒素原子と付着して 5 ~ 7 員環を形成し、前記環は、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され、 $R^{13}$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択される) からなる群から独立して選択され；

30

$R^2$  は、水素、OH、ヌクレオチド、 $-(CH_2)_mC(O)NR^fR^g$  からなる群から選択され、 $R^f$  および  $R^g$  は、H、アシル、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、および  $-(C(O)CHR'NH)_mR''$ 、 $-(C(O)CHR'NH)_mR''$ 、 $H(O(CH_2)_sO)_w-$ 、 $H(OCH_2CH_2O)_w-$ 、トリチル、 $-C(=O)OR^f$ 、およびアシルから独立して選択され、 $R^f$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分またはその組み合わせを含む  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、または  $R^2$  は存在せず；

40

$R^3$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ヌクレオチド、 $-(C(O)CHR'NH)_mR''$ 、 $-C(=NH)NH_2$ 、トリチル、 $-C(=O)OR^g$ 、アシル、 $-C(O)(CH_2)_mC(O)$ 、および  $T^4-(4-(4,6-(NR_2)-1,3,5-トリアジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)$  からなる群から選択され、 $R^g$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分またはその組み合わせを含む  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、 $T^4$  は  $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$  または  $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$  から選択され、 $R$  は  $-(CH_2)OC(O)NH(CH_2)_6NHC(NH)NH_2$  であり；

50

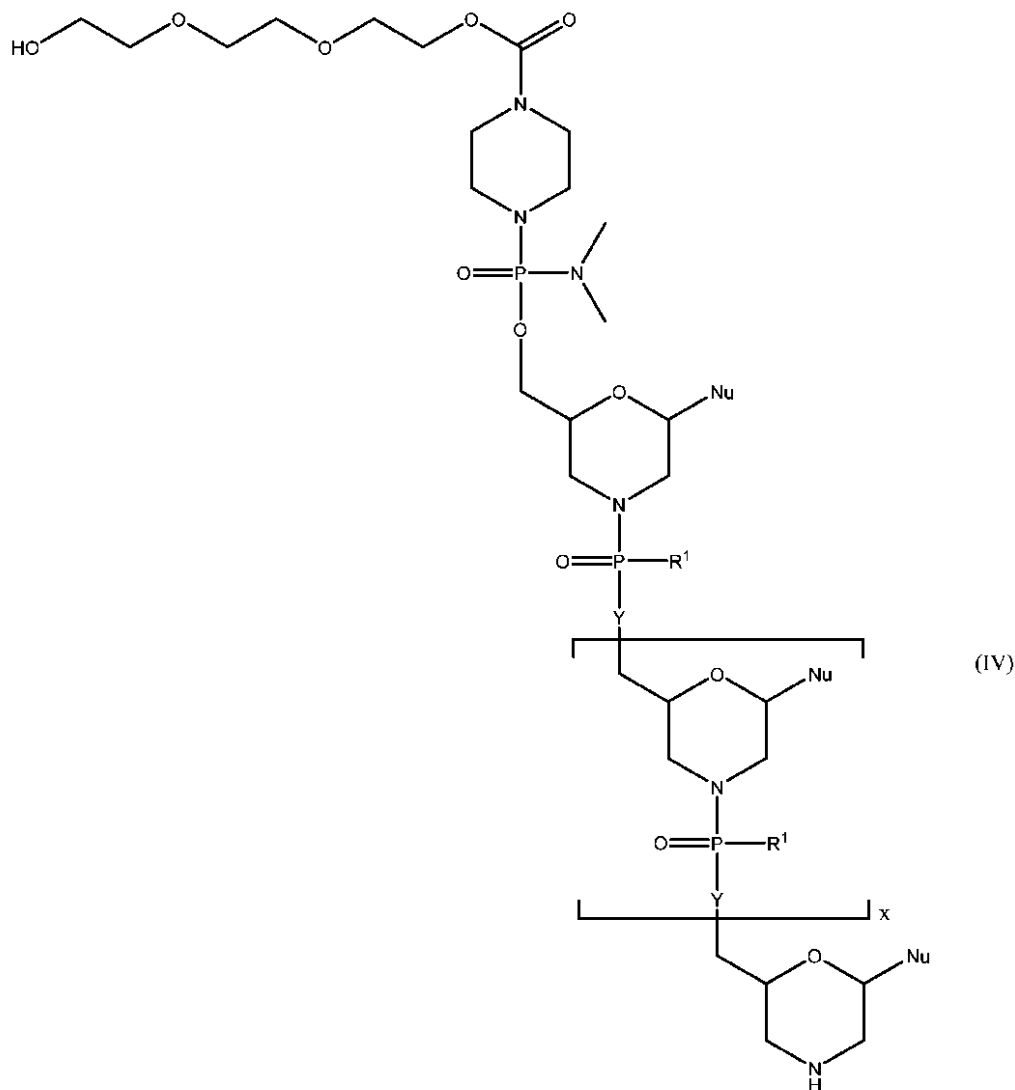
$R^4$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアシルからなる群から選択され、  
 各  $R^5$  は水素またはメチルから独立して選択され；  
 各  $R^6$  および各  $R^7$  は、水素または  $-T^3-NR^cR^dR^e$  から独立して選択され；  
 $T^1$ 、 $T^2$ 、および  $T^3$  の各々は、独立して、アルキル基、アルコキシ基、もしくはアルキルアミノ基、またはその組み合わせを含む 18 原子長までの任意選択的なリンカーであり、

ここで、ターゲティング配列は、ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNA のイントロン 1 (配列番号 1)、イントロン 2 (配列番号 2)、またはエクソン 2 (配列番号 3) 内の領域に相補的である) の化合物またはその薬学的に許容され得る塩である。

【0018】

一定の実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式 (IV)：

【化 4】



(式中、

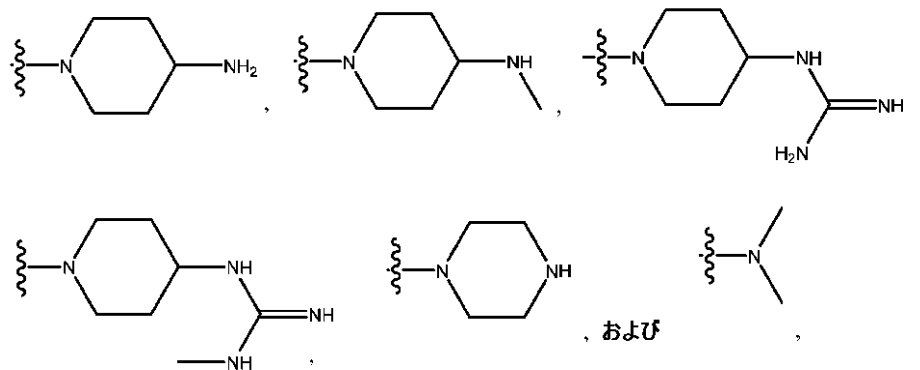
各 Nu は、共にターゲティング配列を形成する核酸塩基であり；

x は 15 ~ 25 の整数であり；

各 Y は O であり；

各  $R^1$  は、

## 【化 5】



10

(式中、少なくとも1つの $R^1$ は $-N(CH_3)_2$ である)からなる群から独立して選択され、

ここで、ターゲティング配列は配列番号4～120(ここで、Xはウラシル(U)またはチミン(T)から選択される)から選択される)の化合物またはその薬学的に許容され得る塩である。

## 【0019】

一定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、細胞取り込みを促進するペプチド部分をさらに含む。

20

## 【0020】

表2に記載のヒト酸性-グルコシダーゼ(GAA)遺伝子のプレ-mRNAのイントロン1(配列番号1)、エクソン2(配列番号2)、またはイントロン2(配列番号3)内の領域に特異的にハイブリッド形成するのに十分な長さおよび相補性のターゲティング配列を含むアンチセンスオリゴマーも開示の範囲内に含まれる。いくつかの実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号4～120(ここで、Xはウラシル(U)またはチミン(T)から選択される)から選択されるターゲティング配列の少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含む。一定の実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号4～120(ここで、Xはウラシル(U)またはチミン(T)から選択される)から選択されるターゲティング配列と80%の配列が同一である。

30

## 【0021】

特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホルアミダートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー(PMO)、PMO-X、PPMO、ペプチド核酸(PNA)、ロックド核酸(LNA)、ホスホロチオアートオリゴマー、トリシクロ-DNAオリゴマー、トリシクロ-ホスホロチオアートオリゴマー、2'-O-Me修飾オリゴマー、または前記の任意の組み合わせである。

## 【0022】

生理学的に許容され得るキャリアおよび本明細書中に記載のアンチセンスオリゴマーを含む薬学的組成物も含まれる。

## 【0023】

一定の実施形態は、細胞内のエクソン2含有酸性-グルコシダーゼ(GAA)mRNAレベルを増加させる方法であって、GAA遺伝子のプレ-mRNA内の領域に特異的にハイブリッド形成するのに十分な長さおよび相補性のアンチセンスオリゴマーと前記細胞を接触させる工程を含み、前記アンチセンスオリゴマーの前記領域への結合が細胞内のエクソン2含有GAA mRNAレベルを増加させる、方法も含む。

40

## 【0024】

いくつかの実施形態では、細胞内のエクソン2含有GAA mRNAレベルは、コントロールと比較して少なくとも約10%増加する。一定の実施形態では、細胞内の機能的GAAタンパク質レベルは、コントロールと比較して少なくとも約10%増加する。一定の実施形態では、細胞は、(アンチセンス未処置で)エクソン2含有GAA mRNAの発現を

50

減少させるそのゲノムの1つまたはそれを超える対立遺伝子中にI V S 1 - 1 3 T > G 変異を有する。

【0025】

いくつかの実施形態では、細胞はそれを必要とする被験体中に存在し、方法は被験体へのアンチセンスオリゴマーの投与を含む。いくつかの実施形態では、被験体は、II型糖原貯蔵障害(GSD-II)を有するか、有するリスクがある。本開示のいくつかの実施形態は、II型糖原貯蔵障害(GSD-II; ポンペ病)の処置を必要とする被験体におけるII型糖原貯蔵障害(GSD-II; ポンペ病)の処置方法であって、被験体に有効量の本開示のアンチセンスオリゴマーを投与する工程を含む、方法に関する。一方、一定の実施形態は、II型糖原貯蔵障害(GSD-II; ポンペ病)処置のための医薬の調製で用いるアンチセンスオリゴマーに関する。

10

【0026】

一定の実施形態では、被験体は、乳児GSD-IIを有するか有するリスクが有る。特定の実施形態では、被験体は、遅発性GSD-IIを有するか有するリスクが有る。一定の実施形態では、方法は、コントロールと比較して被験体中の1つまたはそれを超える組織中のグリコーゲンレベルを少なくとも約10%減少させる工程を含む。

【0027】

さらに、本開示は、ヒト酸性 - グルコシダーゼ(GAA)遺伝子mRNA中のエクソン2包含を検出する方法であって、配列番号121、122、または123からなる群から選択される塩基配列を含む少なくとも1つのポリメラーゼ連鎖反応プライマーを使用してGAA mRNAを増幅する工程を含む、方法も含む。

20

【0028】

本開示のこれらの態様および他の態様は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照すると明らかとなるであろう。本明細書中に開示の全ての文献は、各々が個別に組み込まれるかのようにその全体が本明細書中で参考として組み込まれる。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目1)

10~40個のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのアンチセンスオリゴマー化合物であって、

30

ホスホルアミダートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー(PMO)、ペプチド核酸(PNA)、ロックド核酸(LNA)、ホスホロチオアートオリゴマー、トリシクロ-DNAオリゴマー、トリシクロ-ホスホロチオアートオリゴマー、2'-O-Me-ホスホロチオアートオリゴマー、または前記の任意の組み合わせから選択される非天然化学骨格; および

ヒト酸性 - グルコシダーゼ(GAA)遺伝子のブレ-mRNAのイントロン1(配列番号1)、イントロン2(配列番号2)、またはエクソン2(配列番号3)内の領域に相補的なターゲティング配列

を含む、アンチセンスオリゴマー化合物。

(項目2)

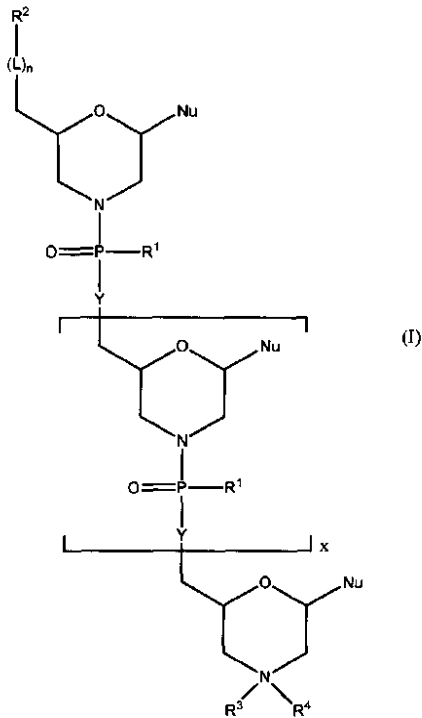
40

前記ターゲティング配列が、配列番号4~120(ここで、Xがウラシル(U)またはチミン(T)から選択される)から選択される、項目1に記載の化合物。

(項目3)

式(I):

## 【化 4 3】



10

20

(式中、

各 Nu は、共にターゲティング配列を形成する核酸塩基であり；

x は 8 ~ 38 の整数であり；

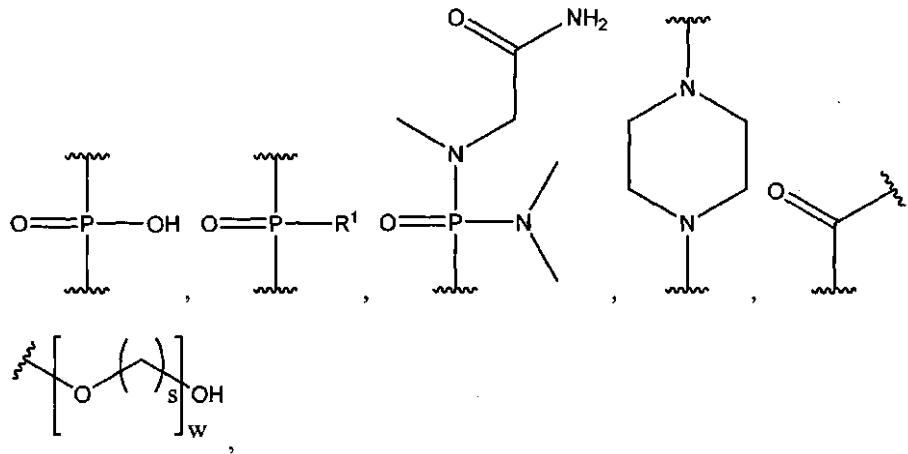
各 Y は、独立して、O または -NR<sup>a</sup> から選択され、R<sup>a</sup> は、水素、-T<sup>1</sup>-NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>R<sup>e</sup>、および細胞透過性ペプチドからなる群から選択され；R<sup>c</sup> は、水素、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、アラルキル、および -C(=NH)NH<sub>2</sub> からなる群から選択され、R<sup>d</sup> は、水素、アラルキル、および C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルからなる群から選択され、または

30

R<sup>c</sup> および R<sup>d</sup> がそれぞれ独立して C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルまたはアラルキルである場合、R<sup>c</sup> および R<sup>d</sup> は窒素原子と付着して 5 ~ 7 員環を形成し、前記環は、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され、R<sup>e</sup> は、電子対、水素、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

各 L は、

## 【化 4 4】



10

および細胞透過性ペプチドからなる群から独立して選択され、w は 3 ~ 20 から選択される整数であり、s は 1 ~ 8 から選択される整数であり；

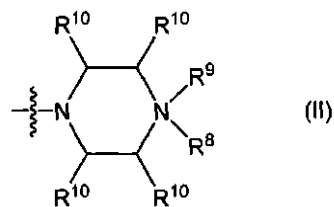
n は 0 ~ 3 の整数であり；

各  $R^1$  は、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-NR^5R^6$ 、 $-OR^7$ 、

式 (II) 部分：

20

## 【化 4 5】



(II)

(式中、

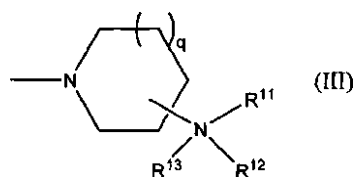
$R^8$  は、水素、メチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-Z-T^2-NHC(=NH)NH_2$ 、および細胞透過性ペプチドからなる群から選択され、Z はカルボニルまたは直接結合であり、

$R^9$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

各  $R^{10}$  は、水素またはメチルから独立して選択される)；および

式 (III) 部分：

## 【化 4 6】



(III)

(式中、

q は 0 ~ 2 の整数であり、

$R^{11}$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、アラルキル、および  $-C(=NH)NH_2$  からなる群から選択され、

50

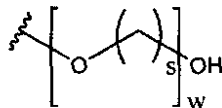
$R^{12}$  は、水素、アラルキル、および  $C_1 \sim C_6$  アルキルからなる群から選択され、または

$R^{11}$  および  $R^{12}$  は窒素原子と付着して 5 ~ 7 員環を形成し、前記環は、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され、

$R^{13}$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択される) からなる群から独立して選択され、

$R^2$  は、水素、OH、ヌクレオチド、細胞透過性ペプチド、式

【化 47】

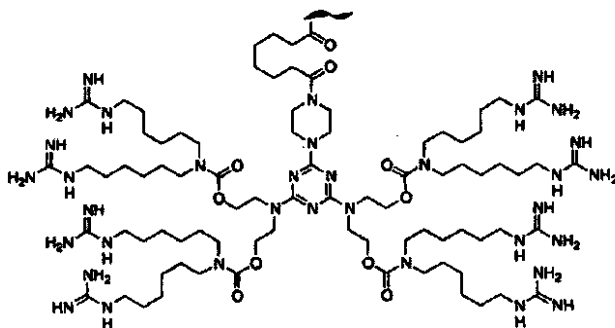


10

の部分、トリチル、 $-C(=O)OR^f$ 、およびアシルから独立して選択され、 $R^f$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分によって必要に応じて置換された  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、または  $R^2$  は存在せず；

$R^3$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ヌクレオチド、細胞透過性ペプチド、 $-C(=NH)NH_2$ 、トリチル、 $-C(=O)OR^g$ 、アシル、および式

【化 48】



20

30

の部分からなる群から選択され、

$R^g$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分によって必要に応じて置換された  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、

$R^4$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアシルからなる群から選択され、

$R^5$  は水素またはメチルから独立して選択され；

$R^6$  および  $R^7$  は、水素または  $-T^3-NR^cR^dR^e$  から独立して選択され；

$T^1$ 、 $T^2$ 、および  $T^3$  の各々は、独立して、アルキル基、アルコキシ基、もしくはアルキルアミノ基、またはその組み合わせを含む 18 原子長までの任意選択的なリンカーであり、

ここで、前記ターゲティング配列が、ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNA のイントロン 1 (配列番号 1)、イントロン 2 (配列番号 2)、またはエクソン 2 (配列番号 3) 内の領域に相補的である) の化合物またはその薬学的に許容され得る塩。

(項目 4)

各  $Nu$  が、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、シトシン、ヒポキサンチン、2, 6 - ジアミノプリン、5 - メチルシトシン、C5 - プロピニル修飾ピリミジン、および 10 - (9 - (アミノエトキシ)フェノキサジン) からなる群から独立して選択される、項

40

50



目 3 に記載の化合物。

( 項 目 5 )

各  $R^1$  が  $-N(CH_3)_2$  である、項目 3 に記載の化合物。

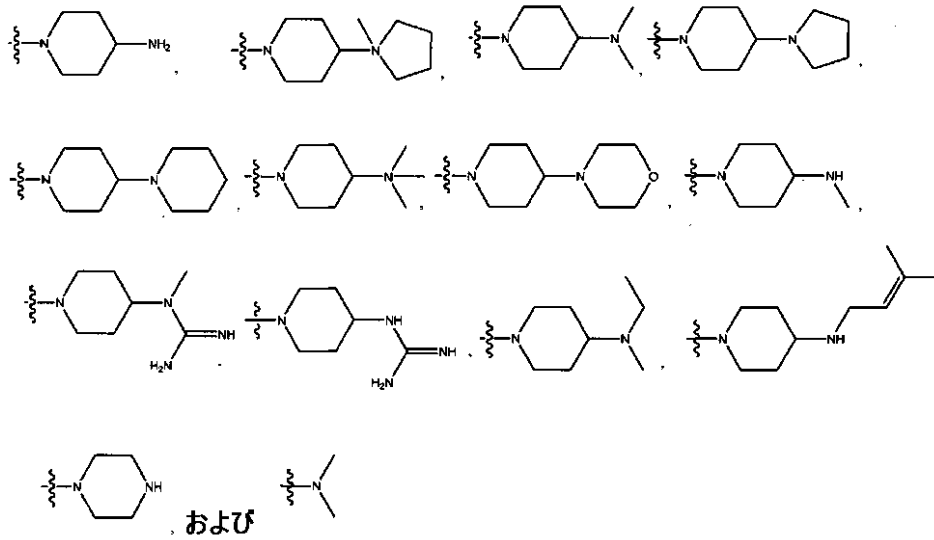
( 項 目 6 )

前記ターゲティング配列が、配列番号 4 ~ 120 (ここで、X はウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される、項目 5 に記載の化合物。

( 項 目 7 )

少なくとも 1 つの  $R^1$  が、

【化 49】



10

20

からなる群から選択される、項目 3 に記載の化合物。

( 項 目 8 )

50 ~ 90 % の  $R^1$  基が  $-N(CH_3)_2$  である、項目 3 に記載の化合物。

( 項 目 9 )

66 % の  $R^1$  基が  $-N(CH_3)_2$  である、項目 3 に記載の化合物。

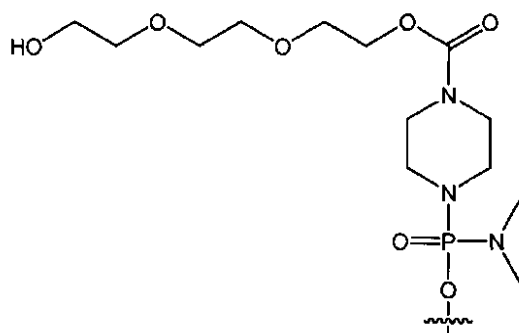
30

( 項 目 10 )

n は 2 であり；

$R^2$  と L が共に式：

【化 50】



40

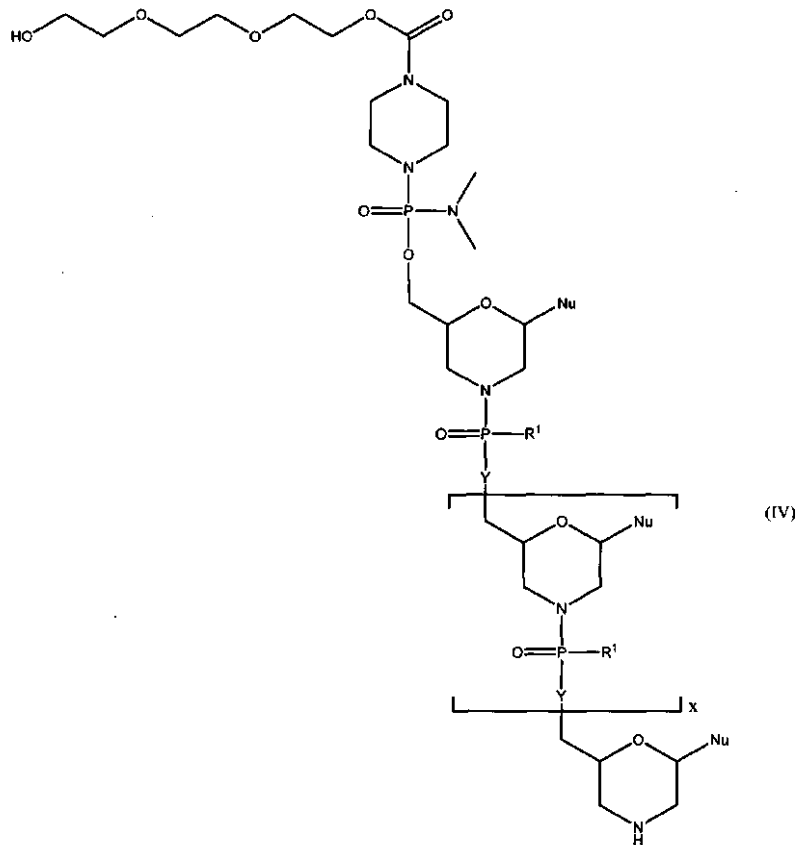
を形成し；

Y は各部位で O である、項目 3 に記載の化合物

( 項 目 11 )

式 ( I V )：

## 【化 5 1】



(式中、

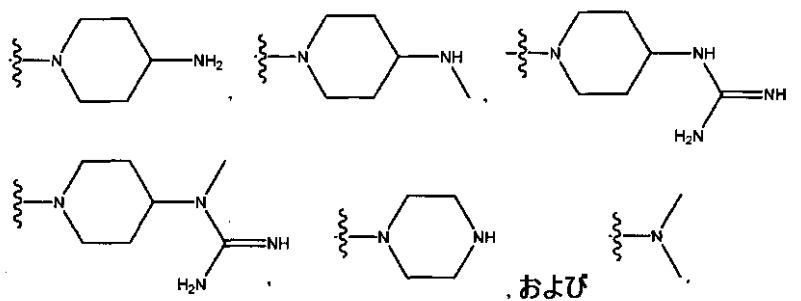
各 Nu は、共にターゲティング配列を形成する核酸塩基であり；

x は 15 ~ 25 の整数であり；

各 Y は O であり；

各 R<sup>1</sup> は、：

## 【化 5 2】



からなる群から独立して選択され、

少なくとも 1 つの R<sup>1</sup> は -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> であり、

ここで、前記ターゲティング配列は配列番号 4 ~ 120 (ここで、X はウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される) の化合物またはその薬学的に許容され得る塩。

## (項目 12)

10 ~ 40 個のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのアンチセンスオリゴマー化合物および薬学的に許容され得るキャリアを含む薬学的組成物であって、前記化合物が、ホスホルアミダートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴ

マー (PMO)、ペプチド核酸 (PNA)、ロックド核酸 (LNA)、ホスホロチオアートオリゴマー、トリシクロ-DNAオリゴマー、トリシクロ-ホスホロチオアートオリゴマー、2'-O-Me-ホスホロチオアートオリゴマー、または前記の任意の組み合わせから選択される非天然化学骨格；および

ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNAのイントロン1 (配列番号1)、イントロン2 (配列番号2)、またはエクソン2 (配列番号3) 内の領域に相補的なターゲティング配列

を含む、薬学的組成物。

(項目13)

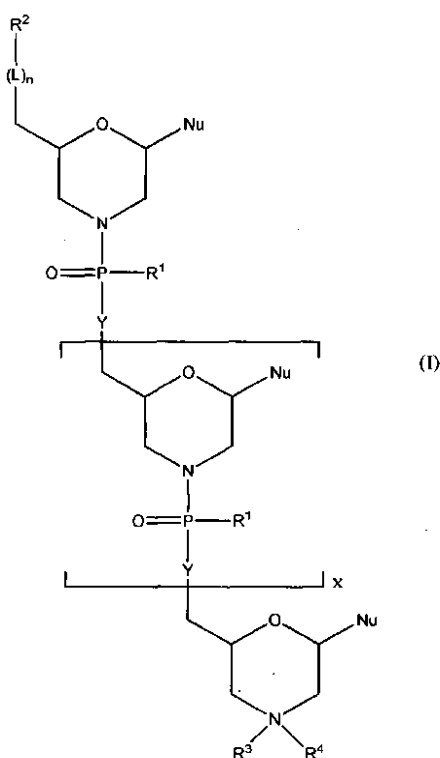
前記ターゲティング配列が、配列番号4~120 (ここで、Xはウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される、項目12に記載の薬学的組成物。

10

(項目14)

式 (I) :

【化53】



20

30

(式中、

各Nuは、共にターゲティング配列を形成する核酸塩基であり；

xは8~38の整数であり；

各Yは、独立して、Oまたは-NR<sup>a</sup>から選択され、R<sup>a</sup>は、水素、-T<sup>1</sup>-NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>R<sup>e</sup>、および細胞透過性ペプチドからなる群から選択され；

40

R<sup>c</sup>は、水素、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、アラルキル、および-C(=NH)NH<sub>2</sub>からなる群から選択され、

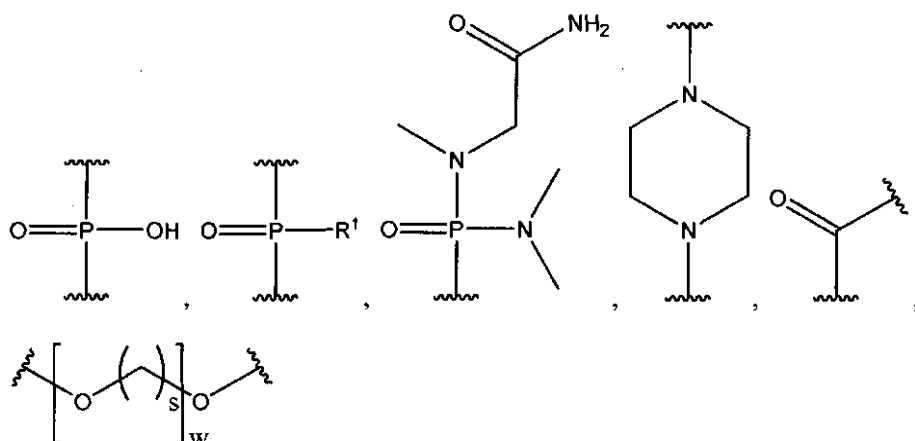
R<sup>d</sup>は、水素、アラルキル、およびC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルからなる群から選択され、または

R<sup>c</sup>およびR<sup>d</sup>がそれぞれ独立してC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルまたはアラルキルである場合、R<sup>c</sup>およびR<sup>d</sup>は窒素原子と付着して5~7員環を形成し、前記環は、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され、

R<sup>e</sup>は、電子対、水素、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、およびアラルキルからなる群から選択さ

50

れ；  
各 L は、  
【化 5 4】



10

および細胞透過性ペプチドからなる群から独立して選択され、w は 3 ~ 20 から選択される整数であり、S は 1 ~ 8 から選択される整数であり；

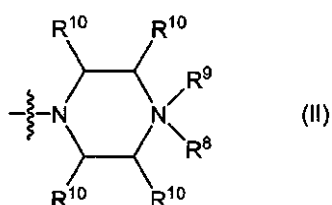
n は 0 ~ 3 の整数であり；

20

各 R<sup>1</sup> は、- N ( C H<sub>3</sub> )<sub>2</sub>、- N R<sup>5</sup> R<sup>6</sup>、- O R<sup>7</sup>、

式 ( I I ) 部分：

【化 5 5】



30

( 式中、

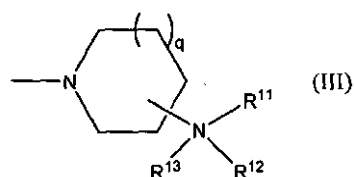
R<sup>8</sup> は、水素、メチル、- C ( = N H ) N H<sub>2</sub>、- Z - T<sup>2</sup> - N H C ( = N H ) N H<sub>2</sub>、および細胞透過性ペプチドからなる群から選択され、Z はカルボニルまたは直接結合であり、

R<sup>9</sup> は、電子対、水素、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

各 R<sup>10</sup> は、水素またはメチルから独立して選択される ) ；および

式 ( I I I ) 部分：

【化 5 6】



( 式中、

q は 0 ~ 2 の整数であり；

R<sup>11</sup> は、水素、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、アラルキル、および - C ( = N H ) N H<sub>2</sub> から

50

なる群から選択され、

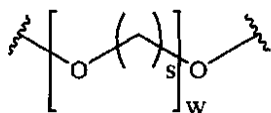
$R^{12}$  は、水素、アラルキル、および  $C_1 \sim C_6$  アルキルからなる群から選択され、または

$R^{11}$  および  $R^{12}$  は窒素原子と付着して 5 ~ 7 員環を形成し、前記環は、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され；

$R^{13}$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択される) からなる群から独立して選択され；

$R^2$  は、水素、OH、ヌクレオチド、細胞透過性ペプチド、式

【化 5 7】

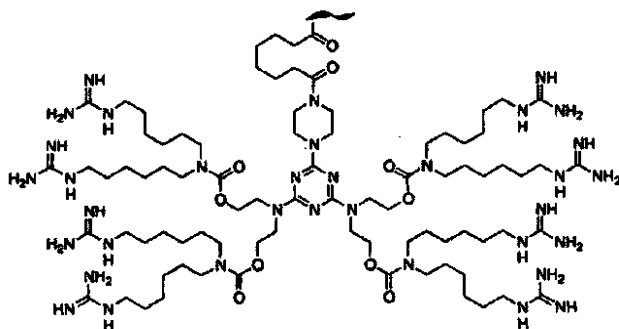


の部分、トリチル、 $-C(=O)OR^f$ 、およびアシルから独立して選択され、 $R^f$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分によって必要に応じて置換された  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、または  $R^2$  は存在せず；

$R^3$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ヌクレオチド、細胞透過性ペプチド、 $-C(=NH)NH_2$ 、トリチル、アシル、および

式

【化 5 8】



の部分からなる群から選択され、

$R^8$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分によって必要に応じて置換された  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり；

$R^4$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアシルからなる群から選択され、

$R^5$  は水素またはメチルから独立して選択され；

$R^6$  および  $R^7$  は、水素または  $-T^3-NR^cR^dR^e$  から独立して選択され；

$T^1$ 、 $T^2$ 、および  $T^3$  の各々は、独立して、アルキル基、アルコキシ基、もしくはアルキルアミノ基、またはその組み合わせを含む 18 原子長までの任意選択的なリンカーであり、

ここで、前記ターゲティング配列が、ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNA のイントロン 1 (配列番号 1)、イントロン 2 (配列番号 2)、またはエクソン 2 (配列番号 3) 内の領域に相補的である) の化合物またはその薬学的に許容され得る塩、および

薬学的に許容され得るキャリア

を含む薬学的組成物。

(項目 15)

各  $R^1$  が  $-N(CH_3)_2$  である、項目 14 に記載の薬学的組成物。

10

20

30

40

50

( 項目 1 6 )

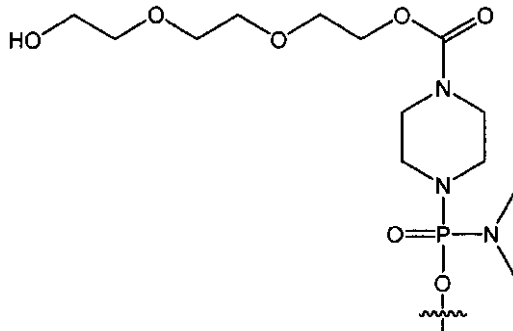
前記ターゲティング配列が、配列番号 4 ~ 1 2 0 ( ここで、X はウラシル ( U ) またはチミン ( T ) から選択される ) から選択される、項目 1 5 に記載の薬学的組成物。

( 項目 1 7 )

n は 2 であり；

R<sup>2</sup> と L が共に式：

【化 5 9】



10

を形成し；

Y は各部位で O である、項目 1 4 に記載の薬学的組成物。

20

( 項目 1 8 )

II 型糖原貯蔵障害の処置を必要とする被験体における II 型糖原貯蔵障害の処置方法であって、有効量の以下：

ホスホルアミダートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー ( P M O )、ペプチド核酸 ( P N A )、ロックド核酸 ( L N A )、ホスホロチオアートオリゴマー、トリシクロ - D N A オリゴマー、トリシクロ - ホスホロチオアートオリゴマー、2' O - M e - ホスホロチオアート ( p h o s p h o r o t i o a t e ) オリゴマー、または前記の任意の組み合わせから選択される非天然化学骨格；および

ヒト酸性 - グルコシダーゼ ( G A A ) 遺伝子のプレ - m R N A のイントロン 1 ( 配列番号 1 )、イントロン 2 ( 配列番号 2 )、またはエクソン 2 ( 配列番号 3 ) 内の領域に相補的なターゲティング配列

30

を含む 1 0 ~ 4 0 個のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのアンチセンスオリゴマー化合物を前記被験体に投与する工程を含む、方法。

( 項目 1 9 )

前記ターゲティング配列が、配列番号 4 ~ 1 2 0 ( ここで、X はウラシル ( U ) またはチミン ( T ) から選択される ) から選択される、項目 1 8 に記載の方法。

( 項目 2 0 )

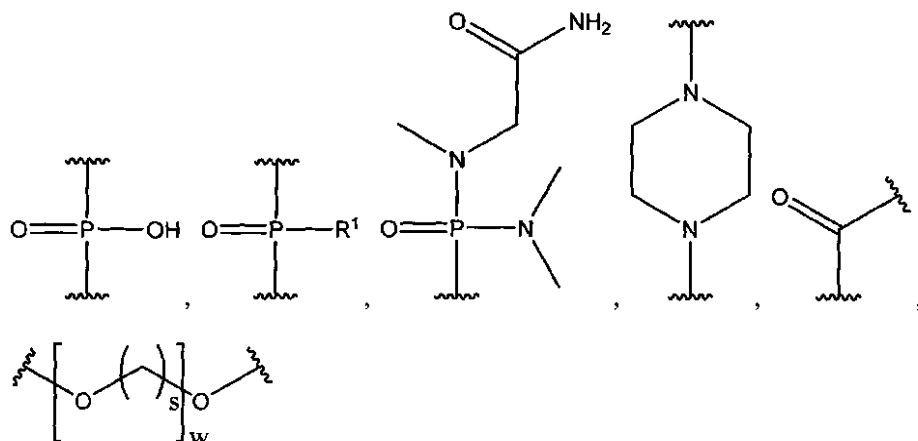
II 型糖原貯蔵障害の処置を必要とする被験体における II 型糖原貯蔵障害の処置方法であって、有効量の式 ( I )：

40

(I)

各 L は、

## 【化 6 1】



10

および細胞透過性ペプチドからなる群から独立して選択され、wは3～20から選択される整数であり、sは1～8から選択される整数であり；

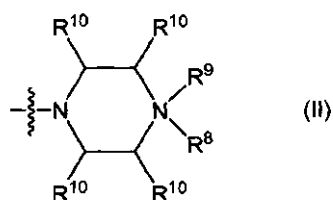
nは0～3の整数であり；

各R¹は、-N(CH₃)₂、-NR⁵R⁶、-OR⁷、

式(I I)部分：

20

## 【化 6 2】



(II)

30

(式中、

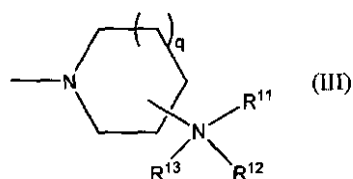
R⁸は、水素、メチル、-C(=NH)NH₂、-Z-T²-NHC(=NH)NH₂、および細胞透過性ペプチドからなる群から選択され、Zはカルボニルまたは直接結合であり、

R⁹は、電子対、水素、C₁～C₆アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

各R¹⁰は、水素またはメチルから独立して選択される)；および

式(I I I)部分：

## 【化 6 3】



(III)

40

(式中、

qは0～2の整数であり；

R¹¹は、水素、C₁～C₆アルキル、アラルキル、および-C(=NH)NH₂からなる群から選択され、

50



$R^{12}$  は、水素、アラルキル、および  $C_1 \sim C_6$  アルキルからなる群から選択され、または

$R^{11}$  および  $R^{12}$  は窒素原子と付着して 5 ~ 7 員環を形成し、前記環は、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され；

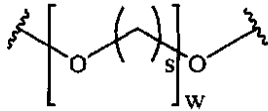
$R^{13}$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択される) からなる群から独立して選択され；

$R^2$  は、水素、OH、ヌクレオチド、細胞透過性ペプチド

式

【化 6 4】

10

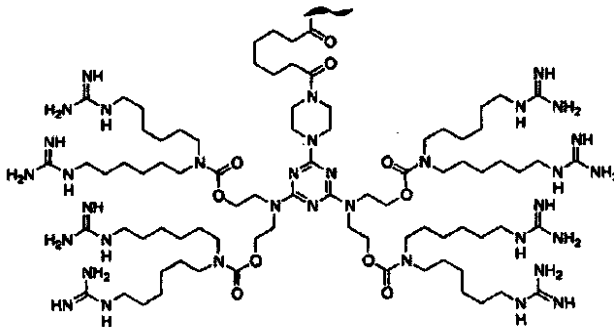


の部分、トリチル、 $-C(=O)OR^f$ 、およびアシルから独立して選択され、 $R^f$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分によって必要に応じて置換された  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、または  $R^2$  は存在せず；

$R^3$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ヌクレオチド、細胞透過性ペプチド、 $-C(=NH)NH_2$ 、トリチル、アシル、および式

20

【化 6 5】



30

の部分からなる群から選択され、

$R^g$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分によって必要に応じて置換された  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、

$R^4$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアシルからなる群から選択され、

$R^5$  は水素またはメチルから独立して選択され；

$R^6$  および  $R^7$  は、水素または  $-T^3-NR^cR^dR^e$  から独立して選択され；

$T^1$ 、 $T^2$ 、および  $T^3$  の各々は、独立して、アルキル基、アルコキシ基、もしくはアルキルアミノ基、またはその組み合わせを含む 18 原子長までの任意選択的なリンカーであり、

40

ここで、前記ターゲティング配列が、ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNA のイントロン 1 (配列番号 1)、イントロン 2 (配列番号 2)、またはエクソン 2 (配列番号 3) 内の領域に相補的である) のアンチセンスオリゴマー化合物またはその薬学的に許容され得る塩を前記被験体に投与する工程を含む、方法。

(項目 2 1)

各  $R^1$  が  $-N(CH_3)_2$  である、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記ターゲティング配列が、配列番号 4 ~ 120 (ここで、X がウラシル (U) または

50

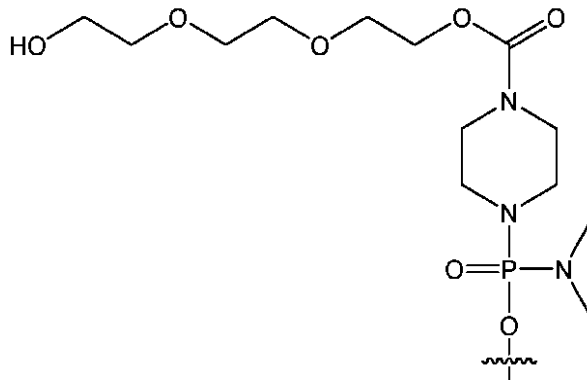
チミン ( T ) から選択される ) から選択される、項目 2 1 に記載の方法。

( 項目 2 3 )

n は 2 であり ;

R<sup>2</sup> と L は共に式 :

【化 6 6】



10

を形成し ;

Y は各部位で O である、項目 2 0 に記載の方法。

20

( 項目 2 4 )

ヒト酸性 - グルコシダーゼ ( G A A ) 遺伝子のプレ - m R N A のイントロン 1 ( 配列番号 1 ) 、エクソン 2 ( 配列番号 2 ) 、またはイントロン 2 ( 配列番号 3 ) 内の領域に特異的にハイブリッド形成するのに十分な長さおよび相補性のターゲティング配列を含むアンチセンスオリゴマー。

( 項目 2 5 )

前記ターゲティング配列が、配列番号 4 ~ 1 2 0 ( ここで、X はウラシル ( U ) またはチミン ( T ) から選択される ) から選択されるターゲティング配列の少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチドを含む、項目 2 4 に記載のアンチセンスオリゴマー。

( 項目 2 6 )

前記ターゲティング配列が、配列番号 4 ~ 1 2 0 ( ここで、X はウラシル ( U ) またはチミン ( T ) から選択される ) から選択されるターゲティング配列と 8 0 % の配列が同一である、項目 2 4 に記載のアンチセンスオリゴマー。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 9】

【図 1】図 1 は、立体遮断アンチセンスオリゴマーがエクソン欠失 G A A m R N A と比較してエクソン 2 含有 G A A m R N A レベルを増強することができる機構の 1 つを示す。

【図 2】図 2 は、エクソン 1 ( 順方向 ) およびエクソン 3 ( 逆方向 ) に指向するプライマーを使用した、エクソン 2 を含有する野生型 G A A 遺伝子由来の約 1 1 7 7 塩基の P C R 増幅産物を示す ( 実施例 2 を参照のこと ) 。

40

【図 3 A】図 3 A ~ 3 C は、実施例 2 の表 E 1 由来の 2 ' - O - メチル修飾アンチセンスオリゴマーの結果を示す。図 3 A は、約 6 0 0 塩基アンプリコンの増幅の減少 ( 約 1 1 7 7 塩基の全長アンプリコンとの比較 ) によって証明されるように、オリゴマー 9 ( G A A - I V S 1 ( - 7 4 - 5 5 ) ) および 1 2 ( G A A - I V S 1 ( - 1 5 8 - 1 4 0 ) ) が I V S 1 - 1 3 G > T 変異を保有するヒト細胞中のエクソン 2 包含を誘導したことを示す。図 3 B は、オリゴマー 1 4 ( G A A - I V S 2 ( - 5 3 - 7 2 ) ) がエクソン 2 包含を誘導したことを示す。図 3 C は、オリゴマー 2 0 ( G A A - I V S 2 ( - 1 7 3 - 1 9 2 ) ) および 2 2 ( G A A - I V S 2 ( - 3 3 8 - 3 6 4 ) ) が同様にある程度のエクソン - 2 包含を誘導したことを示す。

【図 3 B】図 3 A ~ 3 C は、実施例 2 の表 E 1 由来の 2 ' - O - メチル修飾アンチセンス

50

オリゴマーの結果を示す。図 3 A は、約 600 塩基アンプリコンの増幅の減少（約 1177 塩基の全長アンプリコンとの比較）によって証明されるように、オリゴマー 9（G A A - I V S 1（- 74 - 55））および 12（G A A - I V S 1（- 158 - 140））が I V S 1 - 13 G > T 変異を保有するヒト細胞中のエクソン 2 包含を誘導したことを示す。図 3 B は、オリゴマー 14（G A A - I V S 2（- 53 - 72））がエクソン 2 包含を誘導したことを示す。図 3 C は、オリゴマー 20（G A A - I V S 2（- 173 - 192））および 22（G A A - I V S 2（- 338 - 364））が同様にある程度のエクソン - 2 包含を誘導したことを示す。

【図 3 C】図 3 A ~ 3 C は、実施例 2 の表 E 1 由来の 2' - O - メチル修飾アンチセンスオリゴマーの結果を示す。図 3 A は、約 600 塩基アンプリコンの増幅の減少（約 1177 塩基の全長アンプリコンとの比較）によって証明されるように、オリゴマー 9（G A A - I V S 1（- 74 - 55））および 12（G A A - I V S 1（- 158 - 140））が I V S 1 - 13 G > T 変異を保有するヒト細胞中のエクソン 2 包含を誘導したことを示す。図 3 B は、オリゴマー 14（G A A - I V S 2（- 53 - 72））がエクソン 2 包含を誘導したことを示す。図 3 C は、オリゴマー 20（G A A - I V S 2（- 173 - 192））および 22（G A A - I V S 2（- 338 - 364））が同様にある程度のエクソン - 2 包含を誘導したことを示す。

【図 4 A】図 4 A ~ 4 C は、表 4 A の P M O アンチセンスオリゴマーについての R T - P C R の結果を示す。

【図 4 B】図 4 A ~ 4 C は、表 4 A の P M O アンチセンスオリゴマーについての R T - P C R の結果を示す。

【図 4 C】図 4 A ~ 4 C は、表 4 A の P M O アンチセンスオリゴマーについての R T - P C R の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0030】

詳細な説明

I . 定義

他で定義しない限り、本明細書中で使用した全ての技術用語および科学用語は、開示分野に属する当業者によって一般的に理解されている意味を有する。本明細書中に記載の方法と材料と類似するか等価な任意の方法と材料を本開示の主題の実施または試験で使用する  
ことができるが、好ましい方法と材料を記載する。本開示の目的のために、以下の用語  
を以下に定義する。

【0031】

冠詞「a」および「an」を、本明細書中で、1つまたは1つを超える（すなわち、少なくとも1つの）その冠詞の文法上の対象をいうために使用する。例として「エレメント（an element）」は、1つのエレメントまたは1つを超えるエレメントを意味する。

【0032】

「約」は、基準となる重量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重さ、または長さに対して30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1%程度変動する重量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重さ、または長さを意味する。

【0033】

「コード配列」は、遺伝子のポリペプチド産物のコードに寄与する任意の核酸配列を意味する。対照的に、用語「非コード配列」は、遺伝子のポリペプチド産物のコードに直接寄与しない任意の核酸配列をいう。

【0034】

本開示を通して、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、用語「含む（comprise）」、「含む（comprises）」、および「含むこと（comprising）」は、記載の工程、要素、または工程もしくはは要素の群を含むが、いかなる他の工程、要

10

20

30

40

50

素、または工程もしくは要素の群を排除しないことを意味すると理解されるであろう。

【0035】

「～からなる」は、句「～からなる」に続く要素を包含し、この包含はこれらの要素に限定されることを意味する。したがって、句「～からなる」は、列挙した要素が必要または必須であり、他の要素が存在し得ないことを示す。「～から本質的になる」は、句の後に列挙した任意の要素を包含し、列挙した要素についての開示に定められた活性または作用に干渉や寄与しない他の要素に限って包含することを意味する。したがって、句「～から本質的になる」は、列挙した要素が必要または必須であるが、他の要素が列挙した要素の活性または作用に実質的に影響を及ぼすかどうかにかかわらず依存して他の要素は選択的であり、存在してもしなくてもよいことを示す。

10

【0036】

本明細書中で使用する場合、用語「細胞を接触させること」、「導入すること」、または「送達すること」は、当該分野で日常的な方法（例えば、トランスフェクション（例えば、リポソーム、リン酸カルシウム、ポリエチレンイミン）、エレクトロポレーション（例えば、ヌクレオフェクション）、微量注入）による細胞内への開示のオリゴマーの送達を含む。

【0037】

本明細書中で使用する場合、用語「アルキル」には、1つまたはそれを超える官能基で必要に応じて置換された直鎖（すなわち、非分岐または非環式）、分岐、環式、または多環式の非芳香族炭化水素基が含まれることが意図される。他で規定しない限り、「アルキル」基は、1～8個、好ましくは1～6個の炭素原子を含む。 $C_1 \sim C_6$ アルキルには、 $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 、 $C_4$ 、 $C_5$ 、および $C_6$ アルキル基が含まれることが意図される。低級アルキルは、1～6個の炭素原子を含むアルキル基をいう。アルキルの例には、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、シクロブチル、ペンチル、イソペンチル、*tert*-ペンチル、シクロペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、シクロヘキシルなどが含まれるが、これらに限定されない。アルキルは置換または非置換であり得る。例示的な置換アルキル基には、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、2-フルオロエチル、3-フルオロプロピル、ヒドロキシメチル、2-ヒドロキシアエチル、3-ヒドロキシプロピル、ベンジル、置換ベンジル、フェネチル、置換フェネチルなどが含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0038】

本明細書中で使用する場合、用語「アルコキシ」は、表示の炭素数の上記定義のアルキル基が酸素橋を介して付着したアルキルの部分集合を意味する。例えば、「アルコキシ」は、アルキル基が直鎖、分岐、環式の立体配置の1～8個の炭素原子を含む-O-アルキル基をいう。「アルコキシ」の例には、メトキシ、エトキシ、*n*-プロポキシ、*i*-プロポキシ、*t*-ブトキシ、*n*-ブトキシ、および*s*-ペントキシなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0039】

本明細書中で使用する場合、単独または「アラルキル」、「アラルコキシ」、もしくは「アリーロキシ-アルキル」のような大きい方の部分の一部として使用される用語「アリール」は、6～14個の環原子を有する芳香環基（フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、1-アントラシル、および2-アントラシルなど）をいう。「アリール」環は、1つまたはそれを超える置換基を含んでよい。用語「アリール」を、用語「アリール環」と互換的に使用することができる。「アリール」には、芳香環が1つまたはそれを超える環に縮合した縮合多環式芳香環系も含まれる。有用なアリール環基の非限定的な例には、フェニル、ヒドロキシフェニル、ハロフェニル、アルコキシフェニル、ジアルコキシフェニル、トリアルコキシフェニル、アルキレンジオキシフェニル、ナフチル、フェナントリル、アントリル、およびフェナントロなど、ならびに1-ナフチル、2-ナフチル、1-アントラシル、および2-アントラシルが含まれる。本明細書中で使用する場合、ラジカル

40

50

または付着点が芳香環上に存在する芳香環が1つまたはそれを超える非芳香環に縮合した基（インダニル、フェナントリジニル、またはテトラヒドロナフチルなど）も用語「アリール」の範囲内に含まれる。

【0040】

用語「アシル」は、 $C(O)R$ 基（式中、上記定義のように、 $R$ は、 $H$ 、アルキル、またはアリールを示す）を意味する。アシル基の例には、ホルミル、アセチル、ベンゾイル、フェニルアセチル、および類似の基が含まれる。

【0041】

用語「ホモログ」は、本明細書中で使用する場合、同一の化学基の連続的付加によって規則的に異なる化合物を意味する。例えば、化合物のホモログは、1つまたはそれを超える  $-CH_2-$  基、アミノ酸残基、ヌクレオチド、またはヌクレオチドアナログが付加されていることが異なり得る。

10

【0042】

用語「細胞透過性ペプチド」（CPP）または「細胞取り込みを増強するペプチド部分」を互換的に使用し、この用語は、「輸送ペプチド」、「キャリアペプチド」、または「ペプチド伝達ドメイン」とも呼ばれるカチオン性細胞透過性ペプチドをいう。ペプチドは、本明細書中で示すように、所与の細胞培養集団の細胞の約または少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の細胞内の細胞透過を誘導する能力を有し、全身投与の際に *in vivo* で複数の組織内に高分子を移行可能である。いくつかの実施形態では、CPPは、式  $[(C(O)CH(R')NH)_m]R''$ （式中、 $R'$ は、天然に存在するアミノ酸またはその1炭素ホモログもしくは2炭素ホモログの側鎖であり、 $R''$ は水素またはアシルから選択され、 $m$ は50までの整数である）のCPPである。さらなるCPPが当該分野で周知であり、例えば、米国特許出願公開第2010/0016215号（その全体が参考として組み込まれる）に開示されている。他の実施形態では、 $m$ は1~50から選択される整数であり、 $m$ が1である場合、一部は単一のアミノ酸またはその誘導体である。

20

【0043】

本明細書中で使用する場合、「アミノ酸」は、一次アミノ基、カルボン酸基、側鎖、および水素原子に付着する炭素原子からなる化合物をいう。例えば、用語「アミノ酸」には、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギン、グルタミン、リジン、およびアルギニンが含まれるが、これらに限定されない。さらに、本明細書中で使用する場合、「アミノ酸」には、エステル、アミド、および塩、ならびに他の誘導体などのアミノ酸の誘導体（活性形態への代謝の際に薬理学的性質を有する誘導体が含まれる）も含まれる。したがって、用語「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸が含まれると理解される。

30

【0044】

「電子対」は、他の原子と結合していないまたは他の原子と共有されていない価電子対をいう。

【0045】

「相同性」は、同一であるか、保存的置換を構成するアミノ酸数の百分率をいう。相同性を、GAPなどの配列比較プログラムを使用して決定することができる（Deverauxら, 1984, *Nucleic Acids Research* 12, 387-395）。このような方法で、本明細書中に引用した長さと同様か実質的に異なる長さの配列を、アラインメント内にギャップを挿入し、かかるギャップを、例えば、GAPで使った比較アルゴリズムによって決定することによって比較することができる。

40

【0046】

「単離された」は、通常はその未変性の状態で付随する成分を実質的または本質的に含まない材料を意味する。例えば、「単離されたポリヌクレオチド」、「単離されたオリゴヌクレオチド」、または「単離されたオリゴマー」は、本明細書中で使用する場合、天然に存在する状態で隣接する配列から精製または除去されているポリヌクレオチドをいうこ

50

とができる（例えば、ゲノム内のフラグメントに隣接する配列から取り出されたDNAフラグメント）。細胞に関する場合、用語「単離」は、供給源となる被験体（例えば、ポリヌクレオチド反復疾患を有する被験体）からの細胞（例えば、線維芽細胞、リンパ芽球）の精製をいう。mRNAまたはタンパク質の文脈では、「単離」は、供給源（例えば、細胞）からのmRNAまたはタンパク質の回収をいう。

#### 【0047】

用語「調整する」には、1つまたはそれを超える定量可能なパラメーターが必要に応じた所定量および/または統計的に有意な量だけ「増加すること」または「減少すること」が含まれる。「増加する」もしくは「増加」、「増強する」もしくは「増強」、または「刺激する」もしくは「刺激」は、一般に、1つまたはそれを超えるアンチセンス化合物またはアンチセンス組成物が、アンチセンス化合物の非存在下またはコントロール化合物のいずれかに原因する応答と比較して細胞または被験体内により高い生理学的応答（すなわち、下流効果）を生じるか引き起こす能力をいう。関連する生理学的応答または細胞応答（*in vivo*または*in vitro*）は、当業者に明らかであり、それを必要とする細胞、組織、または被験体中のGAAコードブレ-mRNA中のエクソン2の包含の増加または機能的GAA酵素発現の増加が含まれ得る。「増大した」または「増強した」量は、典型的には「統計的に有意な」量であり、アンチセンス化合物の非存在下（薬剤の非存在下）またはコントロール化合物によって得られる量の1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50倍、またはそれを超える（例えば、500、1000倍）（1の間または1を超える全ての整数および小数点（例えば、1.5、1.6、1.7、1.8）が含まれる）増加が含まれ得る。用語「軽減する」または「抑制する」は、一般に、診断分野における日常的技術にしたがって測定した場合に1つまたはそれを超えるアンチセンス化合物またはアンチセンス組成物が関連する生理学的応答または細胞応答（本明細書中に記載の疾患または容態の症状など）を「軽減する」能力に関する。関連する生理学的応答または細胞応答（*in vivo*または*in vitro*）は当業者に明らかであり、ポンベ病などの糖原貯蔵障害の症状または病態の軽減（例えば、1つまたはそれを超える組織中のグリコーゲン蓄積の減少）が含まれ得る。応答の「減少」は、アンチセンス化合物の非存在下またはコントロール組成物によって得られる応答と比較して「統計的に有意」であり得、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%（前述の数値間の全ての整数が含まれる）の減少が含まれ得る。

#### 【0048】

本明細書中で使用する場合、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」、「アンチセンスオリゴマー」、または「オリゴヌクレオチド」は、核酸塩基がワトソン・クリック型塩基対合によってRNA中の標的配列にハイブリッド形成して標的配列内にオリゴマー：RNAヘテロ二重鎖を形成することが可能なヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログの直鎖状配列をいう。用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」、「アンチセンスオリゴマー」、「オリゴマー」、および「化合物」を、オリゴマーをいうために互換的に使用することができる。環状サブユニットは、リボースまたは別のペントース糖、または一定の実施形態では、モルホリノ基（以下のモルホリノオリゴマーの説明を参照のこと）に基づき得る。当該分野で公知の他のアンチセンス剤のうちで特にペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、トリシクロ-DNAオリゴマー、トリシクロ-ホスホロチオアートオリゴマー、および2'-O-メチルオリゴマーも意図される。

#### 【0049】

天然に存在しないオリゴマー、すなわち「オリゴヌクレオチドアナログ」（（i）修飾された骨格構造（例えば、天然に存在するオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド中に見いだされる標準的なホスホジエステル連結以外の骨格）、および/または（ii）修飾された糖部分（例えば、リボース部分またはデオキシリボース部分よりもむしろモルホ

10

20

30

40

50

リノ部分)を有するオリゴマーが含まれる)が含まれる。オリゴマーアナログは、ワトソン・クリック型塩基対合によって標準的なポリヌクレオチド塩基に水素結合することができる塩基を支持し、ここで、アナログ骨格は、配列特異的様式でのオリゴマーアナログ分子と標準的なポリヌクレオチド(例えば、一本鎖RNAまたは一本鎖DNA)中の塩基との間のかかる水素結合を可能にする様式で塩基を提供する。好ましいアナログは、骨格を含む実質的に無電荷のリンを有するアナログである。

#### 【0050】

「ヌクレアーゼ耐性」オリゴマーは、その骨格が体内の一般的な細胞外ヌクレアーゼおよび細胞内ヌクレアーゼ(例えば、3'-エキソヌクレアーゼなどのエキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、RNAアーゼH)によるヌクレアーゼ切断に実質的に耐性を示す非ハイブリッド形成形態またはハイブリッド形成形態のオリゴマーをいう。すなわち、このオリゴマーは、オリゴマーが曝される体内の通常のヌクレアーゼ条件下でほとんどまたは全くヌクレアーゼ切断されない。「ヌクレアーゼ耐性ヘテロ二重鎖」は、ヘテロ二重鎖が二本鎖RNA/RNA複合体またはRNA/DNA複合体を切断することができる細胞内ヌクレアーゼおよび細胞外ヌクレアーゼによる *in vivo* 分解に実質的に耐性を示すようにアンチセンスオリゴマーのその相補的標的への結合によって形成されたヘテロ二重鎖をいう。「ヘテロ二重鎖」は、アンチセンスオリゴマーと標的RNAの相補的部分との間の二重鎖をいう。

#### 【0051】

本明細書中で使用する場合、「核酸塩基」(Nu)、「塩基対合部分」、または「塩基」を、未変性のDNAまたはRNA中に見出されるプリン塩基またはピリミジン塩基(ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、およびグアニン)、ならびにオリゴマーに対する結合親和性などの性質を改善する天然に存在するプリンおよびピリミジンのアナログをいうために互換的に使用する。例示的なアナログには、ヒポキサンチン(ヌクレオシドイノシンの塩基成分); 2, 6-ジアミノプリン; 5-メチルシトシン; C5-プロピニル修飾ピリミジン; および9-(アミノエトキシ)フェノキサジン(G-clamp)などが含まれる。

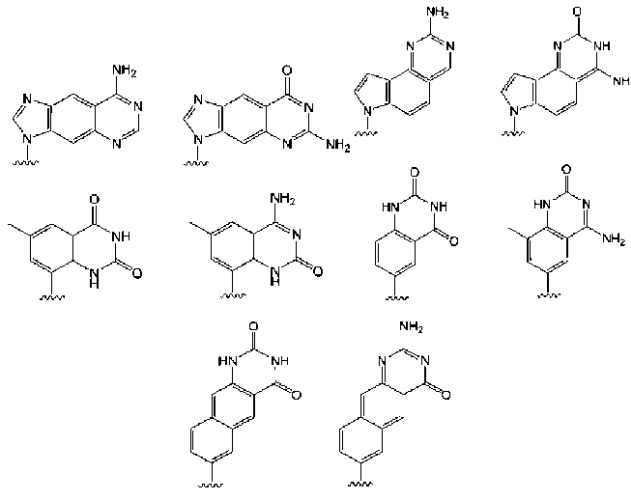
#### 【0052】

塩基対合部分のさらなる例には、ウラシル、チミン、アデニン、シトシン、グアニン、およびヒポキサンチン(その各アミノ基がアシル保護基によって保護されている)、2-フルオロウラシル、2-フルオロシトシン、5-ブロモウラシル、5-ヨードウラシル、2, 6-ジアミノプリン、アザシトシン、ピリミジンアナログ(シュードイソシトシンおよびシュードウラシルなど)ならびに他の修飾された核酸塩基(8-置換プリン、キサントシン、またはヒポキサンチン(後者の2つは天然分解産物である)など)が含まれるが、これらに限定されない。Chiu and Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048, Limbachら、Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196、およびRevankar and Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313に開示された修飾核酸塩基も意図する。

#### 【0053】

塩基対合部分のさらなる例には、1つまたはそれを超えるベンゼン環が付加されているサイズの大きな核酸塩基が含まれるが、これらに限定されない。Glen Researchカタログ([www.glenresearch.com](http://www.glenresearch.com)); Krueger ATら, Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150; Kool, ET, Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936-943; Benner S.A.ら, Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E.ら, Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733; Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627に記載の核塩基置換は、本明細書中に記載のオリゴマーの合成に有用であると予想されている。サイズの大きな核酸塩基の例を以下に示す。

## 【化 6】



10

## 【0054】

リボース、糖アナログ、またはモルホリノに共有結合性に連結した核酸塩基は、ヌクレオシドを含む。「ヌクレオチド」は、1つのリン酸基と共にヌクレオシドから構成される。リン酸基が隣接ヌクレオチドと相互に共有性に連結してオリゴマーを形成する。

## 【0055】

生理学的条件下にて実質的に40 超または45 超、好ましくは少なくとも50 、典型的には60 ～80 またはそれを超えるT<sub>m</sub>でオリゴマーが標的にハイブリッド形成する場合、オリゴマーは標的ポリヌクレオチドに「特異的にハイブリッド形成する」。かかるハイブリッド形成は、好ましくは、ストリンジェントなハイブリッド形成条件に相当する。所与のイオン強度およびpHで、T<sub>m</sub>は、50%の標的配列が相補性ポリヌクレオチドにハイブリッド形成する温度である。標的配列に対してアンチセンスオリゴマーが「ほぼ」または「実質的に」相補的ならびに厳密に相補的である場合にかかるハイブリッド形成が起こり得る。

20

## 【0056】

本明細書中で使用する場合、「十分な長さ」は、GAAのイントロン1、エクソン2、もしくはイントロン2の領域または上記のいずれかにわたる領域中の少なくとも8個、より典型的には8～40個の連続する核酸塩基に相補的なアンチセンスオリゴマーをいう。十分な長さのアンチセンスオリゴマーは、変異RNA中のGAAプレ-mRNA反復領域に特異的にハイブリッド形成することができる少なくとも最小数のヌクレオチドを有する。好ましくは、十分な長さのオリゴマーは、8～30ヌクレオチド長である。より好ましくは、十分な長さのオリゴマーは、9～27ヌクレオチド長である。

30

## 【0057】

例えば、「50%同一の配列」を含む「配列同一性」という用語は、本明細書中で使用する場合、配列が比較ウィンドウにわたってヌクレオチド毎またはアミノ酸毎に同一な範囲をいう。したがって、「配列同一率」を、2つの最適にアラインメントした配列を比較ウィンドウにわたって比較し、同一の核酸塩基（例えば、A、T、C、G、I）または同一のアミノ酸残基（例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys、およびMet）が両配列で生じる位置の数を決定して適合した位置の数を得、この適合した位置の数を比較ウィンドウ中の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で除し、結果に100を掛けて配列同一率を得ることによって計算することができる。比較ウィンドウのアラインメントに最適な配列アラインメントを、アルゴリズム（Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wis., USAのGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）のコンピュータによる実行または目視および選択された

40

50



種々の方法のいずれかによって得られた最良のアラインメント（すなわち、比較ウィンドウにわたって最高の相同率が得られる）によって行うことができる。例えば、Altshulら, Nucleic Acids Res. 25: 3389, 1997によって開示されたBLASTファミリープログラムも参照することができる。

【0058】

「被験体」または「それを必要とする被験体」には、ヒト被験体などの哺乳動物被験体が含まれる。例示的な哺乳動物被験体は、GSD-II（またはポンペ病）を有するか有するリスクが有る。本明細書中で使用する場合、用語「GSD-II」は、II型糖原貯蔵障害（GSD-IIまたはポンペ病）（罹患個体におけるGAAタンパク質の過小発現によってしばしば特徴づけられるヒト常染色体劣性疾患）をいう。一定の実施形態では、被験体は、1つまたはそれを超える組織（例えば、心臓、骨格筋、肝臓、および神経系組織）中のGAAタンパク質の発現および/または活性が減少している。いくつかの実施形態では、被験体は、1つまたはそれを超える組織（例えば、心臓、骨格筋、肝臓、および神経系組織）中のグリコーゲン蓄積が増加している。特定の実施形態では、被験体は、IVS1-13T>G変異または機能的GAAタンパク質発現を減少させる他の変異を有する（例えば、Zampieriら, European J. Human Genetics. 19: 422-431, 2011を参照のこと）。

10

【0059】

本明細書中で使用する場合、用語「標的」は、RNA領域をいい、具体的には、GAA遺伝子によって同定される領域をいう。特定の実施形態では、標的は、エクソン2包含を促進するシグナルの抑制を担うGAAコードプレ-mRNAのイントロン1またはイントロン2内の領域である。別の実施形態では、標的領域は、GAAエクソン2のmRNA領域である。

20

【0060】

用語「標的配列」は、オリゴマーアナログが指向する標的RNAの部分、すなわち、オリゴマーアナログが相補性配列のワトソン・クリック型塩基対合によってハイブリッド形成する配列をいう。

【0061】

用途「ターゲティング配列」は、RNAゲノム中の「標的配列」に相補的な（さらに、実質的に相補的であることを意味する）オリゴマーまたはオリゴマーアナログ中の配列である。アンチセンスオリゴマーの全配列または一部のみが標的配列と相補的であり得る。例えば、20～30塩基を有するオリゴマー中、約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、または29塩基が標的領域に相補的なターゲティング配列であり得る。典型的には、ターゲティング配列は、オリゴマー中の連続塩基から形成されるが、代わりに、共存する場合、例えば、オリゴマーの逆末端から標的配列にわたる配列を構成する不連続配列から形成され得る。

30

【0062】

「ターゲティング配列」は、標的配列に対して「ほぼ」または「実質的に」相補性を有することができ、依然として本開示の目的のために機能し得る（すなわち、依然として「相補的」であり得る）。好ましくは、本開示で使用されるオリゴマーアナログ化合物は、10ヌクレオチドのうちで標的配列とのミスマッチが最大で1つ、好ましくは20ヌクレオチドのうちで最大で1つのミスマッチを有する。あるいは、使用されるアンチセンスオリゴマーは、本明細書中で指摘した例示的なターゲティング配列と少なくとも90%の配列相同性、好ましくは少なくとも95%の配列相同性を有する。

40

【0063】

本明細書中で使用する場合、用語「定量する」、「定量」、または他の関連用語は、核酸、ポリヌクレオチド、オリゴマー、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の単位体積中の量、質量、または濃度の決定をいう。

【0064】

50

本明細書中で使用する場合、被験体（例えば、ヒトなどの哺乳動物）または細胞の「処置」は、個体または細胞の自然経過を変化させるために使用される任意の介入型である。処置には、薬学的組成物の投与が含まれるが、これらに限定されず、予防的または病理学的事象の開始もしくは病原体との接触後に行うことができる。処置される疾患または容態の進行の減速、疾患または容態の発症の遅延、またはその発症の重症度軽減を対象にすることができる「予防的」処置も含まれる。「処置」または「予防」は、疾患もしくは容態またはその関連する症状の完全な根絶、治癒、防止を必ずしも示さない。

#### 【0065】

##### II. GAAのスプライス調整のための配列

一定の実施形態は、細胞中のエクソン - 2 欠失 GAA mRNA と比較してエクソン 2 含有 GAA コード mRNA レベルを増強する方法であって、細胞中のエクソン - 2 欠失 GAA mRNA と比較してエクソン 2 含有 GAA mRNA レベルが増強されるように、GAA 遺伝子内の領域に特異的にハイブリッド形成するのに十分な長さおよび相補性のアンチセンスオリゴマーと細胞を接触させる工程を含む方法に関する。いくつかの実施形態では、細胞は被験体中に存在し、本方法は、アンチセンスオリゴマーを被験体に投与する工程を含む。

#### 【0066】

アンチセンスオリゴマーを、mRNA の翻訳を遮断、阻害、または調整するか、プレ - mRNA スプライスプロセッシングを阻害または調整するか、ターゲティングされた mRNA の分解を誘導するようにデザインすることができ、このことを、ハイブリッド形成する標的配列「〜に指向する」または「をターゲティングする」ということができる。一定の実施形態では、標的配列には、プレプロセッシングした mRNA の 3' または 5' スプライス部位、枝分かれ部位、またはスプライシングの調節に関与する他の配列を含む領域が含まれる。標的配列は、エクソン内、イントロン内、またはイントロン / エクソンジャンクションに及び得る。

#### 【0067】

一定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、有効な様式で標的 RNA 領域（例えば、プレ - mRNA）を遮断するための標的 RNA（すなわち、スプライス部位選択が調整される RNA）に対する十分な配列相補性を有する。例示的な実施形態では、かかる GAA プレ - mRNA の遮断は、スプライシングを調整すると考えられる未変性タンパク質の結合部位のマスキングおよび / またはターゲティングされた RNA の構造の変化のいずれかによってスプライシングを調整するのに役立つ。いくつかの実施形態では、標的 RNA は標的プレ - mRNA（例えば、GAA 遺伝子プレ - mRNA）である。

#### 【0068】

標的 RNA のスプライシングを調整するのに十分な標的 RNA 配列に対する配列相補性を有するアンチセンスオリゴマーは、アンチセンス剤が、ターゲティングされた RNA のスプライシングを調整し、そして / または三次元構造を変化させると考えられる未変性タンパク質の結合部位のマスキングを誘発するのに十分な配列を有することを意味する。同様に、標的 RNA のスプライシングを調整するのに十分な標的 RNA 配列に対する配列相補性を有するアンチセンスオリゴマー試薬は、オリゴマー試薬がターゲティングされた RNA のスプライシングを調整し、そして / または三次元構造を変化させると考えられる未変性タンパク質の結合部位のマスキングを誘発するのに十分な配列を有することを意味する。

#### 【0069】

一定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ヒト GAA プレ - mRNA のイントロン 1、ヒト GAA プレ - mRNA のエクソン 2、またはヒト GAA プレ - mRNA のイントロン 2 中の配列に対して十分な長さおよび相補性を有する。ヒト GAA プレ - mRNA のイントロン 1 / エクソン 2 にわたる領域またはヒト GAA プレ - mRNA のエクソン 2 / イントロン 2 にわたる領域に相補的なアンチセンスオリゴマーも含まれる。ヒト GAA 遺伝子のイントロン 1 配列（配列番号 1）、エクソン 2 配列（配列番号 2）、およびイ

ントロン 2 配列（配列番号 3）を以下の表 1 に示す（配列番号 1 の 3' 末端付近の強調した T / G は上記の I V S 1 - 1 3 T > G 変異である；この位置のヌクレオチドは T または G のいずれかである）。

【表 1 - 1】

表1 GAAをターゲティングするオリゴマーの標的配列（NG_009822由来）		
名称	配列 (5'-3')	配列 番号

【表 1 - 2】

GAA- IVS1	<p>GTGAGACACCTGACGTCTGCCCGCGCTGCCGGCGGTAACATCCCAGAAGCGGGTTT  GAACGTGCCTAGCCGTGCCCCAGCCTCTTCCCCTGAGCGGAGCTTGAGCCCCAGAC  CTCTAGTCCCTCCCGGTCTTTATCTGAGTTTCACTTAGAGATGAACGGGGAGCCGCC  TCCTGTGCTGGGCTTGGGGCTGGAGGCTGCATCTTCCCGTTTCTAGGGTTTCTCTTC  CCCTTTTGATCGACGCAGTGCTCAGTCTTGGCCGGGACCCGAGCCACCTCTCTGTCT  CCTGCAGGACGCACATGGCTGGGTCTGAATCCCTGGGGTGAGGAGCACCGTGGCCTG  AGAGGGGGCCCCCTGGGCCAGCTCTGAAATCTGAATGTCTCAATCACAAAGACCCCT  TAGGCCAGGCCAGGGGTGACTGTCTGCTGTTTGTCCCTGGTTGCTGGCACATAGC  ACCCGAAACCCCTTGAAACCGAGTGATGAGAGAGCCTTTTGCTCATGAGGTGACTGA  TGACCGGGGACACCAGGTGGCTTCAGGATGGAAGCAGATGGCCAGAAAGACCAAGGC  CTGATGACGGGTGGGATGGAAAAGGGGTGAGGGGCTGGAGATTGAGTGAATCACC  GTGGCTTAGTCAACCATGCCTGCACAATGGAACCCCGTAAGAAACCACAGGGATCAG  AGGGCTTCCCGCCGGGTGTGGAACACACCAAGGCACTGGAGGGTGGTGCGAGCAGA  GAGCACAGCATCACTGCCCCACCTCACACCAGGCCCTACGCATCTCTTCCATACGG  CTGTCTGAGTTTATCCTTTGTAATAAACAGCAACTGTAAGAAACGCACCTTCTCTG  AGTTCTGTGACCCTGAAGAGGGAGTCTGGGAACCTCTGAATTTATAACTAGTTGAT  CGAAAGTACAAGTGACAACCTGGGATTTGCCATTGGCCTCTGAAGTGAAGGCAGTGT  TGTGGGACTGAGCCCTTAACCTGTGGAGTCTGTGCTGACTCCAGGTAGTGTCAAGAT  TGAATTGAATGTAGGACACCCAGCGTGTCCAGAAAGTTGCAGAATTGATGGCTGT  GAGAAAAACCCCTACACATTTAATGTGAGAAGTGTGGGTAAAATGTTTACCCTCCAG  CCCAGAGAGCCCTAATTTACCAGTGGCCACGGTGGAAACACCACGTCCGGCCGGGGG  CAGAGCGTTCACAGCAAGCCTTCTGTAACATGACATGACAGGTGAGACTCCCTCGG  GCCCTGAGTTCACTTCTTCTGGTATGTGACCAGCTCCAGTACCAGAGAAGGTGTC  ACAGTCTCTGCTCCAAGGAGCTTCACTGGCCAGGGGCTGCTTTCTGAAATCCTTGC  CTGCCCTGCTCCAAGGCCCGTTCCTCAGAGACGCAGACCCCTCTGATGGCTGACTT  TGGTTTGAGGACCTCTCTGCATCCCTCCCCATGGCCTTGCTCCTAGGACACCTTCT  TCTCCTTTCCCTGGGGTCAGACTTGCCTAGGTGCGGTGGCTCTCCAGCCCTTCCCC  ACGCCCTCCCCATGGTGTATTACACACACCAAAGGGACTCCCTATTGAAATCCATG  CATATTGAATCGCATGTGGGTTCGGCTGCTCCTGGGAGGAGCCAGGCTAATAGAAT  GTTTGCCATAAAATATTAATGTACAGAGAAGCGAAACAAAGGTGCTTGGTACTTGT  AACCTTACCAGCAGAATAATGAAAGCGAAGCCCATATCTCATCTGCACGCGACATC  CTGTGTGTCTGTACCCGAGGCTCCAGGTGCAGCCACTGTTACAGAGACTGTGTTT  CTTCCCCATGTACCTCGGGGGCCGGGAGGGGTTCTGATCTGCAAAGTCGCCAGAGGT  TAAGTCTTTCTCTCTTGTGGCTTTGCCACCCCTGGAGTGTACCCCTCAGCTGCGGT  GCCCAGGATTCCCCACTGTGGTATGTCCGTGCACCAGTCAATAGGAAAGGGAGCAAG  GAAAGGTACTGGGTCCCCCTAAGGACATACGAGTTGCCAGAATCACTTCCGCTGACA  CCCAGTGGACCAAGCCGCACCTTTATGCAAGAAGTGGGGCTCCCAGCCAGGCGTGGTC  ACTCTGAAATCCAGCACTTCGGAAGGCCAAGGGGGGTGGATCACTTGAGCTCAGG  AGTTCCAGAGACCAGCCTGGGTAACATGGCAAAATCCCGTCTCTACAAAAATACAGAAA  ATTAGCTGGGTGCGGTGGTGTGTGCCTACAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAAGTG  GGAGGATTGCTTGAGTCTGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCCAGGATCTCACCACAG  CACTCTGGCCCAGGCGACAGCTGTTTGGCCTGTTTCAAGTGTCTACCTGCCTTGCTG  GTCTTCTGGGGACATTCTAAGCGTGTGTTGATTGTGAACATTTTAGCAGACTGTGCA  AGTCTCTGCACTCCCTGCTGGAGCTTTTCTCGCCCTTCTTCTGGCCCTCTCCCC  AGTCTAGACAGCAGGGCAACACCCACCCCTGGCCACCTTACCCACCTGCCTGGGTGC  TGCAGTGCCAGCCGCGGTGATGTCTCAGAGCTGCTTTGAGAGCCCCGTGAGTGCCG  CCCCCTCCCGCCTCCCTGCTGAGCCCGCTTT<b>T/G</b>CTTCTCCCGCAG</p>	1
GAA- エクソン2	<p>GCCTGTAGGAGCTGTCCAGGCCATCTCCAACCATGGGAGTGAGGCACCCGCCCTGCT  CCCACCGGCTCCTGGCCGTCTGCGCCCTCGTGTCTTGGAACCGCTGCACTCCTGG  GGCACATCCTACTCCATGATTTCTGCTGGTTCCCCGAGAGCTGAGTGGCTCCTCCC  CAGTCTTGAGGAGACTCACCCAGCTCACCAGCAGGGAGCCAGCAGACCAGGGCCCC  GGGATGCCCAGGCACACCCCGCCGTCCCAGAGCAGTGGCCACACAGTGGCAGCTCC  CCCCAACAGCCGCTTCGATTGCGCCCTGACAAGGCCATCACCCAGGAACAGTGCG  AGGCCCGCGCTGTGTGCTACATCCCTGCAAAGCAGGGGCTGCAGGGAGCCCAGATGG  GGCAGCCCTGGTGCTTCTTCCACCCAGCTACCCAGCTACAAGCTGGAGAACCCTGA  GCTCCTCTGAAATGGGCTACACGGCCACCCTGACCCGTACCACCCCACTTCTTCC  CCAAGGACATCCTGACCCTGCGGCTGGACGTGATGATGGAGACTGAGAACCGCCTCC  ACTTCACG</p>	2
GAA- IVS2	<p>GTGGGCAGGCGAGGGCGGGGGCGGGCGGCCAGGGCAGAGGGTGCAGCTGGACATCGA  CACCACGCACCTCACAAAGGGTGGGGTGATGTTGCACCACTGTGTGCTGGGCCCTT  GCTGGGAGCGGAGGTGTGAGCAGACAATGGCAGCGCCCTCGGGGAGCAGTGGGGAC</p>	3

10

20

30

40

【表 1 - 3】

	ACCACGGTGACAGGTACTCCAGAAGGCAGGGCTCGGGGCTCATTCATCTTTATGAAA AGGTGGGTCAGGTAGAGTAGGGCTGCCAGAGGTTGCGAATGAAAACAGGATGCCCAG TAAACCCGAATTGCAGATACCCAGGCATGACTTTGTTTTTTTGTGTAAGGATGCAA AATTTGGGATGTATTTATACTAGAAAAGCTGCTTGTGTTTATCTGAAATTCAGAGT TATCAGGTGTTCTGTATTTTACCTCCATCCTGGGGGAGGCGTCCTCCTCCTGGCTCT GCAGATGAGGGAGCCGAGGCTCAGAGAGGCTGAATGTGCTGCCCATGGTCCCACATC CATGTGTGGCTGCACCAGGACCTGACCTGTCCTTGGCGTGCGGGTTGTTCTCTGGAG AGTAAGGTGGCTGTGGGGAACATCAATAAACCCCATCTCTTCTAG	
--	--	--

## 【0070】

10

一定の実施形態では、アンチセンスターゲット配列を、表 1 に列挙した 1 つまたはそれを超える標的配列領域にハイブリッド形成するようにデザインする。選択されたアンチセンスターゲット配列を、より短く（例えば、約 12 塩基）またはより長く（例えば、約 40 塩基）することができ、この配列が標的配列へのハイブリッド形成の際にスプライス調整するのに十分な相補性を示し、必要に応じて RNA と T<sub>m</sub> が 45 またはそれを超えるヘテロ二重鎖を形成する限り、少数のミスマッチを含む。

## 【0071】

一定の実施形態では、標的配列とアンチセンスターゲット配列との間の相補度は、安定な二重鎖を形成するのに十分である。アンチセンスオリゴマーの標的 RNA 配列との相補性領域は、8 ~ 11 塩基の長さであってよいが、12 ~ 15 塩基またはそれを超える（例えば、10 ~ 40 塩基、12 ~ 30 塩基、12 ~ 25 塩基、15 ~ 25 塩基、12 ~ 20 塩基、または 15 ~ 20 塩基（これらの範囲の間の全ての整数が含まれる））。約 14 ~ 15 塩基のアンチセンスオリゴマーは、一般に、固有の相補配列を有するのに十分な長さである。一定の実施形態では、本明細書中で考察するように、必要な結合 T<sub>m</sub> を得るのに最低限の相補塩基の長さが必要であり得る。

20

## 【0072】

一定の実施形態では、長さが 40 塩基であり、少なくとも最小数の塩基（例えば、10 ~ 12 塩基）が標的配列に相補的であるオリゴマーが適切であり得る。いくつかの実施形態では、約 30 塩基未満のオリゴマー長が容易または活性な細胞中への取り込みに最適である。本明細書中でさらに記載される PMO オリゴマーについて、結合安定性と取り込みとの最適なバランスは、一般に、18 ~ 25 塩基長で得られる。約 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または 40 塩基からなり、少なくとも約 6、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または 40 個の連続または不連続の塩基が表 1 の標的配列（例えば、配列番号 1 ~ 3、配列番号 1 / 2 または配列番号 2 / 3 に及ぶ配列）に相補的であるアンチセンスオリゴマー（例えば、PMO、PMO-X、PNA、LNA、2'-OMe）が本開示に含まれる。

30

## 【0073】

40

アンチセンスオリゴマーは、典型的には、ヒト GAA 遺伝子のプレ-mRNA 配列のイントロン 1、エクソン 2、またはイントロン 2 内またはこれらに隣接する配列または領域に十分に相補的な塩基配列を含む。理想的に、アンチセンスオリゴマーは、GAA プレ-mRNA の異常なスプライシングを有効に調整し、それにより、活性 GAA タンパク質の発現を増加させることができる。オリゴマー化合物が、哺乳動物細胞によって能動的に取り込まれ、一旦取り込まれると、必要に応じて約 40 または 45 を超える T<sub>m</sub> で標的 mRNA と安定な二重鎖（またはヘテロ二重鎖）を形成する能力を有する場合、この要件が必要に応じて満たされる。

## 【0074】

一定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、標的配列に 100% 相補的であり得

50

るか、オリゴマーと標的配列との間に形成されたヘテロ二重鎖が細胞ヌクレアーゼの作用および *in vivo* で起こり得る他の分解様式に耐えぬのに十分に安定である限り、例えば、バリエーションに適応するためのミスマッチを含むことができる。それ故、一定のオリゴマーは、オリゴマーと標的配列との間に実質的な相補性（約または少なくとも約 70 % の配列相補性（例えば、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 配列相補性を意味する）を有し得る。ヌクレアーゼによる切断に対する感受性が低いオリゴマー骨格を、本明細書中で考察している。ミスマッチは、存在する場合、典型的には、ハイブリッド二重鎖の中央よりも末端領域に向

10

#### 【0075】

オリゴマーと標的配列との間に形成された二重鎖の安定性は、結合  $T_m$  と細胞酵素的切断に対する二重鎖の感受性との関数である。相補配列 RNA に関するオリゴマーの  $T_m$  を、従来の方法（Hamesら, *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, pp. 107 - 108 または Miyada C. G. and Wallace R. B., 1987, *Oligomer Hybridization Techniques, Methods Enzymol. Vol. 154* pp. 94 - 107 に記載の方法など）によって測定することができる。一定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、相補配列 RNA に関して、体温より高温、好ましくは約 45 または 50 を超える結合  $T_m$  を有し得る。60 ~ 80 の範囲またはそれを超える  $T_m$  も含まれる。周知の原理にしたがって、相補ベースの RNA ハイブリッドに関するオリゴマーの  $T_m$  を、二重鎖中の C : G 対合塩基の比率の増加、および / またはヘテロ二重鎖の（塩基対中の）長さの増加によって上昇させることができる。同時に、細胞取り込みの至適化のために、オリゴマーのサイズを制限することが有利であり得る。この理由

20

30

#### 【0076】

以下の表 2 は、ヒト GAA 遺伝子のプレ - mRNA 配列のイントロン 1、エクソン 2、またはイントロン 2 に完全に相補的な例示的なターゲティング配列（5' - 3' 方向）を示す。

#### 【表 2 - 1】

表2 GAAをターゲティングするオリゴマーのアンチセンスオリゴマー配列		
名称	配列(5'-3')	配列番号

40

【表 2 - 2】

GAAイントロン1アンチセンス配列		
GAA-IVS1 (-39-20)	GCXCAGCAGGGAGGCGGGAG	4
GAA-IVS1 (-74-55)	GGCXCXCAAAGCAGCXCXGA	5
GAA-IVS1 (-99-75)	GACAXCAACCGCGGCXGGCACXGCA	6
GAA-IVS1 (-139-115)	GGGXAAGGXGGCCAGGGXGGGXGX	7
GAA-IVS1 (-158-140)	GCCCXGCXGXCXAGACXGG	8
GAA-IVS1 (-179-160)	GAGAGGGCCAGAAGGAAGGG	9
GAA-IVS1.4.20	GGGGCAGACGXCAGGXGXCX	26
GAA-IVS1.6.20	GCGGGGCAGACGXCAGGXGX	27
GAA-IVS1.8.20	GCGCGGGGCAGACGXCAGGX	28
GAA-IVS1.10.20	CAGCGCGGGGCAGACGXCAG	29
GAA-IVS1.12.20	GGCAGCGCGGGGCAGACGX	30
GAA-IVS1.14.20	CCGGCAGCGCGGGGCAGACG	31
GAA-IVS1.15.20	GCCGGCAGCGCGGGGCAGAC	32
GAA-IVS1.17.20	CCGCCGGCAGCGCGGGGCAG	33
GAA-IVS1.21.20	GXXACCGCCGGCAGCGCGGG	34
GAA-IVS1.24.20	GAXGXXACCGCCGGCAGCGC	35
GAA-IVS1.26.20	GGGAXGXXACCGCCGGCAGC	36
GAA-IVS1.28.20	CXGGGAXGXXACCGCCGGCA	37
GAA-IVS1.30.20	XXCXGGGAXGXXACCGCCGG	38
GAA-IVS1.32.20	GCXXCXGGGAXGXXACCGCC	39
GAA-IVS1.2013.20	GCAACXCGXAXGXCCXXAGG	40
GAA-IVS1.2015.20	XGGCAACXCGXAXGXCCXXA	41
GAA-IVS1.2017.20	XCXGGCAACXCGXAXGXCCX	42
GAA-IVS1.2019.20	AXXCXGGCAACXCGXAXGXC	43
GAA-IVS1.2022.20	GXGAXXCXGGCAACXCGXAX	44
GAA-IVS1.2024.20	AAGXGAXXCXGGCAACXCGX	45
GAA-IVS1.2037.20	XGGGXGXGXCAGCGGAAGXGAX	46
GAA-IVS1.2041.20	CCACXGGGXGXGXCAGCGGAAG	47
GAA-IVS1.2043.20	GXCCACXGGGXGXGXCAGCGGA	48
GAA-IVS1.2045.20	XGGXCCACXGGGXGXGXCAGCG	49
GAA-IVS1.2048.20	GCXXGGXCCACXGGGXGXCA	50
GAA-IVS1.2069.20	CCACXXCXGCAXAAAGGXGC	51
GAA-IVS1.2071.20	CCCCACXXCXGCAXAAAGGX	52
GAA-IVS1.2073.20	AGCCCCACXXCXGCAXAAAG	53
GAA-IVS1.2075.20	GGAGCCCCACXXCXGCAXAA	54
GAA-IVS1.2077.20	XGGGAGCCCCACXXCXGCAX	55
GAA-IVS1.2079.20	GCXGGGAGCCCCACXXCXGC	56
GAA-IVS1.2081.20	XGGCXGGGAGCCCCACXXCX	57
GAA-IVS1.2088.20	CCACGCCXGGCXGGGAGCCC	58
GAA-IVS1.2115.20	XCCGAAGXGCXGGGAXXXCA	59
GAA-IVS1.2132.20	XCCACCCCCCXGGCCXXCC	60
GAA-IVS1.2135.20	XGAXCCACCCCCCXGGCCX	61
GAA-IVS1.2140.20	XCAAGXGAXCCACCCCCCX	62
GAA-IVS1.2143.20	AGCXCAAGXGAXCCACCCCC	63
GAA-IVS1.2152.20	GAACXCCXGAGCXCAAGXGA	64
GAA-IVS1.2156.20	XCXCGAACXCCXGAGCXCAA	65
GAA-IVS1.2163.20	AGGCXGGXCXCGAACXCCXG	66
GAA-IVS1.2165.20	CCAGGCXGGXCXCGAACXCC	67
GAA-IVS1.2178.20	XXXGCCAXGXXACCCAGGCX	68
GAA-IVS1.2183.20	GGGAXXXGCCAXGXACCC	69
GAA-IVS1.2185.20	ACGGGAXXXGCCAXGXAC	70
GAA-IVS1.2188.20	GAGACGGGAXXXGCCAXGX	71
GAA-IVS1.2190.20	XAGAGACGGGAXXXGCCAX	72
GAA-IVS1.2195.20	XXXXGXAGAGACGGGAXXX	73
GAA-IVS1.2200.20	XGXAXXXXGXAGAGACGGG	74
GAA-IVS1.2202.20	XCXGXAXXXXGXAGAGACG	75
GAA-IVS1.2204.20	XXXCXGXAXXXXGXAGAGA	76

10

20

30

40

【表 2 - 3】

GAA-IVS1.2206.20	AXXXXCXGXAXXXXGXAGA	77
GAA-IVS1.2208.20	XAXXXXCXGXAXXXXGXAX	78
GAA-IVS1.2210.20	GCXAXXXXCXGXAXXXXGX	79
GAA-IVS1(-74-55)	GGCXCCXCAAAGCAGCXCXGA	104
GAA-IVS1(-79-55)	GGCXCCXCAAAGCAGCXCXGAGACAX	105
GAA-IVS1(-74-50)	CACGGGGCXCCXCAAAGCAGCXCXGA	106
GAA-IVS1(-79-60)	XCAAAGCAGCXCCXGAGACAX	107
GAA-IVS1(-69-55)	CACGGGGCXCCXCAAAGCAGC	108
GAA-IVS1(-158-140)	GCCCXGCXGXCXAGACXGG	109
GAA-IVS1(-163-140)	GCCCXGCXGXCXAGACXGGGGAGA	110
GAA-IVS1(-158-135)	GXGXXGCCXGCXGXCXGGACXGG	111
GAA-IVS1(-163-145)	GCXGXCXAGACXGGGGAGA	112
GAA-IVS1(-153-135)	GXGXXGCCXGCXGXCXAG	113
GAA-IVS2(-173-192)	CXGGAGXACCXGXCACCGXG	114
GAA-IVS2(-168-192)	CXGGAGXACCXGXCACCGXGGXGXC	115
GAA-IVS2(-173-197)	GCCXXCXGGAGXACCXGXCACCGXG	116
GAA-IVS2(-168-187)	GXACCXGXCACCGXGGXGXC	117
GAA-IVS2(-178-197)	GCCXXCXGGAGXACCXGXCA	118
<b>GAAエクソン2アンチセンス配列</b>		
GAAEx2A(+202+226)	GGCCCXGGXCCXGCGXGGCXCCCXGCX	24
GAAEx2A(+367+391)	GCXCCCXGCAGCCCCXGCGXXGCGAG	25
<b>GAAイントロン2アンチセンス配列</b>		
GAA-IVS2(-4-20)	CCCGCCCCXGCCXGCC	10
GAA-IVS2(-14-30)	XGGCCGCCGCCCGCCC	11
GAA-IVS2(-33-52)	XGXCCACGCGCACCCXCCXGC	12
GAA-IVS2(-53-72)	GXGAGGXGCGXGGGXGXCAG	13
GAA-IVS2(-73-92)	GCAACAXGCACCCACCCXX	14
GAA-IVS2(-93-112)	AGGGCCCAGCACAGXGGX	15
GAA-IVS2(-113-132)	XCACACCXCCGXCXCCAGCA	16
GAA-IVS2(-133-150)	GGCGCXGCCAXXGXCCXGC	17
GAA-IVS2(-153-172)	GXGXCCCCACXGCXCCCCGA	18
GAA-IVS2(-173-192)	CXGGAGXACCXGXCACCGXG	19
GAA-IVS2(-193-212)	XGAGCCCCGAGCCCXGCCXX	20
GAA-IVS2(-213-237)	XGACCCACCXXXXCAXAAAGAXGAA	21
GAA-IVS2(-234-258)	CXCCGGCAGCCCXACXCCXGAC	22
GAA-IVS2(-338-364)	CXAGXAXAAAXACAXCCCAAAXXXGCG	23
GAA-IVS2.1.20	CCCGCCCCXGCCXGCCAC	80
GAA-IVS2.6.20	CCGCCCCCGCCCCXGCCXG	81
GAA-IVS2.9.20	CCGCCCCCGCCCCXGCC	82
GAA-IVS2.12.20	XGGCCGCCGCCCGCCCCX	83
GAA-IVS2.18.20	CXGCCXGGCCGCCCGCCCC	84
GAA-IVS2.24.20	CACCCXCCGCCXGGCCGCC	85
GAA-IVS2.27.20	GCGCACCCXCCGCCXGGCC	86
GAA-IVS2.40.20	XGXCGAXGCCACGCGCACC	87
GAA-IVS2.45.20	GXGGGXGXCAGXGCCACGC	88
GAA-IVS2.48.20	XGCGXGGGXGXCAGXGCCA	89
GAA-IVS2.54.20	GXGAGGXGCGXGGGXGXCAG	90
GAA-IVS2.67.20	GCACCCACCCXXGXGAGGX	91
GAA-IVS2.72.20	AACAXGCACCCACCCXXGX	92
GAA-IVS2.431.20	AGGAGGAGGACGCCXCCCC	93
GAA-IVS2.446.20	CXCAXCXCAGAGCCAGGAG	94
GAA-IVS2.448.20	CCCXACXCCAGAGCCAGG	95
GAA-IVS2.450.20	CXCCCXACXCCAGAGCCA	96
GAA-IVS2.451.20	GCXCCCXACXCCAGAGCC	97
GAA-IVS2.452.20	GGCXCCCXACXCCAGAGC	98
GAA-IVS2.453.20	CGGCXCCCXACXCCAGAG	99
GAA-IVS2.454.20	XCGGCXCCCXACXCCAGAG	100
GAA-IVS2.455.20	CXCGGCXCCCXACXCCAG	101

10

20

30

40



【表 2 - 4】

GAA-IVS2.456.20	CCXCGGCXCCCXCAXCXGCA	102
GAA-IVS2.457.20	GCCXCGGCXCCCXCAXCXGC	103
表2中の任意の配列について、各Xは、チミン (T)またはウラシル (U)から独立して選択される。		

## 【 0 0 7 7 】

したがって、一定のアンチセンスオリゴマーは、表 1 中の配列（例えば、配列番号 4 ~ 1 2 0）またはそのバリエーション、連続部分、もしくは不連続部分を含むか、これらからなるか、これらから本質的になる。例えば、一定のアンチセンスオリゴマーは、配列番号 4 ~ 1 2 0 のいずれかの約または少なくとも約 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、または 27 個の連続または不連続のヌクレオチドを含む。不連続部分について、介在ヌクレオチドを欠失させるか、異なるヌクレオチドと置換するか、介在ヌクレオチドを付加することができる。バリエーションのさらなる例には、配列番号 4 ~ 1 2 0 のいずれかの全配列にわたって約または少なくとも約 70% の配列同一性または配列相同性（例えば、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性または配列相同性）を有するオリゴマーが含まれる。

## 【 0 0 7 8 】

アンチセンスオリゴマーおよびそのバリエーションの活性を、当該分野の日常的技術にしたがってアッセイすることができる。例えば、調査対象の RNA およびタンパク質のスプライス型および発現レベルを、転写された核酸またはタンパク質のスプライス型および/または発現の検出のための広範な種々の周知の検出方法のいずれかによってアッセイすることができる。かかる方法の非限定的な例には、スプライシング型 RNA の RT-PCR およびその後の PCR 産物のサイズ分離、核酸ハイブリッド形成法（例えば、ノーザンブロットおよび/または核酸アレイの使用）；核酸増幅法；タンパク質検出のための免疫学的方法；タンパク質精製法；およびタンパク質の機能または活性のアッセイが含まれる。

## 【 0 0 7 9 】

RNA 発現レベルを、細胞、組織、または器官由来の mRNA / cDNA（すなわち、転写されたポリヌクレオチド）の調製およびアッセイされる核酸またはそのフラグメントに相補的な基準ポリヌクレオチドを使用した mRNA / cDNA のハイブリッド形成によってアッセイすることができる。cDNA を、必要に応じて、相補ポリヌクレオチドとのハイブリッド形成前に種々のポリメラーゼ連鎖反応または *in vitro* 転写法のうちのいずれかを使用して増幅させることができる。好ましくは、増幅させない。1つまたはそれを超える転写物の発現を、定量的 PCR を使用して検出して転写物の発現レベルを評価することもできる。

## 【 0 0 8 0 】

III. アンチセンスオリゴマーの化学的性質

## A. 一般的な特徴

本開示の一定のアンチセンスオリゴマーは、イントロンスプライスサイレンサーエレメントまたはエクソンスプライスサイレンサーエレメントに特異的にハイブリッド形成する。いくつかのアンチセンスオリゴマーは、表 2 に記載のターゲティング配列、表 2 中のターゲティング配列の少なくとも 10 個の連続するヌクレオチドのフラグメント、または表 2 中のターゲティング配列と少なくとも 80% の配列が同一のバリエーションを含む。特異的なアンチセンスオリゴマーは、表 2 に記載のターゲティング配列からなるか、本質的になる。いくつかの実施形態では、オリゴマーはヌクレアーゼ耐性を示す。

## 【 0 0 8 1 】

一定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホルアミダートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー（PMO）、ペプチド核酸（P

NA)、ロックド核酸(LNA)、ホスホロチオアートオリゴマー、トリシクロ-DNAオリゴマー、トリシクロ-ホスホロチオアートオリゴマー、2'-O-Me修飾オリゴマー、または前記の任意の組み合わせから選択される非天然化学骨格、およびヒト酸性-グルコシダーゼ(GAA)遺伝子のプレ-mRNAのイントロン1(配列番号1)、イントロン2(配列番号2)、またはエクソン2(配列番号3)内の領域に相補的なターゲティング配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号4~120(ここで、Xはウラシル(U)またはチミン(T)から選択される)から選択される。

#### 【0082】

開示のアンチセンスオリゴマーは、一般に、複数のヌクレオチドサブユニットを含み、各ヌクレオチドサブユニットは、共にターゲティング配列(例えば、上記で考察のもの)を形成するか含む核酸塩基を保有する。したがって、いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約10~約40サブユニット長、より好ましくは約10~30サブユニット長、典型的には15~25サブユニット長の範囲である。例えば、本開示のアンチセンス化合物は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40サブユニット長であり得るか、10サブユニット~40サブユニット、10サブユニット~30サブユニット、14サブユニット~25サブユニット、15サブユニット~30サブユニット、17サブユニット~30サブユニット、17サブユニット~27サブユニット、10サブユニット~27サブユニット、10サブユニット~25サブユニット、および10サブユニット~20サブユニットの範囲であり得る。一定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約10~約40ヌクレオチド長または約5~約30ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、約14~約25または約17~約27ヌクレオチド長である。

#### 【0083】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーの骨格は、実質的に無電荷であり、必要に応じて、細胞膜を通過する能動輸送または促進輸送の基質として認識される。いくつかの実施形態では、全てのヌクレオシド間(internucleoside)連結が無電荷である。オリゴマーが標的RNAと安定な二重鎖を形成する能力はまた、骨格の他の特徴(標的に関するアンチセンスオリゴマーの長さおよび相補度、A:Tに対するG:Cの塩基マッチの比、ならびにミスマッチした任意の塩基の位置が含まれる)に関し得る。アンチセンスオリゴマーが細胞ヌクレアーゼに耐性を示す能力により、生存度および薬物の細胞質への最終的な送達を促進することができる。例示的なアンチセンスオリゴマーターゲティング配列を表2(上記)に列挙している。

#### 【0084】

一定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、生理学的pHで正電荷またはカチオン性の少なくとも1つのヌクレオシド間連結を有する。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、pKaが約5.5と約12との間の少なくとも1つのヌクレオシド間連結を有する。必要に応じて、アンチセンスオリゴマーは、塩基性窒素とアルキル基、アリール基、またはアラルキル基との両方を有する少なくとも1つのヌクレオシド間連結を有する。特定の実施形態では、カチオン性ヌクレオシド間連結は、4-アミノピペリジン(aminopiperidine)-1-イル(APN)基またはその誘導体を含む。いかなる1つの理論にも拘束されないが、オリゴマー中のカチオン性連結(例えば、APN基またはAPN誘導体)の存在が標的ヌクレオチド中の負電荷のリン酸への結合を容易にすると考えられる。したがって、変異RNAとカチオン性連結含有オリゴマーとの間のヘテロ二重鎖の形成は、イオン性引力とワトソン・クリック型塩基対合との両方によって保持され得る。

#### 【0085】

いくつかの実施形態では、カチオン性連結数は、少なくとも2且つ総ヌクレオシド間連結数の約半分以下(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12

10

20

30

40

50

、13、14、15、16、17、18、19、20または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20以下)のカチオン性連結である。しかし、いくつかの実施形態では、全てのヌクレオシド間連結数までがカチオン性連結である(例えば、総ヌクレオシド間連結の約または少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40がカチオン性連結である)。特定の実施形態では、約19~20サブユニットのオリゴマーは、2~10(例えば、4~8)のカチオン性連結を有することができ、残りは無電荷連結である。他の特定の実施形態では、14~15サブユニットのオリゴマーは、2~7(例えば、2、3、4、5、6、または7)のカチオン性連結を有することができ、残りは無電荷連結である。したがって、オリゴマー中のカチオン性連結の総数は、約1~10、15、20、30までまたはそれを超えてよく(数値の間の全整数が含まれる)、カチオン性連結はオリゴマーの至る所に散在し得る。

10

#### 【0086】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、2~5、または2、3、4、もしくは5無電荷連結あたり約1または約1まで(10無電荷連結あたり約4~5、4、または5など)のカチオン性連結を有し得る。

#### 【0087】

一定の実施形態は、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%カチオン性連結を含むアンチセンスオリゴマーを含む。一定の実施形態では、約25%の骨格連結がカチオン性である場合、アンチセンス活性の最適な改善が認められる。一定の実施形態では、少数(例えば、10~20%のカチオン性連結)であるか、カチオン性連結数が50~80%の範囲(約60%など)である場合、アンチセンス活性の増強が認められる。

20

#### 【0088】

いくつかの実施形態では、カチオン性連結は骨格に沿って散在する。かかるオリゴマーは、必要に応じて、少なくとも2つの連続する無電荷連結を含む。すなわち、オリゴマーは、必要に応じて、その全長に沿って厳格に交互のパターンを持たない。具体例として、1つまたは2つの各カチオン性連結は、少なくとも1、2、3、4、または5個の無電荷連結によって骨格に沿って分離されている。

30

#### 【0089】

カチオン性連結のブロックおよび無電荷連結のブロックを有するオリゴマーも含まれる。例えば、無電荷連結の中心ブロックは、カチオン性連結のブロックに隣接することができ、その逆も同様である。いくつかの実施形態では、オリゴマーは、およそ等しい長さの5'、3'、および中心領域を有し、中心領域中のカチオン性連結の割合は、総カチオン性連結数の約50%、60%、70%、または80%を超える。

#### 【0090】

一定のアンチセンスオリゴマーでは、大部分のカチオン性連結(例えば、70、75%、80%、90%のカチオン性連結)は、「中心領域」骨格連結に近接して分布している(例えば、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15の真ん中の連結)。例えば、16、17、18、19、20、21、22、23、または24量体のオリゴマーは、8、9、10、11、または12個の真ん中の連結に局在する総カチオン性連結のうちの少なくとも50%、60%、70%、または80%を有し得る。

40

#### 【0091】

### B. 骨格の化学的性質の特徴

アンチセンスオリゴマーは、種々のアンチセンスの化学的性質を利用することができる。オリゴマーの化学的性質の例には、ペプチド核酸(PNA)、ロックド核酸(LNA)、ホスホロチオアート、2'-O-Me修飾オリゴマー、モルホリノ、PMO、PPMO、

50

P M O p l u s、および P M O - X の化学的性質（上記のいずれかの組み合わせが含まれる）が含まれるが、これらに限定されない。一般に、P N A および L N A の化学的性質は、P M O および 2' O - M e オリゴマーより比較的高い標的結合強度を有するので、より短いターゲティング配列を利用することができる。ホスホロチオアートおよび 2' O - M e 修飾の化学的性質をしばしば組み合わせて 2' O - M e - ホスホロチオアート骨格を生成する。例えば、P C T 公開番号 W O / 2 0 1 3 / 1 1 2 0 5 3 号および W O / 2 0 0 9 / 0 0 8 7 2 5 号（その全体が本明細書中で参考として組み込まれる）を参照のこと。

#### 【 0 0 9 2 】

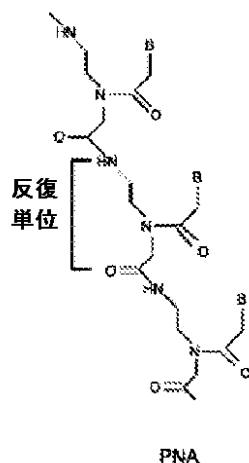
いくつかの例では、P M O などのアンチセンスオリゴマーを、細胞内送達を容易にするために細胞透過性ペプチド（C P P）に結合体化することができる。ペプチド結合体化 P M O を P P M O と呼び、一定の実施形態は、P C T 公開番号 W O / 2 0 1 2 / 1 5 0 9 6 0 号（その全体が本明細書中で参考として組み込まれる）に記載の P P M O を含む。

#### 【 0 0 9 3 】

##### 1. ペプチド核酸（P N A）

ペプチド核酸（P N A）は、骨格がデオキシリボース骨格と構造的に同形であり、ピリミジン塩基またはプリン塩基が付着した N - （2 - アミノエチル）グリシン単位からなる D N A アナログである。天然のピリミジン塩基およびプリン塩基を含む P N A は、ワトソン・クリック塩基対合則に従って相補オリゴマーにハイブリッド形成し、塩基対認識に関して D N A を模倣する（E g h o l m , B u c h a r d t ら、1 9 9 3）。P N A 骨格は、ホスホジエステル結合よりもむしろペプチド結合によって形成され、それにより、アンチセンスへ適用するのに十分に適するようになる（以下の構造を参照のこと）。骨格は無電荷であり、それにより熱安定性が通常より高い P N A / D N A 二重鎖または P N A / R N A 二重鎖が得られる。P N A は、ヌクレアーゼやプロテアーゼによって認識されない。P N A の非限定的な例を以下に示す。

#### 【 化 7 】



#### 【 0 0 9 4 】

天然構造と比較して構造変化が大きいにもかかわらず、P N A はヘリックス形態中の D N A または R N A に配列特異的に結合することができる。P N A の特徴には、相補 D N A または R N A に対する高結合親和性、1 塩基ミスマッチに原因する不安定化、ヌクレアーゼおよびプロテアーゼに対する耐性、塩濃度と無関係の D N A または R N A とのハイブリッド形成、およびホモプリン D N A との三重鎖形成が含まれる。P A N A G E N E（商標）は、その専売の B t s P N A 単量体（B t s；ベンゾチアゾール - 2 - スルホニル基）および専売のオリゴマー形成プロセスを開発した。B t s P N A モノマーを使用した P N A オリゴマー形成は、脱保護、カップリング、およびキャッピングの反復サイクルから構成される。P N A を、当該分野で公知の任意の技術を使用して合成することができる。例えば、米国特許第 6, 9 6 9, 7 6 6 号、同第 7, 2 1 1, 6 6 8 号、同第 7, 0 2

2, 851号、同第7, 125, 994号、同第7, 145, 006号、および同第7, 179, 896号を参照のこと。PNAの調製については、米国特許第5, 539, 082号；同第5, 714, 331号；および同第5, 719, 262号も参照のこと。PNA化合物のさらなる教示を、Nielsenら, Science, 254: 1497-1500, 1991に見出すことができる。上記の各文献は、その全体が参考として組み込まれる。

#### 【0095】

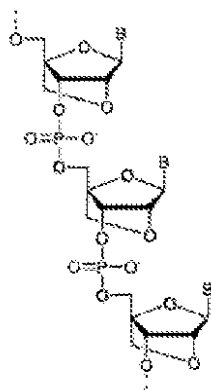
#### 2. ロックド核酸 (LNA)

アンチセンスオリゴマー化合物は、「ロックド核酸」サブユニット (LNA) も含むことができる。「LNA」は、架橋核酸 (BNA) と呼ばれる修飾物クラスのメンバーである。BNAは、C3'-endo (ノーザン) 糖パッカー (C3'-endo (northern) sugar pucker) 中のリボース環の高次構造をロックする共有連結によって特徴づけられる。LNAについて、架橋は、2'-O位と4'-C位との間のメチレンから構成される。LNAは、骨格のプレオーガニゼーションおよび塩基の積み重ねを増強してハイブリッド形成および熱安定性を増大させる。

#### 【0096】

LNAの構造を、例えば、Wengelら, Chemical Communications (1998) 455; Tetrahedron (1998) 54: 3607, および Accounts of Chem. Research (1999) 32: 301; Obikaら, Tetrahedron Letters (1997) 38: 8735; (1998) 39: 5401, および Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16: 9230に見出すことができる。LNAの非限定的な例を以下に示す。

#### 【化8】



LNA

#### 【0097】

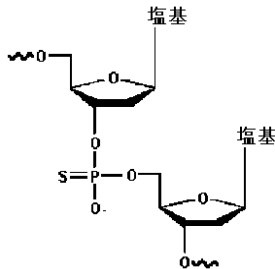
本開示の化合物は、1つまたはそれを超えるLNAを組み込むことができる。いくつかの場合、化合物は、専らLNAから構成され得る。個別のLNAヌクレオシドサブユニットの合成およびオリゴマーへのその組み込み方法は、例えば、米国特許第7, 572, 582号、同第7, 569, 575号、同第7, 084, 125号、同第7, 060, 809号、同第7, 053, 207号、同第7, 034, 133号、同第6, 794, 499号、および同第6, 670, 461号（それぞれその全体が参考として組み込まれる）に記載されている。典型的なサブユニット間リンカーは、ホスホジエステル部分およびホスホロチオアート部分を含み、あるいは、非亜リン酸含有リンカーを使用することができる。1つの実施形態は、各LNAサブユニットがDNAサブユニットによって分離されたLNA含有化合物である。一定の化合物は、交互に存在するLNAサブユニットおよびDNAサブユニットから構成され、サブユニット間リンカーはホスホロチオアートである。

## 【 0 0 9 8 】

## 3 . ホスホロチオアート

「ホスホロチオアート」（またはS - オリゴ）は、非架橋酸素のうちの1つが硫黄に置換された通常のDNAのバリエーションである。ホスホロチオアートの非限定的な例を以下に示す。

## 【 化 9 】



10

## 【 0 0 9 9 】

ヌクレオチド間結合の硫化により、エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼ（5'、3'および3'、5'のDNA POL 1エキソヌクレアーゼ、ヌクレアーゼS 1およびP 1、RNアーゼ、血清ヌクレアーゼ、およびヘビ毒ホスホジエステラーゼが含まれる）の作用を低下させる。ホスホロチオアートを、以下の2つの主要な経路によって作製する：元素硫黄の炭素ジスルフィド溶液の水素ホスホナートに対する作用またはテトラエチルチウラムジスルフィド（TETD）もしくは3H - 1, 2 - ベンゾジチオール（benso d i t h i o l） - 3 - オン1, 1 - ジオキシド（BDTD）のいずれかを使用して亜リン酸トリエステルを硫化すること（例えば、Iyerら, J. Org. Chem. 55, 4693 - 4699, 1990を参照のこと）。後者の方法により、ほとんどの有機溶媒における元素硫黄の不溶性および炭素ジスルフィドの毒性の問題が回避される。TETD法およびBDTD法により、より高い純度のホスホロチオアートも得られる。

20

## 【 0 1 0 0 】

## 4 . トリシクロ - DNAおよびトリシクロ - ホスホロチオアートヌクレオチド

トリシクロ - DNA（tc - DNA）は、骨格の高次構造の柔軟性を制限し、ねじれ角の骨格幾何学的性質を最適にするために各ヌクレオチドがシクロプロパン環の導入によって修飾された拘束型DNAアナログクラスである。ホモ塩基性アデニンおよびチミン含有tc - DNAは、相補RNAと異常に安定なA - T塩基対を形成する。トリシクロ - DNAおよびその合成は、国際公開番号WO 2010 / 115993号に記載されている。本開示の化合物は、1つまたはそれを超えるトリサイクル - DNAヌクレオチドを組み込むことができる。いくつかの場合、化合物は、専らトリサイクル - DNAヌクレオチドから構成され得る。

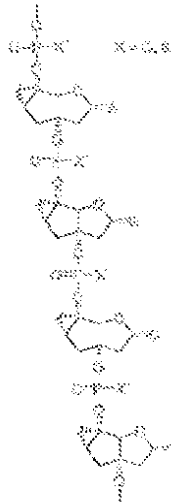
30

## 【 0 1 0 1 】

トリシクロ - ホスホロチオアートヌクレオチドは、ホスホロチオアートサブユニット間連結を有するトリシクロ - DNAヌクレオチドである。トリシクロ - ホスホロチオアートヌクレオチドおよびその合成は、国際公開番号WO 2013 / 053928号に記載されている。本開示の化合物は、1つまたはそれを超えるトリサイクル - DNAヌクレオチドを組み込むことができる。いくつかの場合、化合物は、専らトリサイクル - DNAヌクレオチドから構成され得る。トリサイクル - DNA / トリサイクル - ホスホロチオアートヌクレオチドの非限定的な例を以下に示す。

40

## 【化 10】



10

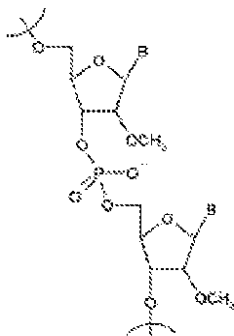
## 【 0 1 0 2 】

## 5. 2' - O - メチルオリゴマー

「2' - O - Meオリゴマー」分子は、リボース分子の2' - OH残基にメチル基を保有する。2' - O - Me - RNAは、DNAと同一（または類似の）挙動を示すが、ヌクレアーゼ分解から保護されている。2' - O - Me - RNAを、さらに安定化するためにホスホチオアートオリゴマー（PTO）と組み合わせることもできる。2' - O - Meオリゴマー（ホスホジエステルまたはホスホチオアート）を、当該分野の日常的技術にしたがって合成することができる（例えば、Yooら, *Nucleic Acids Res.* 32: 2008 - 16, 2004を参照のこと）。2' - O - Meオリゴマーの非限定的な例を以下に示す。

20

## 【化 11】



30

2' - O - Meオリゴマーは、ホスホチオアート連結（2' - O - Meホスホチオアートオリゴマー）を含むこともできる。

40

## 【 0 1 0 3 】

## 6. モルホリノオリゴマー

「モルホリノオリゴマー」または「PMO」は、典型的なポリヌクレオチドに水素結合することができる核酸塩基を支持する骨格を有するオリゴマーをいい、このポリマーはペントース糖骨格部分を欠くが、その代わりにモルホリノ環を含む。したがって、PMOでは、モルホリノ環構造は、典型的には処置される細胞または被験体中の選択されたアンチセンス標的にハイブリッド形成するようにデザインされた塩基対合部分の配列を形成するように塩基対合部分を支持する。例示的な「モルホリノ」オリゴマーは、ホスホルアミダート連結またはホスホジアミダート連結によって1つのサブユニットのモルホリノ窒素が隣接サブユニットの4' 環外炭素に接合したモルホリノサブユニット構造を含み、各サ

50

ブユニットは、塩基特異的水素結合によってポリヌクレオチド中の塩基へ結合するのに有効なプリン核酸塩基またはピリミジン核酸塩基を含む。モルホリノオリゴマー（アンチセンスオリゴマーが含まれる）については、例えば、米国特許第5,698,685号；同第5,217,866号；同第5,142,047号；同第5,034,506号；同第5,166,315号；同第5,185,444号；同第5,521,063号；同第5,506,337号、および継続中の米国特許出願12/271,036号；同第12/271,040号；ならびにPCT公開番号WO/2009/064471号およびWO/2012/043730号（前述の全てについて、その全体が本明細書中で参考として組み込まれる）に詳述されている。

#### 【0104】

10

オリゴマー構造内で、リン酸基は、一般に、オリゴマーの「ヌクレオシド間連結」の形成をいう。RNAおよびDNAの天然に存在するヌクレオシド間連結は、3' 5' ホスホジエステル連結である。「ホスホルアミダート」基は3つの酸素原子および1つの窒素原子が結合したリンを含む一方で、「ホスホロジアミダート」基は2つの酸素原子および2つの窒素原子が付着したリンを含む。本明細書中に記載のPMOおよび/またはPMO-Xオリゴマーの無電荷またはカチオン性のサブユニット間連結中の1つの窒素は骨格鎖に常に懸垂している。ホスホロジアミダート連結中の第2の窒素は、典型的には、モルホリノ環構造中の環窒素である。

#### 【0105】

「PMO-X」は、(i)モルホリノ環の窒素原子への共有結合および(ii)4-アミノピペリジン(aminopiperdine)-1-イル(すなわち、APN)または4-アミノピペリジン(aminopiperdine)-1-イルの誘導体の環窒素への第2の共有結合を有するリン原子を有するホスホロジアミダート(phosphorodiamidate)モルホリノオリゴマー(PMO)をいう。例示的なPMO-Xオリゴマーは、PCT出願番号PCT/US2011/38459号およびPCT公開番号WO/2013/074834号（それぞれその全体が本明細書中で参考として組み込まれる）に開示されている。「PMO-apn」または「APN」は、リン原子がモルホリノ基および4-アミノピペリジン(aminopiperdine)-1-イル(すなわち、APN)の環窒素に連結した少なくとも1つのヌクレオシド間連結を含むPMO-Xオリゴマーをいう。特定の実施形態では、表2に記載のターゲティング配列を含むアンチセンスオリゴマーは、少なくとも1つのAPN含有連結またはAPN誘導体含有連結を含む。特定の実施形態には、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%のAPN/APN誘導体含有連結を有し、残存する連結（100%未満の場合）が無電荷連結であるPMOが含まれる（例えば、総ヌクレオシド間連結の約または少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40がAPN/APN誘導体含有連結である）。

#### 【0106】

40

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、式(I)：



$$\begin{array}{c}
 \text{R}^2 \\
 | \\
 (\text{L})_n \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{O} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{N} \\
 | \\
 \text{P}=\text{O} \\
 | \\
 \text{Y} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{O} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{N} \\
 | \\
 \text{P}=\text{O} \\
 | \\
 \text{Y} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{O} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{N} \\
 | \\
 \text{R}^3 \quad \text{R}^4
 \end{array}
 \quad \text{Nu} \quad \text{R}^1 \quad \text{Nu} \quad \text{R}^1 \quad \text{Nu}$$

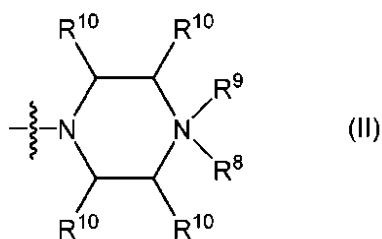
(I)

式 ( I I ) 部分：

20

40

## 【化 1 3】

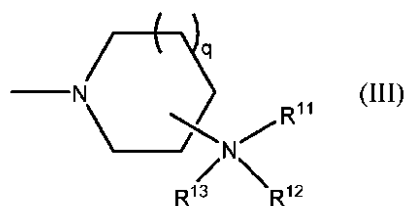


(式中、

R<sup>8</sup> は、水素、メチル、-C(=NH)NH<sub>2</sub>、-Z-T<sup>2</sup>-NHC(=NH)NH<sub>2</sub>、および-[C(O)CHR'NH]<sub>m</sub>R''からなる群から選択され、Zはカルボニルまたは直接結合であり、R<sup>9</sup>は、電子対、水素、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され、各R<sup>10</sup>は、水素またはメチルから独立して選択される) ; および

式(III)部分:

## 【化 1 4】



(式中、

qは0~2の整数であり、R<sup>11</sup>は、水素、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、アラルキル、および-C(=NH)NH<sub>2</sub>からなる群から選択され、R<sup>12</sup>は、水素、アラルキル、およびC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルからなる群から選択され、またはR<sup>11</sup>およびR<sup>12</sup>は窒素原子と付着して5~7員環を形成し、前記環は、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され、R<sup>13</sup>は、電子対、水素、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、およびアラルキルからなる群から選択される) からなる群から独立して選択され;

R<sup>2</sup>は、水素、OH、ヌクレオチド、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(O)NR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>からなる群から選択され、R<sup>f</sup>およびR<sup>g</sup>は、H、アシル、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、および-[C(O)CHR'NH]<sub>m</sub>R''、-[C(O)CHR'NH]<sub>m</sub>R''、H(O(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>O)<sub>w</sub>、H(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>w</sub>、トリチル、-C(=O)OR<sup>f</sup>、およびアシルから独立して選択され、R<sup>f</sup>は、1つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分またはその組み合わせを含むC<sub>1</sub>~C<sub>30</sub>アルキルであり、またはR<sup>2</sup>は存在せず;

R<sup>3</sup>は、水素、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、ヌクレオチド、-[C(O)CHR'NH]<sub>m</sub>R''、-C(=NH)NH<sub>2</sub>、トリチル、-C(=O)OR<sup>g</sup>、アシル、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(O)、およびT<sup>4</sup>-(4-(4,6-(NR<sub>2</sub>))-1,3,5-トリアジン-2-イル)ピペラジン-1-イルからなる群から選択され、R<sup>g</sup>は、1つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分またはその組み合わせを含むC<sub>1</sub>~C<sub>30</sub>アルキルであり、T<sup>4</sup>は-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>C(O)-または-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)-から選択され、Rは-(CH<sub>2</sub>)OC(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>であり;

R<sup>4</sup>は、電子対、水素、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、およびアシルからなる群から選択され、各R<sup>5</sup>は水素またはメチルから独立して選択され;

各R<sup>6</sup>および各R<sup>7</sup>は、水素または-T<sup>3</sup>-NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>R<sup>e</sup>から独立して選択され;

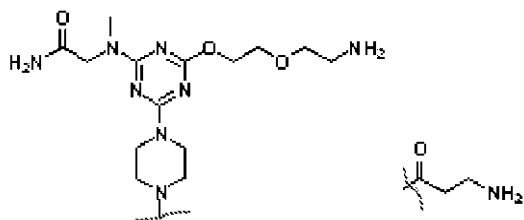
$T^1$ 、 $T^2$ 、および $T^3$ の各々は、独立して、アルキル基、アルコキシ基、もしくはアルキルアミノ基、またはその組み合わせを含む18原子長までの任意選択的なリンカーである)の化合物またはその薬学的に許容され得る塩であって、  
ここで、ターゲティング配列は、ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNAのイントロン1 (配列番号1)、イントロン2 (配列番号2)、またはエクソン2 (配列番号3) 内の領域に相補的である)の化合物またはその薬学的に許容され得る塩である。

【0107】

いくつかの実施形態では、 $R^3$ は $T^4$  - (4 - (4, 6 - (NR<sub>2</sub>) - 1, 3, 5 - トリアジン - 2 - イル) ピペラジン - 1 - イル部分であり、ここで、 $T^4$ は - C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>C(O) - または - C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O) - から選択され、Rは - (CH<sub>2</sub>)OC(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>である。かかる部分は、米国特許第7, 935, 816号 (その全体が本明細書中で参考として組み込まれる) にさらに記載されている。

一定の実施形態では、 $R^3$ は、下記の部分を含み得る。

【化15】



【0108】

一定の実施形態では、各 $R^1$ は - N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>である。いくつかの実施形態では、約50 ~ 90%の $R^1$ 基がジメチルアミノ (すなわち、 - N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) である。一定の実施形態では、約66%の $R^1$ 基がジメチルアミノである。

【0109】

いくつかの実施形態では、ターゲティング配列は、配列番号4 ~ 120 (ここで、Xはウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される。いくつかの実施形態では、各 $R^1$ は - N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>であり、ターゲティング配列は配列番号4 ~ 120 (ここで、Xはウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される。

【0110】

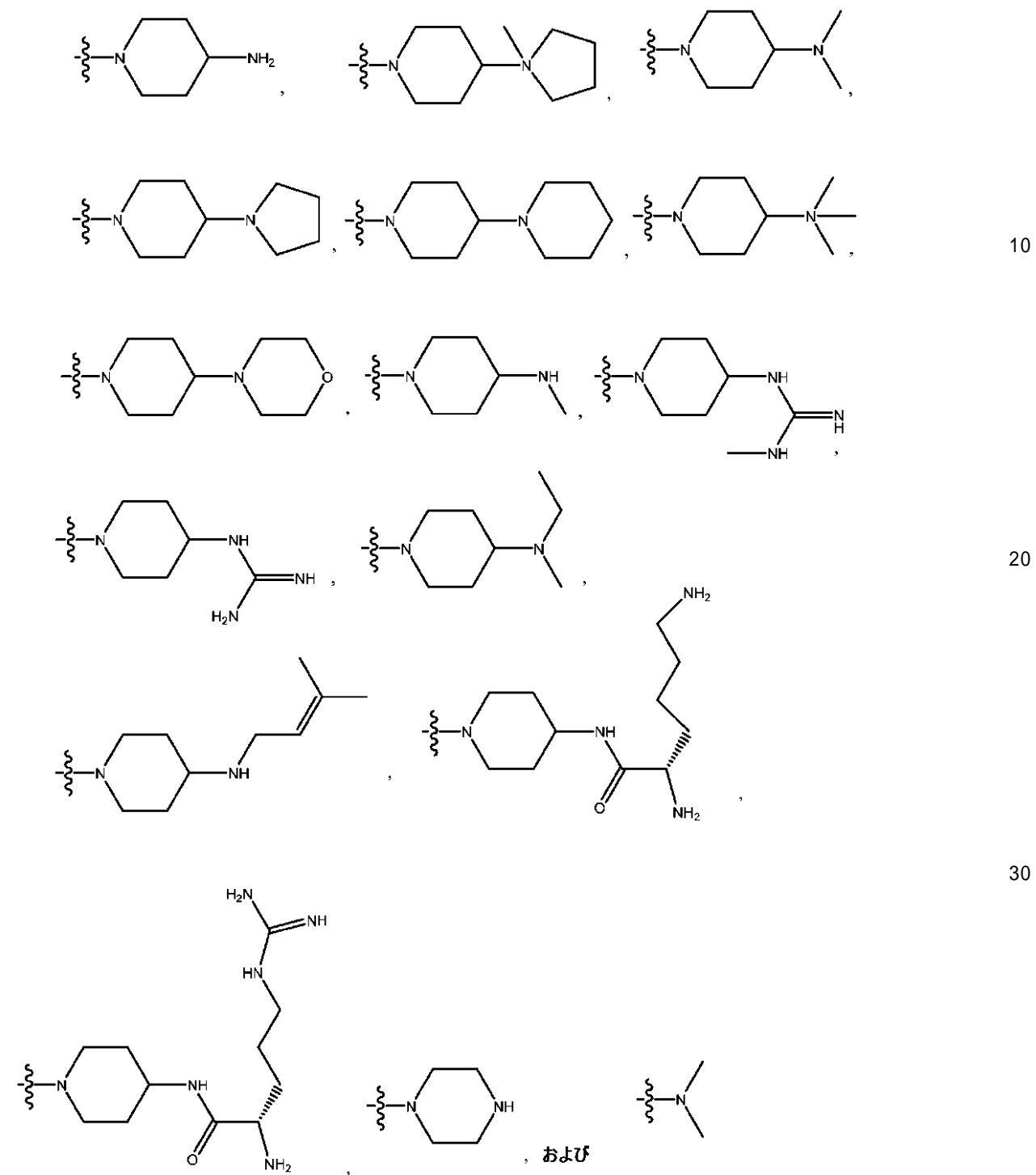
本開示のいくつかの実施形態では、 $R_1$ を、以下からなる群から選択することができる。

10

20

30

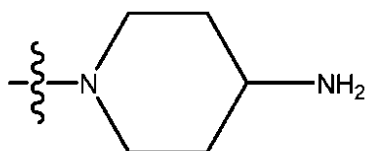
## 【化 1 6】



## 【 0 1 1 1】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのR<sup>1</sup>は以下である。

## 【化 1 7】



## 【 0 1 1 2】

10

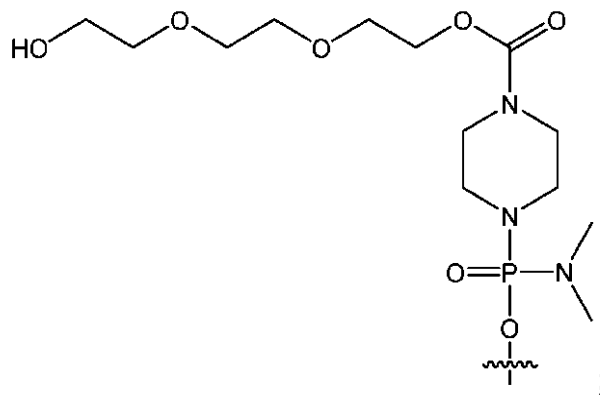
20

30

40

50

一定の実施形態では、 $n$  は 2 であり、 $R^2$  と  $L$  は共に式：  
【化 18】



10

を形成し；

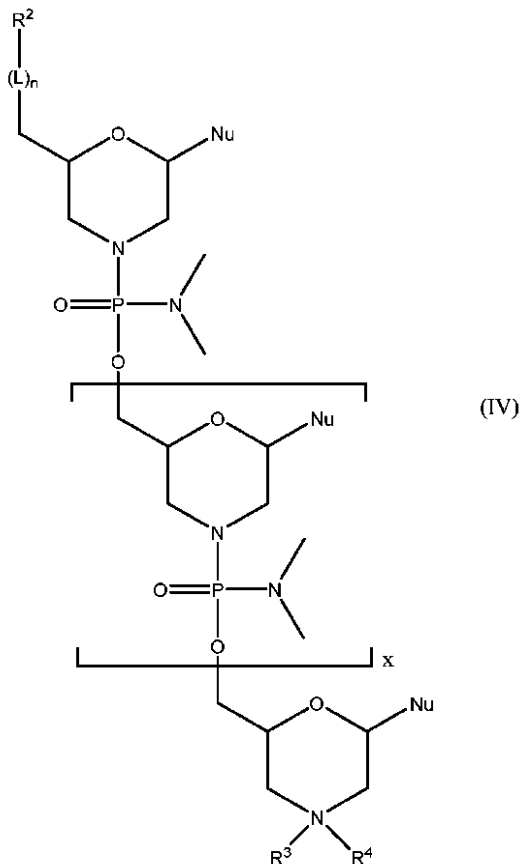
$Y$  は各部位で  $O$  である。

【0113】

他の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、式 (IV)：

【化 19】

20



30

40

(式中、

各  $Nu$  は、共にターゲティング配列を形成する核酸塩基であり；

$x$  は 8 ~ 38 の整数であり；

各  $L$  は、 $-P(O)_2OH-$ 、 $-P(O)_2R^1-$ 、 $-P(O)_2(N(CH_3)_3)-N(CH_3)CH_2C(O)NH_2$ 、ピペラジニル基、カルボニル基、 $H(O(CH_2)_sO)_w-$ 、 $-(OCH_2CH_2O)_w$ 、および  $-(C(O)CHR'NH)_mR''$  からなる群から独立して選択され、 $w$  は 3 ~ 20 から選択される整数であり、 $s$  は 1 ~ 8

50

から選択される整数であり、 $R'$  は、天然に存在するアミノ酸またはその1炭素ホモログもしくは2炭素ホモログの側鎖であり、 $R''$  は水素またはアシルから選択され、 $m$  は1～60の整数であり；

$n$  は0～3の整数であり；

$R^2$  は、水素、OH、ヌクレオチド、 $-(CH_2)_m C(O)NR^f R^g$  からなる群から選択され、 $R^f$  および  $R^g$  は、H、アシル、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、および  $-(C(O)CHR'NH)_m R''$ 、 $-(C(O)CHR'NH)_m R''$ 、 $H(O(CH_2)_s O)_w$ 、 $H(OCH_2CH_2O)_w$ 、トリチル、 $-C(=O)OR^f$ 、およびアシルから独立して選択され、 $R^f$  は、1つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分またはその組み合わせを含む  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、または  $R^2$  は存在せず；

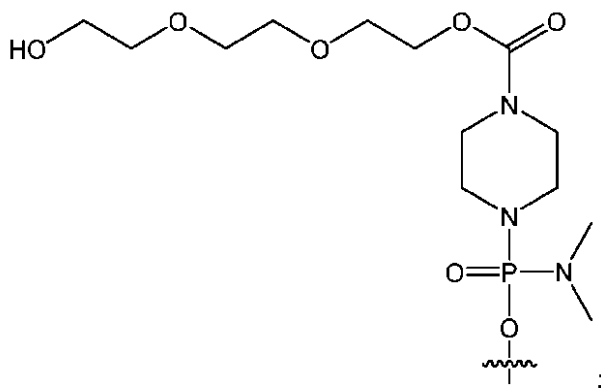
$R^3$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ヌクレオチド、 $-(C(O)CHR'NH)_m R''$ 、 $-C(=NH)NH_2$ 、およびアシルからなる群から選択され；

$R^4$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアシルからなる群から選択され、ここで、ターゲティング配列が、ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNAのイントロン1 (配列番号1)、イントロン2 (配列番号2)、またはエクソン2 (配列番号3) 内の領域に相補的である) の化合物またはその薬学的に許容され得る塩である。

【0114】

いくつかの実施形態では、 $n$  は2であり； $R^2$  と  $L$  は共に式：

【化20】



を形成し；

$R^3$  は水素であり； $R^4$  は電子対である。

【0115】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、式(V)：

10

20

30

10



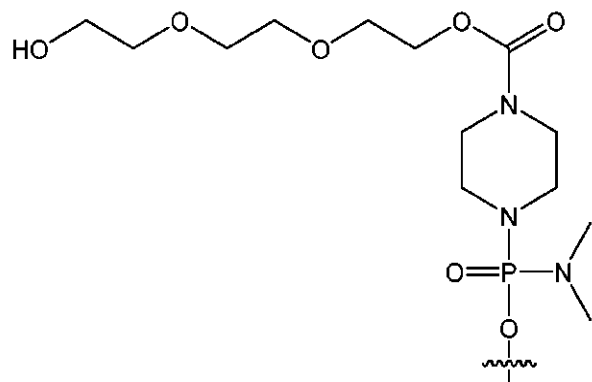
30

40

ここで、ターゲティング配列が、ヒト酸性 - グルコシダーゼ（G A A）遺伝子のプレ-m R N A のイントロン 1（配列番号 1）、イントロン 2（配列番号 2）、またはエクソン 2（配列番号 3）内の領域に相補的である）の化合物またはその薬学的に許容され得る塩である。

いくつかの実施形態では、 $n$  は 2 であり； $R^2$  と  $L$  は共に式：

【化 2 2】



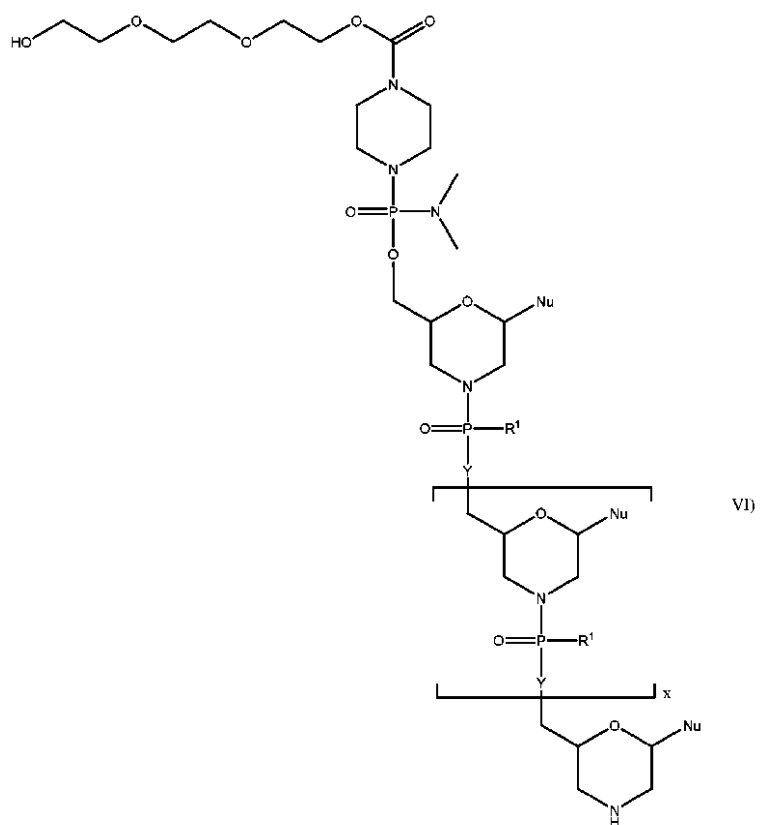
10

を形成する。

【 0 1 1 7】

一定の実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーは、式 ( V I ) :

【化 2 3】



20

30

( 式中、

各 Nu は、共にターゲティング配列を形成する核酸塩基であり；

x は 1 5 ~ 2 5 の整数であり；

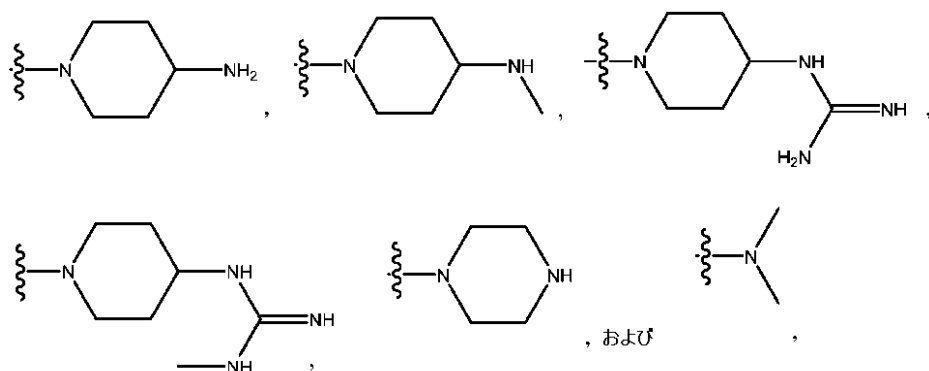
各 Y は O であり；

各 R<sup>1</sup> は、

40



## 【化 2 4】



10

からなる群から独立して選択され：

少なくとも1つの  $R^1$  は  $-N(CH_3)_2$  であり、

ここで、ターゲティング配列は配列番号 4 ~ 120 (ここで、X はウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される) の化合物またはその薬学的に許容され得る塩である。いくつかの実施形態では、各  $R^1$  は  $-N(CH_3)_2$  である。

## 【0118】

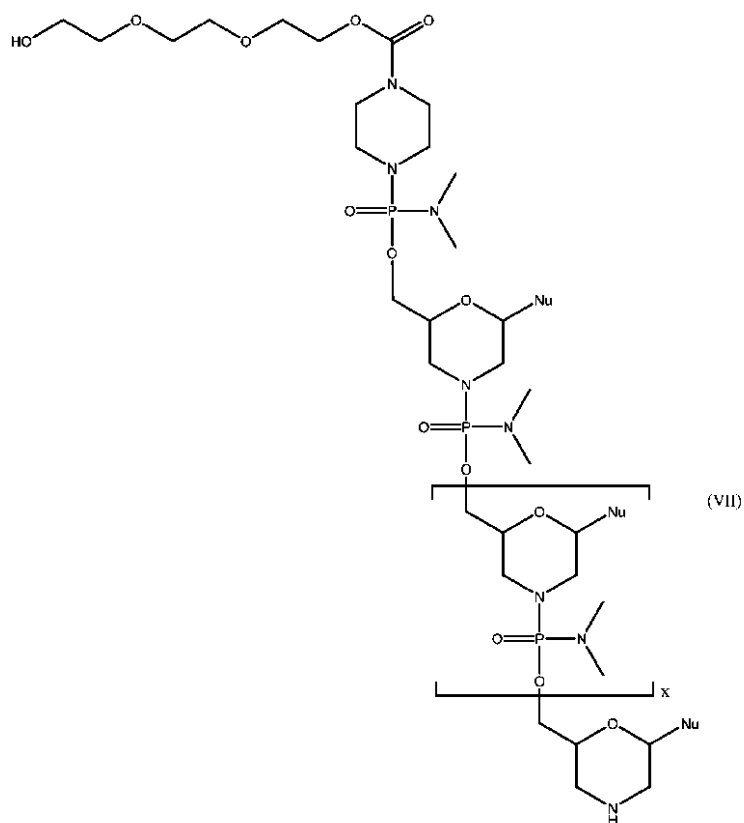
いくつかの実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマー (式 (I)、(IV)、(V)、および (VI) の化合物が含まれる) の各 Nu は、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、シトシン、ヒポキサンチン、2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、C5-プロピニル修飾ピリミジン、および9-(アミノエトキシ)フェノキサジンからなる群から独立して選択される。いくつかの実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマー (式 (I)、(IV)、(V)、および (VI) の化合物が含まれる) のターゲティング配列は、配列番号 4 ~ 120 (ここで、X は、ウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される。

20

## 【0119】

一定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、式 (VII)：

## 【化 25】



(式中、

各Nuは、共にターゲティング配列を形成する核酸塩基であり；

xは8～38の整数であり；

ここで、ターゲティング配列は配列番号4～120（ここで、Xはウラシル（U）またはチミン（T）から選択される）から選択される）の化合物またはその薬学的に許容され得る塩である。

## 【0120】

本開示にしたがって使用することができるさらなるアンチセンスオリゴマー／化学的性質には、以下の特許および特許刊行物（その内容が本明細書中で参考として組み込まれる）に記載のものが含まれる：PCT公開番号WO／2007／002390号；WO／2010／120820号；およびWO／2010／148249号；米国特許第7,838,657号；ならびに米国特許出願公開第2011／0269820号。

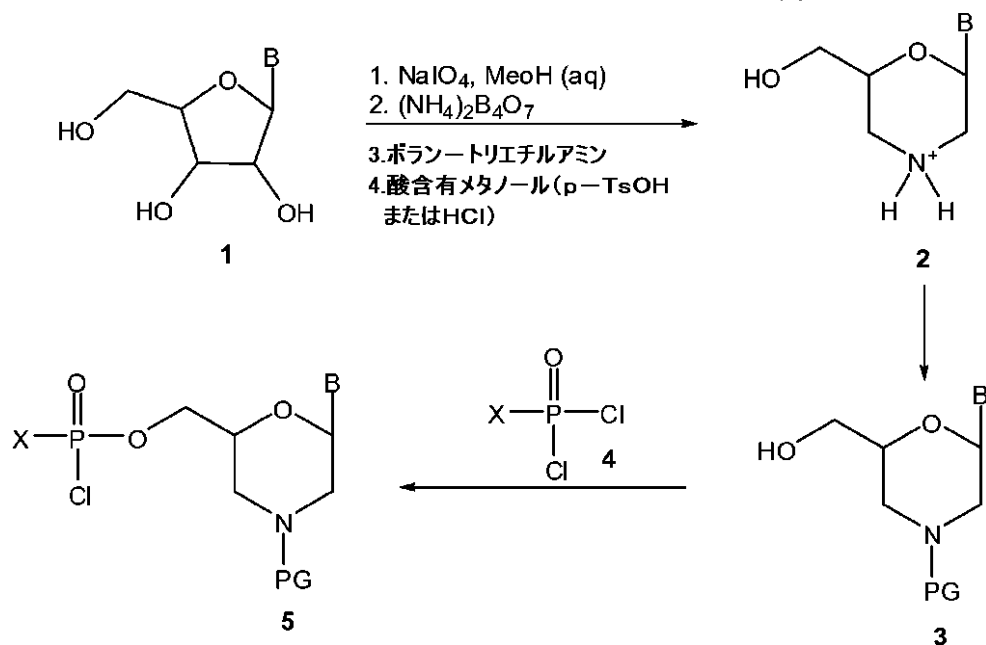
## 【0121】

C．塩基性窒素ヌクレオシド間リンカーを使用したPMO-Xの調製

モルホリノサブユニット、修飾サブユニット間連結、およびこれらを含むオリゴマーを、例えば、米国特許第5,185,444号および同第7,943,762号（その全体が参考として組み込まれる）に記載のように調製することができる。モルホリノサブユニットを、以下の一般的な反応スキームIにしたがって調製することができる。

## 【化 2 6】

## 反応スキーム1. モルホリノサブユニットの調製



## 【0122】

B が塩基対合部分を示し、PG が保護基を示す反応スキーム 1 を参照して、示すようにモルホリノサブユニットを対応するリボヌクレオシド (1) から調製することができる。モルホリノサブユニット (2) を、適切な保護基前駆体 (例えば、トリチルクロリド) との反応によって必要に応じて保護することができる。3' 保護基を、一般に、以下により詳細に記載のように、固体オリゴマー合成中に除去する。塩基対合部分を、固相オリゴマー合成のために適切に保護することができる。適切な保護基には、アデニンおよびシトシンのためのベンゾイル、グアニンのためのフェニルアセチル、ならびにヒポキサンチン (I) のためのピバロイルオキシメチルが含まれる。ピバロイルオキシメチル基を、ヒポキサンチン複素環塩基の N1 位に導入することができる。非保護ヒポキサンチンサブユニットを使用することができるが、塩基を保護した場合の活性化反応における収量ははるかに多い。他の適切な保護基には、同時係属中の米国特許出願第 12/271,040 号 (その全体が本明細書中で参考として組み込まれる) に開示の保護基が含まれる。

## 【0123】

活性化リン化合物 4 との 3 の反応により、所望の連結部分 5 を有するモルホリノサブユニット (subunit) が得られる。構造 4 の化合物を、当業者に公知の多数の方法を使用して調製することができる。例えば、かかる化合物を、対応するアミンおよびオキシ塩化リンの反応によって調製することができる。これに関して、アミン出発物質を、当該分野で公知の任意の方法 (例えば、実施例および米国特許第 7,943,762 号に記載の方法) を使用して調製することができる。

## 【0124】

構造 5 の化合物を、サブユニット間連結を含むオリゴマーの調製のための固相自動化オリゴマー合成で 사용할ことができる。かかる方法は当該分野で周知である。簡潔に述べれば、構造 5 の化合物を、固体支持体に対するリンカーを含むように 5' 末端を修飾することができる。例えば、化合物 5 を、 $\text{L}^{11}$  および  $\text{L}^{15}$  を含むリンカーによって固体支持体に連結することができる。例示的な方法を、図 1 および図 2 に示す。一旦支持されると、保護基 (例えば、トリチル) を除去し、遊離アミンを、構造 5 の第 2 の化合物の活性化リン部分と反応させる。所望の長さのオリゴが得られるまでこの順序を反復する。5' 末端中の保護基を除去するか、5' 修飾が望ましい場合は残すことができる。オリゴを、多数の方法 (例えば、図 3 および図 4 に記載の DTT 処置後の水酸化アンモニウムでの処

置)を使用して固体支持体から除去することができる。

【0125】

修飾したモルホリノサブユニットおよびモルホリノオリゴマーの調製を、実施例により詳細に記載する。多数の修飾連結を含むモルホリノオリゴマーを、本明細書中に記載の方法、当該分野で公知の方法、および/または本明細書中の文献に記載の方法を使用して調製することができる。以前に記載のように調製したモルホリノオリゴマー(例えば、PCT公開WO2008036127号を参照のこと)の包括的修飾も実施例に記載する。

【0126】

用語「保護基」は、化合物のいくつかまたは全ての反応部分をブロックし、保護性基が除去されるまでかかる反応部分が化学反応に参与するのを防止する化学的部分(例えば、T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed. John Wiley & Sons (1999)に列挙および記載の部分)をいう。異なる保護基を使用する場合に各(異なる)保護性基を異なる手段によって除去可能であることが有利であり得る。完全に異なる反応条件下で切断される保護性基により、かかる保護基を差別的に除去可能である。例えば、保護性基を、酸、塩基、および水素化分解によって除去することができる。トリチル、ジメトキシトリチル、アセタール、およびtert-ブチルジメチルシリルなどの基は酸不安定性を示し、これらを使用して、水素化分解によって除去可能なCbz基および塩基不安定性を示すFmoc基で保護されたアミノ基の存在下でカルボキシ反応部分およびヒドロキシ反応部分を保護することができる。カルボン酸部分を塩基不安定性基(メチルまたはエチルなどであるが、これらに限定されない)でブロックすることができ、ヒドロキシ反応部分を、tert-ブチルカルバマートなどの酸不安定性基または酸および塩基の両方に安定性を示すが、加水分解によって除去可能なカルバマートでブロックしたアミンの存在下にて塩基不安定性基(アセチルなど)でブロックすることができる。

【0127】

カルボン酸反応部分およびヒドロキシル反応部分を、加水分解によって除去可能な保護性基(ベンジル基など)でブロックすることもできる一方で、アミン基を塩基不安定性基(Fmocなど)でブロックすることができる。式(I)の化合物の合成に特に有用なアミン保護基は、トリフルオロアセトアミドである。カルボン酸反応部分を、酸化によって除去可能な保護性基(2,4-ジメトキシベンジルなど)でブロックすることができる一方で、共存するアミノ基をフッ化物不安定性シリルカルバマートでブロックすることができる。

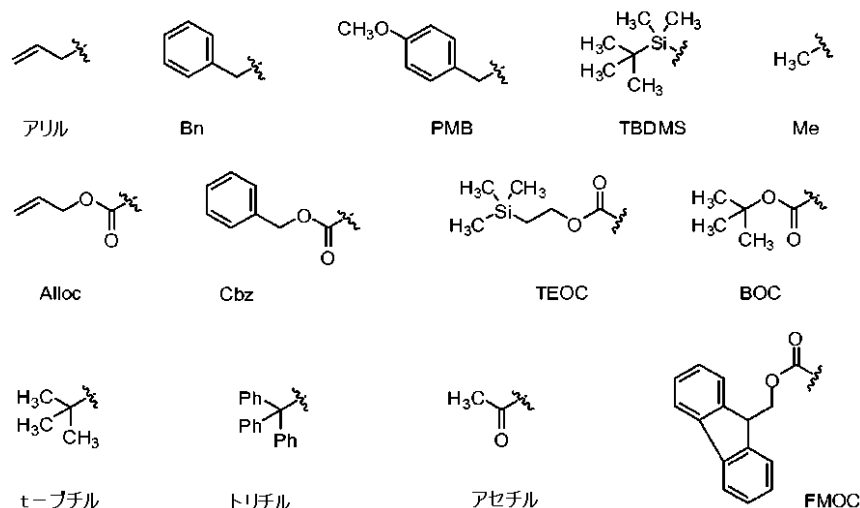
【0128】

アリルブロック基は、酸保護基および塩基保護基の存在下で有用である。なぜなら、前者は安定であり、その後に金属触媒または酸触媒によって除去することができるからである。例えば、アリルブロックしたカルボン酸を、酸不安定性t-ブチルカルバマート保護基または塩基不安定性アセタートアミン保護基の存在下でのパラジウム(0)触媒反応を使用して脱保護することができる。さらに別の形態の保護基は、化合物または中間体を付着することができる樹脂である。残基が樹脂に付着する限り、官能基がブロックされ、反応できない。一旦樹脂から放出されると、官能基を反応に利用可能である。

【0129】

典型的なブロック基/保護基は当該分野で公知であり、以下の部分が含まれるが、これらに限定されない。

## 【化 27】



10

## 【0130】

別途記載がない限り、全ての化学物質を、Sigma - Aldrich - Fluka から入手した。ベンゾイルアデノシン、ベンゾイルシチジン、およびフェニルアセチルグアノシンを、Carbosynth Limited, UK から入手した。

20

## 【0131】

本明細書中に記載のさらなる連結修飾を含む PMO、PMO+、PPMO、および PMO-X の合成を、当該分野で公知であり、且つ継続中の米国特許出願第 12 / 271, 036 号および同第 12 / 271, 040 号ならびに PCT 公開番号 WO / 2009 / 064471 号（その全体が本明細書中で参考として組み込まれる）に記載の方法を使用して行った。

## 【0132】

3' トリチル修飾を有する PMO を、脱トリチル化工程を省略したことを除いて PCT 公開番号 WO / 2009 / 064471 号に本質的に記載のように合成する。

## 【0133】

30

## IV. 処方物

本開示の化合物を、取り込み、分布、および / または吸収を補助するための他の分子、分子構造、または化合物の混合物（例えば、リポソーム、受容体をターゲティングした分子、経口処方物、直腸処方物、局所処方物、または他の処方物など）を使用して混合するか、カプセル化するか、結合体化するか、そうでなければ関連付けることもできる。かかる取り込み、分布、および / または吸収を補助する処方物の調製を教示している代表的な米国特許には、米国特許第 5, 108, 921 号；同第 5, 354, 844 号；同第 5, 416, 016 号；同第 5, 459, 127 号；同第 5, 521, 291 号；同第 5, 543, 158 号；同第 5, 547, 932 号；同第 5, 583, 020 号；同第 5, 591, 721 号；同第 4, 426, 330 号；同第 4, 534, 899 号；同第 5, 013, 556 号；同第 5, 108, 921 号；同第 5, 213, 804 号；同第 5, 227, 170 号；同第 5, 264, 221 号；同第 5, 356, 633 号；同第 5, 395, 619 号；同第 5, 416, 016 号；同第 5, 417, 978 号；同第 5, 462, 854 号；同第 5, 469, 854 号；同第 5, 512, 295 号；同第 5, 527, 528 号；同第 5, 534, 259 号；同第 5, 543, 152 号；同第 5, 556, 948 号；同第 5, 580, 575 号；および同第 5, 595, 756 号（それぞれ本明細書中で参考として組み込まれる）が含まれるが、これらに限定されない。

40

## 【0134】

本開示のアンチセンス化合物は、任意の薬学的に許容され得る塩、エステルもしくはかかるエステルの塩、または動物（ヒトが含まれる）への投与の際に生物学的に活性な代謝

50

産物またはその残渣を（直接または間接的に）提供することができる任意の他の化合物を含む。したがって、例えば、本開示は、本開示の化合物のプロドラッグおよび薬学的に許容され得る塩、かかるプロドラッグの薬学的に許容され得る塩、および他の生物学的等価物も誘導される。

#### 【0135】

用語「プロドラッグ」は、不活性形態で調製され、内因性酵素または他の化学物質の作用および/または条件によって体内またはその細胞内で活性形態（すなわち、薬物）に変換される治療薬を示す。特に、1993年12月9日公開のGosselinらのWO93/24510号またはImbachらのWO94/26764号および米国特許第5,770,713号に開示の方法にしたがって、本開示のオリゴマーのプロドラッグバージョンをSATE〔(S-アセチル-2-チオエチル)ホスファート〕誘導体として調製する。

10

#### 【0136】

用語「薬学的に許容され得る塩」は、開示の化合物の生理学および薬学的に許容され得る塩（すなわち、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、且つ親化合物に望ましくない毒物学的影響を及ぼさない塩）をいう。オリゴマーについて、薬学的に許容され得る塩およびその使用の例は、米国特許第6,287,860号（その全体が本明細書中で組み込まれる）にさらに記載されている。

#### 【0137】

本開示は、本開示のアンチセンス化合物を含む薬学的組成物および処方物も含む。本開示の薬学的組成物を、局所処置または全身処置のいずれが望ましいかに応じて、および処置すべき領域に応じて、多数の方法で投与することができる。投与は、局所投与（眼および粘膜（腔および直腸送達が含まれる）が含まれる）、肺投与（例えば、散剤またはエアロゾルの吸入またはガス注入（ネブライザーが含まれる））；気管内、鼻腔内、上皮、および経皮）、経口投与、または非経口投与であり得る。非経口投与には、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、または筋肉内への注射または注入；または頭蓋内投与（例えば、髄腔内投与または脳室内投与）が含まれる。少なくとも1つの2'-O-メトキシエチル修飾を有するオリゴマーは、経口投与に特に有用であると考えられる。局所投与のための薬学的組成物および薬学的処方物には、経皮貼布、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴薬、坐剤、噴霧剤、液剤、および散剤が含まれ得る。従来の薬学的キャリア、水性、粉末、または油性の基剤、および増粘薬などが必要であり得るか、望ましいかもしれない。コーティングしたコンドームおよびグローブなども有用であり得る。

20

30

#### 【0138】

単位投薬形態で都合よく提供することができる本開示の薬学的処方物を、医薬品産業で周知の従来の技術にしたがって調製することができる。かかる技術は、有効成分を薬学的キャリアまたは賦形剤と組み合わせる工程を含む。一般に、処方物を、有効成分を液体キャリアまたは微粉化固体キャリアまたはその両方と均一且つ十分に組み合わせ、次いで、必要に応じて生成物を成形することによって調製する。

#### 【0139】

本開示の組成物を、多数の可能な投薬形態のうちのいずれか（錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、ソフトゲル、坐剤、および浣腸などであるが、これらに限定されない）に処方することができる。本開示の組成物を、水性、非水性、または混合した媒質の懸濁液として処方することができる。水性懸濁液は、懸濁液の粘度を増大させる物質（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および/またはデキストランが含まれる）をさらに含み得る。懸濁液は安定剤も含むことができる。

40

#### 【0140】

本開示の薬学的組成物には、溶液、乳濁液、フォーム、およびリポソームを含有する処方物が含まれるが、これらに限定されない。本開示の薬学的組成物および薬学的処方物は、1つまたはそれを超える浸透促進剤、キャリア、賦形剤、または他の活性成分もしくは不活性成分を含み得る。

50

## 【 0 1 4 1 】

乳濁液は、典型的には、一方の液体が他方の液体に分散された通常は直径が  $0.1 \mu\text{m}$  を超える液滴の形態の不均質系である。乳濁液は、分散相に加えて、さらなる成分、および水相、油相のいずれかに溶液としてかそれ自体が分離相として存在し得る活性薬物を含み得る。本開示の実施形態としてマイクロエマルジョンが含まれる。乳濁液およびその使用は当該分野で周知であり、米国特許第 6,287,860 号（その全体が本明細書中で組み込まれる）にさらに記載されている。

## 【 0 1 4 2 】

本開示の処方物には、リポソーム処方物が含まれる。本開示で使用する場合、用語「リポソーム」は、球状の二重層に配置された両親媒性の脂質から構成される小胞を意味する。リポソームは、親油性材料から形成された膜および送達すべき組成物を含む水性の内部を有する単層または多重層の小胞である。カチオン性リポソームは、安定な複合体を形成するために負電荷の DNA 分子と相互作用すると考えられる正電荷のリポソームである。pH 感受性であるか負電荷であるリポソームは、DNA との複合体形成よりも DNA を捕捉すると考えられている。カチオン性および非カチオン性のリポソームは、DNA を細胞に送達させるために使用されている。

10

## 【 0 1 4 3 】

リポソームには、「立体的に安定化された」リポソームも含まれる。この用語は、本開示で使用する場合、1 つまたはそれを超える特化した脂質を含み、リポソーム中に組み込まれた場合にかかる特化した脂質を欠くリポソームと比較して循環寿命が延長されるリポソームをいう。立体的に安定化されたリポソームの例は、リポソームの小胞を形成する脂質部分が 1 つまたはそれを超える糖脂質を含むか、1 つまたはそれを超える親水性ポリマー（ポリエチレングリコール（PEG）部分など）で誘導体化されているリポソームである。リポソームおよびその使用は、米国特許第 6,287,860 号（その全体が本明細書中で組み込まれる）にさらに記載されている。

20

## 【 0 1 4 4 】

本開示の薬学的処方物および薬学的組成物は、界面活性剤も含み得る。製剤、処方物、および乳濁液中の界面活性剤の使用は、当該分野で周知である。界面活性剤およびその使用は、米国特許第 6,287,860 号（その全体が本明細書中で組み込まれる）にさらに記載されている。

30

## 【 0 1 4 5 】

いくつかの実施形態では、本開示は、核酸、特にオリゴマーを効率的に送達させるための種々の浸透促進剤を使用する。細胞膜を通過する非親油性薬の拡散に加えて、浸透促進剤は、親油性薬物の透過性も増強する。浸透促進剤を、5 つの広いカテゴリー（すなわち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、および非キレート化非界面活性剤）のうちの 1 つに属するように分類することができる。浸透促進剤およびその使用は、米国特許第 6,287,860 号（その全体が本明細書中で組み込まれる）にさらに記載されている。

## 【 0 1 4 6 】

当業者は、処方物がその意図する使用（すなわち、投与経路）にしたがって日常的にデザインされると認識するであろう。

40

## 【 0 1 4 7 】

局所投与用処方物には、本開示のオリゴマーが脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤、および界面活性剤などの局所送達剤との混合物である処方物が含まれる。脂質およびリポソームには、中性（例えば、ジオレオイルホスファチジル D O P E エタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリン D M P C、ジステアロイルホスファチジルコリン）、負電荷（例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロール D M P G）、およびカチオン性（例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピル D O T A P およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン D O T M A）のものが含まれる。

50

## 【0148】

局所投与または他の投与のために、本開示のオリゴマーを、リポソーム内にカプセル化することができるか、特にカチオン性リポソームと複合体を形成することができる。あるいは、オリゴマーを、脂質、特にカチオン性脂質と複合体化することができる。脂肪酸およびエステル、その薬学的に許容され得る塩、ならびにその使用は、米国特許第6,287,860号(その全体が本明細書中で組み込まれる)にさらに記載されている。局所用処方物は、1999年5月20日出願の米国特許出願第09/315,298号(その全体が本明細書中で参考として組み込まれる)に詳述されている。

## 【0149】

経口投与用の組成物および処方物には、散剤または顆粒剤、微粒子、ナノ粒子、水または非水性媒質の懸濁液または溶液、カプセル、ゲルカプセル、サシェ、錠剤、またはミニタブレットが含まれる。増粘薬、香味物質、希釈剤、乳化剤、分散助剤、または結合剤が望ましいかもしれない。経口処方物は、本開示のオリゴマーが1つまたはそれを超える浸透促進剤、界面活性剤、およびキレート剤と併せて投与される処方物である。界面活性剤には、脂肪酸および/またはそのエステルまたは塩、胆汁酸および/またはその塩が含まれる。胆汁酸/塩および脂肪酸およびその使用は、米国特許第6,287,860号(その全体が本明細書中で組み込まれる)にさらに記載されている。いくつかの実施形態では、本開示は、浸透促進剤の組み合わせ(例えば、胆汁酸/塩と組み合わせた脂肪酸/塩)を提供する。例示的な組み合わせは、ラウリン酸、カプリン酸、およびUDCAのナトリウム塩である。さらなる浸透促進剤には、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-20-セチルエーテルが含まれる。本開示のオリゴマーを、噴霧乾燥させた粒子を含む顆粒形態で経口送達させることができるか、微粒子またはナノ粒子を形成するために複合体化することができる。オリゴマー複合体化剤およびその使用は、米国特許第6,287,860号(その全体が本明細書中で組み込まれる)にさらに記載されている。オリゴマー用経口処方物およびその調製は、米国特許出願第09/108,673号(1998年7月1日出願)、同第09/315,298号(1999年5月20日出願)、および同第10/071,822号(2002年2月8日出願)(それぞれその全体が本明細書中で参考として組み込まれる)に詳述されている。

## 【0150】

非経口投与、髄腔内投与、または脳室内投与のための組成物および処方物は、緩衝液、希釈剤、および他の適切な添加物(浸透促進剤、キャリア化合物、および他の薬学的に許容され得るキャリアまたは賦形剤などであるが、これらに限定されない)も含み得る滅菌水溶液を含み得る。

## 【0151】

本開示の一定の実施形態は、1つまたはそれを超えるオリゴマー化合物および1つまたはそれを超える非アンチセンス機構によって機能する他の化学療法薬を含む薬学的組成物を提供する。かかる化学療法薬の例には、癌化学療法薬(ダウノルビン、ダウノマイシン、ダクチノマイシン、ドキソルビン、エピルビン、イダルビン、エソルビン、ブレオマイシン、マホスファミド、イフォスファミド、シトシンアラビノシド、bis-クロロエチルニトロソ尿素(bis-chloroethyl nitrosurea)、ブスルファン、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、ミトラマイシン、プレドニゾン、ヒドロキシprogesterone、テストステロン、タモキシフェン、ダカルバジン、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ペンタメチルメラミン、ミトキサントロン、アムサクリン、クロラムブシル、メチルシクロヘキシルニトロソ尿素(methyl cyclohexyl nitrosurea)、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-アザシチジン、ヒドロキシ尿素、デオキシコホルマイシン、4-ヒドロキシベルオキシシクロホスホラミド、5-フルオロウラシル(5-FU)、5-フルオロデオキシウリジン(5-FdR)、メトトレキサート(MTX)、コルヒチン、タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトボシド(VP-16)、トリメトトレキサート、イリノテカン、トポテカン



、ゲムシタピン、テニポシド、シスプラチン、およびジエチルスチルベストロール（DES）など）が含まれるが、これらに限定されない。本開示の化合物と共に使用する場合、かかる化学療法薬を、個別に（例えば、5-FUおよびオリゴマー）、連続的に（例えば、5-FUおよびオリゴマーを使用後に一定期間を経てMTXおよびオリゴマーを使用）、または1つまたはそれを超える他のかかる化学療法薬の組み合わせで（例えば、5-FU、MTX、およびオリゴマーの組み合わせ、または5-FU、照射療法、およびオリゴマーの組み合わせ）使用することができる。抗炎症薬（非ステロイド性抗炎症薬およびコルチコステロイドが含まれるが、これらに限定されない）および抗ウイルス薬（リバビリン（*ribavirin*）、ピダラビン、アシクロビル、およびガンシクロビルが含まれるが、これらに限定されない）を、本開示の組成物中で組み合わせることもできる。アンチセンス化合物と他の非アンチセンス薬との組み合わせも本開示の範囲内である。2つまたはそれを超える組み合わせ化合物を、同時または連続的に使用することができる。

10

#### 【0152】

別の関連する実施形態では、本開示の組成物は、第1の核酸をターゲティングする1つまたはそれを超えるアンチセンス化合物（特にオリゴマー）および第2の核酸標的をターゲティングする1つまたはそれを超えるさらなるアンチセンス化合物を含み得る。あるいは、本開示の組成物は、同一の核酸標的の異なる領域をターゲティングする2つまたはそれを超えるアンチセンス化合物を含み得る。アンチセンス化合物の多数の例は当該分野で公知である。2つまたはそれを超える組み合わせ化合物を同時または連続的に使用することができる。

20

#### 【0153】

#### V．使用方法

一定の実施形態は、本開示のアンチセンスオリゴマーを治療目的（例えば、GSD-II被験体の処置）で使用したエクソン2含有GAAMRNAおよび/またはタンパク質の発現を増加する方法に関する。したがって、いくつかの実施形態では、本開示は、有効量の本開示のアンチセンスオリゴマーを被験体に投与する工程を含む、GSD-IIに罹患しているか発症するリスクのある個体を処置する方法を提供する。いくつかの実施形態では、酸性-グルコシダーゼ（GAA）遺伝子のプレ-mRNA内の領域に特異的にハイブリッド形成するのに十分な長さおよび相補性のヌクレオチド配列を含むアンチセンスオリゴマーであって、前記領域へのアンチセンスオリゴマーの結合により被験体の細胞および/または組織中のエクソン2含有GAAMRNAレベルが増加する、アンチセンスオリゴマー。例示的なアンチセンスターゲティング配列を表2に示す。

30

#### 【0154】

酸性-グルコシダーゼ（GAA）遺伝子のプレ-mRNA内の領域に特異的にハイブリッド形成するのに十分な長さおよび相補性のヌクレオチド配列を含むII型糖原貯蔵障害（GSD-II；ポンベ病）処置のための医薬の調製で用いるアンチセンスオリゴマーであって、前記領域へのアンチセンスオリゴマーの結合によりエクソン2含有GAAMRNAレベルが増加する、アンチセンスオリゴマーも含まれる。

#### 【0155】

GSD-IIを処置する方法またはGSD-IIの処置のための医薬のいくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマー化合物は、以下を含む：

40

ホスホルアミダートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー（PMO）、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、ホスホロチオアートオリゴマー、トリシクロ-DNAオリゴマー、トリシクロ-ホスホロチオアートオリゴマー、2'-O-Me修飾オリゴマー、または前記の任意の組み合わせから選択される非天然化学骨格；および

ヒト酸性-グルコシダーゼ（GAA）遺伝子のプレ-mRNAのイントロン1（配列番号1）、イントロン2（配列番号2）、またはエクソン2（配列番号3）内の領域に相補的なターゲティング配列。

#### 【0156】

50

上述のとおり、「GSD-II」は、II型糖原貯蔵障害（GSD-IIまたはポンペ病）（罹患個体におけるGAAタンパク質の過小発現によってしばしば特徴づけられるヒト常染色体劣性疾患）をいう。乳児GSD-IIを有する被験体およびこの疾患の遅発型を有する被験体が含まれる。

#### 【0157】

一定の実施形態では、被験体は、（例えば、健康な被験体またはより早期と比較して）1つまたはそれを超える組織（心臓、骨格筋、肝臓、および神経系組織が含まれる）におけるGAAタンパク質の発現および/または活性が減少している。いくつかの実施形態では、被験体は、（例えば、健康な被験体またはより早期と比較して）1つまたはそれを超える組織（心臓、骨格筋、肝臓、および神経系組織が含まれる）中のグリコーゲン蓄積量が増大している。特定の実施形態では、被験体は、おそらく機能的GAAタンパク質の発現を減少させる他の変異と組み合わせた少なくとも1つのIVS1-13T>G変異（c.336-13T>Gとも呼ばれる）を有する。GSD-IIで使用した分子遺伝子試験のまとめを以下の表3に示す。

【表3-1】

表3				
遺伝子 記号	試験方法	検出された変異	試験方法による 変異検出頻度	利用可能な 試験
GAA	配列分析	p.Arg854*	約50%~60%	臨床
		p.Asp645Glu	約40%~80%	
		IVS1-13T>G	約50%~85%	

【表3-2】

		遺伝子中の他の配列バリエーション	83%~93%	
	選択エクソンの配列分析	選択エクソン中の配列バリエーション	83%~93%	
	ターゲティングされた 変異の分析	ターゲティングされた部位中 の配列バリエーション	ターゲティングされた変異間の バリエーションについて100%	
	欠失/重複分析	エクソンおよび全遺伝子 の欠失/重複	5%~13%	

#### 【0158】

一定の実施形態は、本明細書中に記載のように、細胞、組織、および/または被験体中のエクソン2含有GAA mRNAまたはタンパク質の発現を増加させる方法に関する。いくつかの例では、エクソン-2含有GAA mRNAまたはタンパク質は、コントロール（例えば、コントロール細胞/被験体、アンチセンスオリゴマーを持たないコントロール組成物、非処置、および/またはより早い時点）と比較して約または少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%増加する。健康なコントロールのレベルと比較して含有するGAA mRNAまたはタンパク質の発現を維持する方法も含まれる。

#### 【0159】

いくつかの実施形態は、本明細書中に記載のように、細胞、組織、および/または被験体中の機能的/活性GAAタンパク質の発現を増加させる方法に関する。一定の例では、機能的/活性GAAタンパク質レベルは、コントロール（例えば、コントロール細胞/被験体、アンチセンスオリゴマーを持たないコントロール組成物、非処置、および/またはより早い時点）と比較して約または少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%

、75%、80%、85%、90%、95%、または100%増加する。健康なコントロールのレベルと比較して機能的/活性GAAタンパク質の発現を維持する方法も含まれる。

【0160】

特定の実施形態は、本明細書中に記載のように、1つまたはそれを超える細胞、組織、および/または被験体におけるグリコーゲンの蓄積を減少させる方法に関する。一定の例では、グリコーゲンの蓄積は、コントロール（例えば、コントロール細胞/被験体、アンチセンスオリゴマーを持たないコントロール組成物、非処置、および/またはより早い時点）と比較して約または少なくとも約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%低下する。細胞、組織、および/または被験体中の正常またはそうでなければ健康なグリコーゲンレベル（例えば、無症状レベルまたはGSD-Iの症状の軽減に関連するレベル）を維持する方法も含まれる。

10

【0161】

1つまたはそれを超えるGSD-Iの症状を軽減する必要がある被験体における1つまたはそれを超えるGSD-Iの症状を軽減する方法も含まれる。特定の例には、乳児GSD-Iの症状（心臓肥大、緊張低下、筋症、左心室流出障害、呼吸窮迫、運動遅滞/筋力低下、および摂食困難/発育不全など）が含まれる。さらなる例には、遅発性GSD-Iの症状（筋力低下（例えば、骨格筋の筋力低下（進行性筋力低下が含まれる））、障害性の咳、再発性胸部感染症、緊張低下、運動発達遅延、嚥下困難または咀嚼困難、および肺活量の低下または呼吸機能不全など）が含まれる。

20

【0162】

本開示のアンチセンスオリゴマーを、GSD-Iを（予防的または治療的に）処置するために被験体に投与することができる。かかる処置と併せて、薬理ゲノミクス（すなわち、個体の遺伝子型と個体の外来の化合物または薬物に対する応答との間の関係の研究）を考慮することができる。治療薬の代謝困難は、薬理学的に活性な薬物の用量と血中濃度との間の関係の変化によって重篤な毒性または治療の失敗を招き得る。

【0163】

したがって、医師または臨床家は、治療薬投与の決定ならびに治療薬の投薬量および/または治療薬を用いた処置の治療レジメンの調整において関連する薬理ゲノミクス研究で得た知識の適用を考慮することができる。

30

【0164】

アンチセンスオリゴマーの標的核酸への有効な送達は、処置の1つの態様である。アンチセンスオリゴマーの送達経路には、種々の全身経路（経口経路および非経口経路（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、および筋肉内）が含まれる）ならびに吸入送達、経皮送達、および局所送達が含まれるが、これらに限定されない。当業者は、適切な経路を、処置下の被験体の条件に適切のように決定することができる。血管または血管外の循環、血液またはリンパ系、および脳脊髄液は、RNAを導入することができるいくつかの非限定的な部位である。直接CNS送達を使用することができる。例えば、脳室内投与または髄腔内投与を投与経路として使用することができる。

40

【0165】

特定の実施形態では、アンチセンスオリゴマーを、筋肉内注射（IM）（すなわち、アンチセンスオリゴマーを筋肉内に投与するか送達させる）によって被験体に投与する。筋肉内注射部位の非限定的な例には、上腕三角筋、脚の外側広筋、腹部臀筋、および背側臀筋が含まれる。特定の実施形態では、PMO、PMO-X、またはPPMOをIMによって投与する。

【0166】

一定の実施形態では、中枢神経系組織中のグリコーゲン蓄積のような、必要とする被験体である。例には、中枢神経系の病態がGSD-Iの呼吸欠損に寄与する例が含まれる

50

(例えば、DeRuisseaur, PNAS USA, 106:9419-24, 2009を参照のこと)。したがって、例えば、被験体がCNSに關与するGSD-I Iを有する場合に、本明細書中に記載のアンチセンスオリゴマーを、任意の当該分野で認識されている方法によって被験体の神経系に送達させることができる。例えば、本開示のアンチセンスオリゴマーの末梢血注射を使用して、前記試薬を拡散および/または能動手段によって末梢神経に送達させることができる。あるいは、アンチセンスオリゴマーを、血液脳関門(BBB)の通過を促進するように修飾して中枢神経系(CNS)の神経細胞に前記試薬を送達させることができる。最近、アンチセンスオリゴマーテクノロジーおよび送達ストラテジーが具体的に進歩し、神経障害におけるアンチセンスオリゴマーの利用範囲が広がっている(例えば、Forte, A., 2005, Curr. Drug Targets 6:21-29; Jaeger, L.B., and W.A. Banks, 2005, Methods Mol. Med. 106:237-251; Vinogradov, S.V., 2004, Bioconjug. Chem. 5:50-60を参照のこと; 上記はその全体が本明細書中で参考として組み込まれる)。例えば、本開示のアンチセンスオリゴマーを、ペプチド核酸(PNA)化合物として生成することができる。PNA試薬は、それぞれBBBを通過することが同定されている(Jaeger, L.B., and W.A. Banks, 2005, Methods Mol. Med. 106:237-251)。例えば、血管作用薬での被験体の処置は、BBBを通過する輸送を促進することも記載されている(Id)。BBBを通過して能動輸送される薬剤への本開示のアンチセンスオリゴマーの係留を、送達機構として使用することもできる。PCT公開番号WO/2013/086207号(その全体が参考として組み込まれる)に記載のように、イオヘキソールなどの造影剤を伴うアンチセンス剤の投与(例えば、個別、同時、同一処方物中)もまたBBBを通過する送達を容易にすることができる。

#### 【0167】

一定の実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴマーを、経皮的方法(例えば、例えば、乳濁液中へのアンチセンスオリゴマーの組み込み(かかるアンチセンスオリゴマーは必要に応じてリポソーム中にパッケージングされている)による)によって送達させることができる。かかる経皮および乳濁液/リポソーム媒介送達方法は、当該分野でアンチセンスオリゴマーの送達について、例えば、米国特許第6,965,025号(その内容全体が本明細書中で参考として組み込まれる)に記載されている。

#### 【0168】

本明細書中に記載のアンチセンスオリゴマーを、植込み型デバイスを介して送達させることもできる。かかるデバイスのデザインは、例えば、米国特許第6,969,400号(その内容全体が本明細書中で参考として組み込まれる)に記載の合成埋没物のデザインを使用する当該分野で認識されたプロセスである。

#### 【0169】

アンチセンスオリゴマーを、当該分野で認識されている技術(例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、融合、リポソーム、コロイド状ポリマー粒子、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクター、ならびに当該分野で公知の他の手段)を使用して細胞に導入することができる。選択された送達方法は、少なくともオリゴマーの化学的性質、処置される細胞、および細胞の位置に依存し、この送達方法は当業者に明らかであろう。例えば、リポソームを指示するための特異的マーカーを表面上に有するリポソーム、標的細胞を含む組織への直接注射、または特異的受容体媒介取り込みなどによって局在化することができる。

#### 【0170】

当該分野で公知のように、アンチセンスオリゴマーを、例えば、リポソーム媒介取り込み、脂質結合体化、ポリリジン媒介取り込み、ナノ粒子媒介取り込み、および受容体媒介エンドサイトーシス、ならびにさらなる非エンドサイトーシスの送達様式(微量注入、透過処理(例えば、ストレプトトリシン-O透過処理、アニオン性ペプチド透過処理)、エレクトロポレーションなど)、ならびに当該分野で公知の種々の非侵襲性非エンドサイトー

シス送達方法 ( Dokka and Rojanasakul, Advanced Drug Delivery Reviews 44, 35 - 49 (その全体が参考として組み込まれる) を参照のこと) を含む方法を使用して送達させることができる。

【0171】

アンチセンスオリゴマーを、生理学的におよび/または薬学的に許容され得る任意の都合の良いビヒクルまたはキャリア中に含めて投与することができる。かかる組成物は、当業者によって使用される種々の標準的な薬学的に許容され得るキャリアのうちのいずれかを含み得る。例には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、水、エタノール水溶液、乳濁液 (油/水乳濁液またはトリグリセリド乳濁液など)、錠剤、およびカプセルが含まれるが、これらに限定されない。適切な生理学的に許容され得るキャリアの選択は、選択した投与様式に応じて変化するであろう。「薬学的に許容され得るキャリア」は、薬学的投与に適合する任意および全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌薬および抗真菌薬、等張剤、および吸収遅延剤などを含むことが意図される。薬学的に活性な物質のためのかかる媒質および薬剤の使用は当該分野で周知である。任意の従来の媒質または薬剤が活性化化合物と適合しない場合を除いて、組成物中でのその使用が意図される。補足的な活性化化合物を、組成物中に組み込むこともできる。

10

【0172】

本開示の化合物 (例えば、アンチセンスオリゴマー) を、一般に、遊離酸または遊離塩基として利用することができる。あるいは、本開示の化合物を、酸付加塩または塩基付加塩の形態で使用する事ができる。本開示の遊離アミノ化合物の酸付加塩を、当該分野で周知の方法によって調製することができ、この酸付加塩を、有機酸および無機酸から形成することができる。適切な有機酸には、マレイン酸、フマル酸、安息香酸、アスコルビン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、シュウ酸、プロピオン酸、酒石酸、サリチル酸、クエン酸、グルコン酸、乳酸、マンデル酸、桂皮酸、アスパラギン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、グリコール酸、グルタミン酸、およびベンゼンスルホン酸が含まれる。

20

【0173】

適切な無機酸には、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、および硝酸が含まれる。塩基付加塩には、カルボン酸アニオンを使用して形成される塩が含まれ、有機カチオンおよび無機カチオン (アルカリ金属およびアルカリ土類金属 (例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、バリウム、およびカルシウム)、ならびにアンモニウムイオンおよびその置換誘導体 (例えば、ジベンジルアンモニウム、ベンジルアンモニウム、および2-ヒドロキシエチルアンモニウムなど) から選択されるカチオンなど) を使用して形成された塩が含まれる。したがって、用語「薬学的に許容され得る塩」は、任意および全ての許容され得る塩形態を含むことが意図される。

30

【0174】

さらに、プロドラッグも本開示の文脈の範囲内に含まれる。プロドラッグは、かかるプロドラッグが患者に投与された場合に化合物が *in vivo* で放出される任意の共有結合したキャリアである。プロドラッグを、一般に、日常的な操作または *in vivo* のいずれかで修飾が切断されて親化合物が得られるような方法での官能基の修飾によって調製する。プロドラッグには、例えば、ヒドロキシ基、アミン基、またはスルフヒドリル基が任意の基に結合し、患者に投与した場合に結合が切断されてヒドロキシ基、アミン基、またはスルフヒドリル基を形成する本開示の化合物が含まれる。したがって、プロドラッグの代表例には、本開示のアンチセンスオリゴマーのアルコール官能基およびアミン官能基の酢酸誘導体、ギ酸誘導体、および安息香酸誘導体が含まれる (しかし、これらに限定されない)。さらに、カルボン酸 ( $-COOH$ ) の場合、メチルエステルおよびエチルエステルなどのエステルを使用することができる。

40

【0175】

いくつかの例では、リポソームを使用して、細胞中へのアンチセンスオリゴマーの取り込みを容易にすることができる (例えば、Williams, S. A., Leukemi

50

a 10(12):1980-1989, 1996; Lappalainen, Antiviral Res. 23:119, 1994; Uhlmann, antisense oligomer: a new therapeutic principle, Chemical Reviews, Volume 90, No. 4, 25 pages 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Chapter 14, Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine, pp. 287-341, Academic Press, 1979を参照のこと)。例えば、WO93/01286号に記載のように、ヒドロゲルを、アンチセンスオリゴマー投与のためのビヒクルとして使用することもできる。あるいは、オリゴマーを、ミクロスフィアまたは微粒子に含めて投与することができる（例えば、Wu, G. Y. and Wu, C. H., J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 30 1987を参照のこと）。あるいは、米国特許第6,245,747号に記載のように、アンチセンスオリゴマーと複合体化したガス充填微小気泡の使用により、標的組織への送達を増強することができる。徐放組成物も使用することができる。これらは、フィルムまたはマイクロカプセルなどの成形品の形態の半透性ポリマーマトリックスを含み得る。

#### 【0176】

1つの実施形態では、アンチセンスオリゴマーを適切な薬学的キャリアに含めてリソソーム貯蔵障害の症状を示す哺乳動物被験体（例えば、ヒトまたは家畜）に投与する。方法の1つの態様では、被験体は、ヒト被験体（例えば、GSD-II（ポンペ病）と診断された患者）である。1つの好ましい実施形態では、アンチセンスオリゴマーは薬学的に許容され得るキャリア中に含まれ、これを経口送達する。別の好ましい実施形態では、オリゴマーは薬学的に許容され得るキャリア中に含まれ、これを静脈内（i.v.）送達する。

#### 【0177】

1つの実施形態では、アンチセンス化合物を、アンチセンスオリゴマーの血中最高濃度が少なくとも200~400nMとなるのに有効な量および様式で投与する。典型的には、単回または複数回分のアンチセンスオリゴマーを、一般に一定間隔で約1~2週間投与する。経口投与に好ましい用量は、70kgあたり約1~1000mgのオリゴマーである。いくつかの場合、1000mgオリゴマー/患者を超える用量が必要であり得る。i.v.投与について、好ましい用量は、約0.5mg~1000mgオリゴマー/70kgである。アンチセンスオリゴマーを、一定間隔で短期間（例えば、2週間またはそれ未満にわたって毎日）投与することができる。しかし、いくつかの場合、オリゴマーを、より長い期間にわたって断続的に投与する。抗生物質の投与後または同時に投与または他の治療上の処置を行うことができる。処置下での被験体の免疫アッセイ、他の生化学試験、および生理学的試験の結果に基づいて、処置レジメンを示すように調整することができる（用量、頻度、経路など）。

#### 【0178】

本開示のアンチセンスオリゴマーを使用した有効なin vivo処置レジメンは、持続期間、用量、頻度、および投与経路、ならびに処置下（すなわち、局所性感染または全身性感染に応答する投与に対する予防的投与）の被験体の健康状態に応じて変動し得る。したがって、かかるin vivo治療は、最適な治療結果を達成するために、処置下の特定の障害型に適切な試験によるモニタリングおよび対応する用量または処置レジメンの調整がしばしば必要であろう。

#### 【0179】

処置を、例えば、当該分野で公知の疾患の一般的指標によってモニタリングすることができる。in vivo投与した本開示のアンチセンスオリゴマーの有効性を、アンチセンスオリゴマーの投与前、投与中、および投与後に被験体から採取した生物サンプル（組織、血液、尿など）から決定することができる。かかるサンプルのアッセイは、（1）当業者に公知の手順（例えば、電気泳動ゲル移動アッセイ）を使用した標的配列および非標

的配列とのヘテロ二重鎖形成の有無のモニタリング；(2)標準的な技術(RT-PCR、ノーザンブロットング、ELISA、またはウェスタンブロットングなど)によって決定した場合の基準の正常なmRNAまたはタンパク質と比較した変異mRNA量のモニタリングを含む。

#### 【0180】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、哺乳動物細胞によって能動的に取り込まれる。さらなる実施形態では、アンチセンスオリゴマーを、本明細書中に記載のように輸送部分(例えば、輸送ペプチドまたはCPP)に結合体化してかかる取り込みを容易にすることができる。

#### 【0181】

##### VI. 投薬

治療組成物の処方およびその後のその投与(投薬)は、当業者の技術の範囲内と考えられる。投薬は処置すべき病状の重症度および応答性に依存し、一連の処置を数日間から数ヶ月、または治療するか病状が軽減するまで継続する。最適な投与計画を、患者の体内の薬物蓄積の測定値から計算することができる。当業者は、至適投薬量、投薬法、および反復率を容易に決定することができる。至適投薬量は、各オリゴマーの相対的効力に応じて変動し得、一般に、*in vitro*動物モデルおよび*in vivo*動物モデルで有効であることが見出されたEC50に基づいて評価することができる。一般に、投薬量は、 $0.01 \mu\text{g} \sim 100 \text{g/kg}$ 体重であり、1日、1週間、1ヶ月、または1年に1回または複数回、またはさらに2~20年毎に1回投与することができる。当業者は、体液または組織中の薬物の滞留時間および濃度の測定値に基づいて反復投薬率を容易に評価することができる。首尾の良い処置後、病状の再発を防止するために患者に維持療法を受けさせることが望ましいかもしれない。ここで、維持療法とは、維持量( $0.01 \mu\text{g} \sim 100 \text{g/kg}$ 体重の範囲)のオリゴマーを1日1回または複数回から20年毎に1回まで投与することである。

#### 【0182】

本開示を一定のその実施形態に従って詳細に記載している一方で、以下の実施例は本開示を例示することのみを目的とし、本開示を制限することを意図しない。本出願で引用した各々の文献、特許、特許出願、およびGenBank受入番号などは、その全体が本明細書中で参考として組み込まれる。

#### 【実施例】

#### 【0183】

##### VII. 実施例

##### 実施例1

##### アンチセンスターゲティング配列のデザイン

アンチセンスオリゴマーターゲティング配列を、ヒトGAA遺伝子中のIVS1-13T>G変異に関連するスプライススイッチング治療に適用するためにデザインした。ここでは、スプライススイッチングオリゴマーがイントロンプライスサイレンサーエレメントおよびエクソンスプライスサイレンサーエレメント(それぞれ、ISSエレメントおよびESSエレメント)を抑制し、それにより、成熟GAAmRNA中のエクソン2保持を促進することが期待される。次いで、正常なまたはほぼ正常なGAA発現への回復により、機能的酵素が合成され、それにより、GSD-III患者に臨床的利点が付与されるであろう。

#### 【0184】

したがって、一定のアンチセンスターゲティング配列を、GAA遺伝子のエクソン2内またはその隣接イントロン内のいずれかでスプライスサイレンサーエレメントをマスキングするようにデザインした。潜在的なサイレンサーエレメント標的の非限定的な例には、hnRNPA1モチーフ(TAGGA)、Tra2-モチーフ、および9G8モチーフが含まれる。イントロン1および2(それぞれ、IVS1およびIVS2)mRNAの*in silico*二次構造解析(mFold)も使用して、適切なアンチセンス標的配

10

20

30

40

50

列を得ることができる長距離相互作用を同定した。この解析から得られたアンチセンスターゲット配列を表2に示す（配列番号4～120も参照のこと）。

#### 【0185】

表2に記載のターゲット配列を含む例示的なオリゴマーを、ホスホロチオアート骨格を有する2'-O-メチル修飾アンチセンスオリゴマーとして本実施例で調製する。以下の実施例2に記載のように、これらのアンチセンスオリゴマーを、カチオン性送達剤（リポフェクタミン2000、リポフェクチン、または類似物）と複合体化し、IVS1-13T>G変異を保有するGSD-II患者由来の線維芽細胞および/またはリンパ球にトランスフェクトする。

#### 【0186】

さらなる試験では、表2に記載のターゲット配列を含む他の例示的なオリゴマーを、PMOとして調製する。以下の実施例2にも記載のように、これらのアンチセンスオリゴマーを、ヌクレオフェクションプロトコルを使用して患者由来の線維芽細胞および/またはリンパ球中に導入する。

#### 【0187】

#### 実施例2

アンチセンスオリゴマーはGSD-II患者由来線維芽細胞中のエクソン2包含を誘導する

アンチセンスオリゴマーがGSD-II個体由来の線維芽細胞および/またはリンパ球中のエクソン2包含を誘導する能力を試験するための試験を行う。一方の実験において、標準的なプロトコルにしたがって2'-O-メチル修飾アンチセンスオリゴマーを調製し、IVS1-13G>T変異を保有するGSD-II患者由来の線維芽細胞および/またはリンパ球にトランスフェクトする。他方の実験において、標準的なプロトコルにしたがってPMOを調製し、ヌクレオフェクションによってこれらの細胞中に導入する。次いで、エクソン2含有mRNAレベルを、RT-PCRによって測定する。

#### 【0188】

GSD-II細胞。GSD-II個体に由来する患者由来線維芽細胞またはリンパ球（Coriell細胞株GM00443、GM11661、GM14463、および/またはGM14484）を、標準的なプロトコルにしたがって10%FBSを含むイーグルMEM中で培養する。細胞を、実験の約3～5日前に継代し、トランスフェクションまたはヌクレオフェクション時のコンフルエントはおおよそ80%である。

#### 【0189】

GM00443線維芽細胞は、30歳男性に由来する。成人型；20代で発症；GAA（抗体によって検出されたGAAタンパク質）のmRNAのサイズおよび量は正常、しかし9～26%しか正常な酸性-1,4グルコシダーゼ活性を持たない；CCRで継代数3；ドナー被験体は、GAA遺伝子のイントロン1の受容体部位の-13位にT>G塩基転換を保有する1つの対立遺伝子とヘテロ接合性を示し、それにより、第1のコードエクソンが欠失した選択的スプライシングを受けた転写物（エクソン2（IVS1-13T>G））を生じる。

#### 【0190】

GM11661線維芽細胞は、38歳男性に由来する。肝臓機能試験で異常を示す；身体活動中にしばしば脚部が筋肉硬直を引き起こす；午前中に頭痛あり；高脂肪食に耐性なし；腹部嚢胞；線維芽細胞およびWBC酸性-1,4グルコシダーゼ活性の欠乏；ドナー被験体は複合ヘテロ接合体である：対立遺伝子1はGAA遺伝子のイントロン1の受容体部位の-13位にT>G塩基転換を保有する（IVS1-13T>G）；得られた選択的スプライシングを受けた転写物は開始コドンを含むエクソン2のインフレーム欠失を有する；対立遺伝子2はエクソン18が欠損している。

#### 【0191】

GM14463リンパ球は、26歳女性に由来する。臨床的に罹患；成人発症型；重篤な全身性筋力低下および消耗疾患；重篤な呼吸機能不全；筋生検で酸性マルターゼ欠損症

10

20

30

40

50



を示した；ドナー被験体は複合ヘテロ接合体である：一方の対立遺伝子はG A A遺伝子のイントロン1の受容体部位の-13位にT>G塩基転換を有し（I V S 1 - 1 3 T > G）、それにより、第1のコードエクソン（エクソン2）が欠失した選択的スプライシングを受けた転写物を生じる；第2の対立遺伝子はエクソン2中のヌクレオチド366で1 b p欠失しており（c . 3 6 6 d e l T）、それにより、フレームシフトおよびタンパク質短縮が起こる（G l n 1 2 4 S e r f s X 1 8）。

#### 【0192】

G M 1 4 4 8 4 リンパ球は61歳男性に由来する。臨床的に罹患；成人発症型）；ドナー被験体は複合ヘテロ接合体である：一方の対立遺伝子はG A A遺伝子のイントロン1の受容体部位の-13位にT>G塩基転換を有し（I V S 1 - 1 3 T > G）、それにより、第1のコードエクソン（エクソン2）が欠失した選択的スプライシングを受けた転写物を生じる；第2の対立遺伝子はエクソン2中のヌクレオチド172にC>T塩基転換を有し（c . 1 7 2 C > T）、それにより、コドン58で終結する（G l n 5 8 T e r（Q 5 8 X））。

#### 【0193】

到着時にG S D - I I患者細胞を増殖させ、アリコートを長期保存のために凍結した。次いで、細胞を増殖させ、細胞から抽出した総RNAに対してRT-PCRを実施してエクソン2が成熟G A Aコード転写物から喪失されていることを確認する。

#### 【0194】

トランスフェクションプロトコル。簡潔に述べれば、2'-O-メチル修飾アンチセンスオリゴマーを、カチオン性リポソーム調製物（リポフェクタミン2000など）と混合し、0、2.5、5、10、25、50、100、および200 nMの濃度範囲にわたって培養細胞に添加する。トランスフェクションから5時間後、培地を置換し、細胞を5% CO<sub>2</sub> 中にて37℃で24～72時間インキュベートする。偽トランスフェクション細胞および未処置細胞を、ネガティブコントロールとして含める。総RNAを細胞調製物から抽出し、G A A発現の変化をモニタリングするための（特に成熟G A A転写物中のエクソン2の包含/保持の増加を調査するための）RT-PCRアッセイにおけるテンプレートとして使用する。トランスフェクトされた2'-O-メチル修飾アンチセンスオリゴマーを以下の表E1に示す。本実施例について、配列番号119および120の各Xはウラシル（U）であった。

#### 【表1E-1】

表E1			
ゲル上の番号	名称	配列	配列番号
1	GAA-IVS2(-4-20)	CCCGCCCCUGCCCUGCC	10
2	GAA-IVS2(-14-30)	UGGCCGCCGCCCGCCC	11
3	GAA-IVS2(-33-52)	UGUCCACGCGCAGCCUCUGC	12
4	GAA-IVS2(-213-237)	UGACCCACCCUUUCAUAAAGAUGAA	21
5	GAA-IVS2(-234-258)	CUCUGGCAGCCCUACUCUACCUGAC	22
6		GGCCCXGGXCXGCXGGCXCCCXGCX	119

【表 1 E - 2】

7		GCXCCCXGCAGCCCCXGCXXXGCAG	120
8	GAA-IVS1 (-39-20)	GCUCAGCAGGGAGGCGGGAG	4
9	GAA-IVS1 (-74-55)	GGCUCUCAAGCAGCUCUGA	5
10	GAA-IVS1 (-99-75)	GACAUCAACCGCGGCUGGCACUGCA	6
11	GAA-IVS1 (-139-115)	GGGUAAGGUGGCCAGGGUGGGUGUU	7
12	GAA-IVS1 (-158-140)	GCCUGCUGUCUAGACUGG	8
13	GAA-IVS1 (-179-160)	GAGAGGGCCAGAAGGAAGGG	9
14	GAA-IVS2 (-53-72)	GUGAGGUGCGUGGGUGUCGA	13
15	GAA-IVS2 (-73-92)	GCAACAUGCACCCACCCUU	14
16	GAA-IVS2 (-93-112)	AGGGCCCAGCACACAGUGGU	15
17	GAA-IVS2 (-113-132)	UCACACCUCCGCUCCAGCA	16
18	GAA-IVS2 (-133-150)	GGCGCUGCCAUUGUCUGC	17
19	GAA-IVS2 (-153-172)	GUGUCCCCACUGCUCUCCCGA	18
20	GAA-IVS2 (-173-192)	CUGGAGUACCUGUCACCGUG	19
21	GAA-IVS2 (-193-212)	UGAGCCCCGAGCCUCCUU	20
22	GAA-IVS2 (-338-364)	CUAGUAUAAUACAUCCCAAAUUUUGC	23
表E1中の任意の配列について、ウラシル塩基(U)をチミン塩基(T)に置換することができ(その逆も同様)、各Xはチミン(T)またはウラシル(U)から独立して選択される。			

10

## 【0195】

ヌクレオフェクションプロトコール。アンチセンスPMOを、無ヌクレアーゼ水(DECPCで処理せず)の1~2mM保存液として調製し、この保存液からヌクレオフェクションのために適切に希釈する。GSD-II細胞をトリプシン処理し、計数し、90gで10分間遠心分離し、 $1 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/ウェルをヌクレオフェクション溶液P2(Lonza)に再懸濁する。次いで、アンチセンスPMO溶液および細胞を、Nucleocuvette 16ウェルストリップの各ウェルに添加し、プログラムEN-100を使用してパルスを生産させる。細胞を室温で10分間インキュベートし、2連で12ウェルプレートに移す。製造者の推奨するプロトコールにしたがってGE Illustra 96 Spinキットを使用して、48時間後に処置細胞から総RNAを単離する。回収したRNAを分析前に-80で保存する。

20

## 【0196】

GAA RT-PCR。エクソン2含有mRNAのPCR検出のために、エクソン1(順方向)からエクソン3(逆方向)までのプライマー配列を選択する。エクソン1~3に及ぶRT-PCRにより、およそ1177塩基の全長アンプリコンが生成されるであろう(正常なヒト細胞由来の全長アンプリコンについては、図2を参照のこと)。インタクトなアンプリコン(約1177塩基)とエクソン2(エクソン2は約578塩基である)を欠く約600塩基の転写物との間のサイズの相違は、短い方の産物が実質的に優先的に増幅されることを意味するであろう。これにより、アンチセンスオリゴマーによる全長転写物またはエクソン2含有転写物のスプライシングの誘導効率のアッセイにおける高度なベンチマークが設定されるであろう。

30

## 【0197】

SuperScript II One-Step RT-PCRシステム(Invitrogen)を使用して逆転写酵素PCRを実施してGAA対立遺伝子を増幅させる。ヌクレオフェクションを行った細胞から単離した400ngの総RNAを逆転写し、遺伝子特異的プライマーを使用して増幅する。

40

## 【0198】

One-Stepキットに含まれる増幅溶液に、蛍光によるバンド視覚化を可能にするためのCy5標識dCTP(GE)を補足する。消化したサンプルを、プレキャスト10%アクリルアミド/TBEゲル(Invitrogen)上で泳動し、プラテン表面に焦平面を有する633nm励起レーザーおよび670nm BP30発光フィルタを使用してTyphoon Trio(GE)にて視覚化する。ImageQuant(GE)を使用してゲルを分析してバンド強度を決定する。エクソン2を含む全バンド由来の強度を

50

合わせて包含分析における全エクソン 2 転写物レベルとする。

【0199】

あるいは、PCR増幅産物を、エクソン包含率決定のためにCaliperバイオアナライザーまたはAgilent 2200 Tape Stationで分析する。

【0200】

表E1の2'-O-メチル修飾アンチセンスオリゴマーの結果を、図3A~3Cに示す。図3Aは、(全長約1177塩基のアンプリコンと比較して)約600塩基アンプリコンの増幅の減少によって証明されるように、オリゴマー9(GAA-IVS1(-74-55))および12(GAA-IVS1(-158-140))がIVS1-13G>T変異を保有するヒト細胞中のエクソン2包含を誘導したことを示す。図3Bはオリゴマー14(GAA-IVS2(-53-72))がエクソン-2包含を誘導したことを示し、図3Cはオリゴマー20(GAA-IVS2(-173-192))およびオリゴマー22(GAA-IVS2(-338-364))が同様にある程度のエクソン-2包含を誘導したことを示す。

【0201】

#### 実施例3

アンチセンスオリゴマーは、GSD-II患者由来線維芽細胞中の酵素活性酸性-グルコシダーゼレベルの上昇を誘導する

(上記のように)本開示のアンチセンスオリゴマーで処置したGSD-II患者細胞は、エクソン2含有GAAMRNA発現の増加によって機能的/活性GAAレベルが上昇したことを示す。処置細胞を調製し、標準的プロトコールを使用してタンパク質を抽出する。タンパク質濃度を決定し、所定量の抽出タンパク質をGAA酵素活性について測定する。高レベルのGAAを誘導するアンチセンスオリゴマーは、本開示の好ましい実施形態である。

【0202】

#### 実施例4

GSD-II患者由来線維芽細胞中のアンチセンスPMO誘導性の用量依存性エクソン2包含

GM00443線維芽細胞を、上記のヌクレオフェクション手順および上の実施例2に記載の最初のGAAエクソン2包含の結果に基づいてPMOとして作製したアンチセンス配列を使用して処置した。20uMの、以下の表4Aで確認されるターゲティング配列を有する上記式(VII)のPMOに、前述のようにヌクレオフェクションを行い、細胞を、総RNA単離前に5%CO<sub>2</sub>を用いて37で24時間インキュベートした。表4BのプライマーFWD124(配列番号121)、FWD645(配列番号122)、およびREV780(配列番号123)を用いたRNAのRT-PCR増幅を、Caliper LabChipを使用して分析してエクソン2包含率を決定し、その結果を図4A(イントロン1をターゲティングするPMO)、図4B(エクソン2をターゲティングするPMO)、および図4C(イントロン2をターゲティングするPMO)に示す。

【表4A-1】

表4A ヌクレオフェクションを行ったPMOターゲティング配列		
名称	配列(5'-3')	配列番号
GAAイントロン1アンチセンス配列: 図4A		

【表 4 A - 2】

GAA-IVS1 (-39-20)	GCUCAGCAGGGAGGCGGGAG	4
GAA-IVS1 (-74-55)	GGCUCUCAAGCAGCUCUGA	5
GAA-IVS1 (-99-75)	GACAUCAACCGCGGUGGCACUGCA	6
GAA-IVS1 (-139-115)	GGGUAAGGUGGCCAGGGUGGGUGUU	7
GAA-IVS1 (-158-140)	GCCCUGCUGUCUAGACUGG	8
GAA-IVS1 (-179-160)	GAGAGGGCCAGAAGGAAGGG	9
GAA-IVS1.6.20	GCGGGGCAGACGTCAGGTGT	27
GAA-IVS1.10.20	CAGCGCGGGGCAGACGTCAG	29
GAA-IVS1.14.20	CCGGCAGCGCGGGGCAGACG	31
GAA-IVS1.17.20	CCGCCGGCAGCGCGGGGCAG	33
GAA-IVS1.24.20	GATGTTACCGCGGCAGCGC	35
GAA-IVS1.28.20	CTGGGATGTTACCGCGGCA	37
GAA-IVS1.32.20	GCTTCTGGGATGTTACCGCC	39
GAA-IVS1.2015.20	TGGCAACTCGTATGTCCTTA	41
GAA-IVS1.2019.20	ATTCTGGCAACTCGTATGTC	43
GAA-IVS1.2024.20	AAGTGATTCTGGCAACTCGT	45
GAA-IVS1.2037.20	TGGGTGTCAGCGGAAGTGAT	46
GAA-IVS1.2043.20	GTCCACTGGGTGTCAGCGGA	48
GAA-IVS1.2048.20	GCTTGGTCCACTGGGTGTCA	50
GAA-IVS1.2071.20	CCCCACTTCTGCATAAAGGT	52
GAA-IVS1.2075.20	GGAGCCCCACTTCTGCATAA	54
GAA-IVS1.2079.20	GCTGGGAGCCCCACTTCTGC	56
GAA-IVS1.2088.20	CCACGCCTGGCTGGGAGCCC	58
GAA-IVS1.2115.20	TCCGAAGTGCTGGGATTTC	59
GAA-IVS1.2132.20	TCCACCCCCCTTGGCCTTCC	60
GAA-IVS1.2135.20	TGATCCACCCCCCTTGGCCT	61
GAA-IVS1.2140.20	TCAAGTGATCCACCCCCCTT	62
GAA-IVS1.2152.20	GAACCTCTGAGCTCAAGTGA	64
GAA-IVS1.2156.20	TCTCGAACTCCTGAGCTCAA	65
GAA-IVS1.2165.20	CCAGGCTGGTCTCGAACTCC	67
GAA-IVS1.2178.20	TTTGCCATGTTACCCAGGCT	68
GAA-IVS1.2185.20	ACGGGATTTTGCCATGTTAC	70
GAA-IVS1.2190.20	TAGAGACGGGATTTTGCCAT	72
GAA-IVS1.2195.20	TTTTGTAGAGACGGGATTTT	73
GAA-IVS1.2202.20	TCTGTATTTTGTAGAGACG	75
GAA-IVS1.2206.20	ATTTTCTGTATTTTGTAGA	77
GAA-IVS1.2210.20	GCTAATTTTCTGTATTTTG	79
<b>GAAエクソン2アンチセンス配列: 図4B</b>		
GAAEx2A (+202+226)	GGCCCUGGUCUGGCUCCUGCU	24
GAAEx2A (+367+391)	GCUCCUGCAGCCCCUGCUUUGCAG	25
<b>GAAイントロン2アンチセンス配列: 図4C</b>		
GAA-IVS2 (-4-20)	CCCCCCCCUGCCUGCC	10
GAA-IVS2 (-14-30)	UGGCCGCCGCCCGCCC	11
GAA-IVS2 (-33-52)	UGUCCACGCGCACCCUCUGC	12
GAA-IVS2 (-53-72)	GUGAGGUGCGUGGGUGUCGA	13
GAA-IVS2 (-73-92)	GCAACAUGCACCCACCCUU	14
GAA-IVS2 (-93-112)	AGGGCCCAGCACACAGUGGU	15
GAA-IVS2 (-113-132)	UCACACCUCCGCUCCAGCA	16
GAA-IVS2 (-133-150)	GGCGCUGCCAUUGUCUGC	17
GAA-IVS2 (-153-172)	GUGUCCCCACUGCUCCCGA	18
GAA-IVS2 (-173-192)	CUGGAGUACCUGUCACCGUG	19
GAA-IVS2 (-193-212)	UGAGCCCCGAGCCUGCCUU	20
GAA-IVS2 (-213-237)	UGACCCACCUUUUCAUAAAGAUGAA	21
GAA-IVS2 (-234-258)	CUCUGGCAGCCUACUCUACCUGAC	22
GAA-IVS2 (-338-364)	CUAGUAUAAAUACAUCCCAAUUUUGC	23
GAA-IVS2.6.20	CCGCCCCCGCCCCTGCCCTG	81
GAA-IVS2.9.20	CCGCGCCCCCGCCCCTGCC	82
GAA-IVS2.12.20	TGGCCGCCGCCCGCCCCT	83

10

20

30

40

【表 4 A - 3】

GAA-IVS2.18.20	CTGCCCTGGCCGCCGCCCCC	84
GAA-IVS2.24.20	CACCTCTGCCCTGGCCGCC	85
GAA-IVS2.27.20	GCGCACCTCTGCCCTGGCC	86
GAA-IVS2.40.20	TGTCGATGTCCACGCGCACC	87
GAA-IVS2.48.20	TGCGTGGGTGTGATGTCCA	89
GAA-IVS2.67.20	GCACCCACCTTGTGAGGT	91
GAA-IVS2.72.20	AACATGCACCCACCTTGT	92
GAA-IVS2.431.20	AGGAGGAGGACGCTCCCCC	93
GAA-IVS2.446.20	CTCATCTGCAGAGCCAGGAG	94
GAA-IVS2.451.20	GCTCCCTCATCTGCAGAGCC	97
GAA-IVS2.454.20	TCGGCTCCCTCATCTGCAGA	100
GAA-IVS2.457.20	GCCTCGGCTCCCTCATCTGC	103

10

【表 4 B】

表4B RNA増幅のためのRT-PCRプライマー配列		
名称	配列(5'-3')	配列番号
FWD124	CGTTGTTTCAGCGAGGGA	121
FWD645	CTCCTCTGAAATGGGCTACAC	122
REV780	ACCTCGTAGCGCCTGTTA	123

## 【0203】

20

したがって、本開示は、ヒト酸性 - グルコシダーゼ ( G A A ) 遺伝子 m R N A 中のエクソン 2 包含を検出する方法であって、

配列番号 1 2 1、1 2 2、または 1 2 3 からなる群から選択される塩基配列を含む少なくとも 1 つのポリメラーゼ連鎖反応プライマーを使用して G A A m R N A を増幅する工程を含む、方法も含む。

## 【0204】

例えば、本発明の実施形態では、以下が提供される。

## (項目 1)

1 0 ~ 4 0 個のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのアンチセンスオリゴマー化合物であって、

30

ホスホルアミダートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー ( P M O )、ペプチド核酸 ( P N A )、ロックド核酸 ( L N A )、ホスホロチオアートオリゴマー、トリシクロ - D N A オリゴマー、トリシクロ - ホスホロチオアートオリゴマー、2' O - M e - ホスホロチオアートオリゴマー、または前記の任意の組み合わせから選択される非天然化学骨格 ; および

ヒト酸性 - グルコシダーゼ ( G A A ) 遺伝子のプレ - m R N A のイントロン 1 ( 配列番号 1 )、イントロン 2 ( 配列番号 2 )、またはエクソン 2 ( 配列番号 3 ) 内の領域に相補的なターゲティング配列

を含む、アンチセンスオリゴマー化合物。

## (項目 2)

40

前記ターゲティング配列が、配列番号 4 ~ 1 2 0 ( ここで、X がウラシル ( U ) またはチミン ( T ) から選択される ) から選択される、項目 1 に記載の化合物。

## (項目 3)

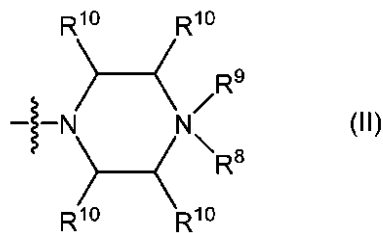
式 ( I ) :

[illegible]

各  $R^1$  は、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-NR^5R^6$ 、 $-OR^7$ 、

式 ( I I ) 部分 :

【化 2 9】



10

( 式中、

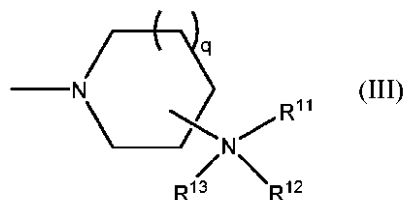
$R^8$  は、水素、メチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-Z-T^2-NHC(=NH)NH_2$ 、および  $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$  からなる群から選択され、 $Z$  はカルボニルまたは直接結合であり、

$R^9$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

各  $R^{10}$  は、水素またはメチルから独立して選択される ) ；および

式 ( I I I ) 部分 :

【化 3 0】



20

( 式中、

$q$  は 0 ~ 2 の整数であり、

$R^{11}$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、アラルキル、および  $-C(=NH)NH_2$  からなる群から選択され、

30

$R^{12}$  は、水素、アラルキル、および  $C_1 \sim C_6$  アルキルからなる群から選択され、または

$R^{11}$  および  $R^{12}$  は窒素原子と付着して 5 ~ 7 員環を形成し、前記環は、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され、

$R^{13}$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択される ) からなる群から独立して選択され、

$R^2$  は、水素、OH、ヌクレオチド、 $-(CH_2)_mC(O)NR^fR^g$  からなる群から選択され、 $R^f$  および  $R^g$  は、H、アシル、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、および  $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$ 、 $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$ 、 $H(O(CH_2)_sO)_w-$ 、 $H(OCH_2CH_2O)_w-$ 、トリチル、 $-C(=O)OR^f$ 、およびアシルから独立して選択され、 $R^f$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分またはその組み合わせを含む  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、または  $R^2$  は存在せず；

40

$R^3$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ヌクレオチド、 $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$ 、 $-C(=NH)NH_2$ 、トリチル、 $-C(=O)OR^g$ 、アシル、 $-C(O)(CH_2)_mC(O)$ 、および  $T^4-(4-(4,6-(NR_2)-1,3,5-トリアジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)$  からなる群から選択され、

$R^g$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分またはその組み合

50

10

20

【化 3 1】



40

50



( 項 目 8 )

50 ~ 90 % の  $R^1$  基が  $-N(CH_2)_3$  である、項目 3 に記載の化合物。

( 項 目 9 )

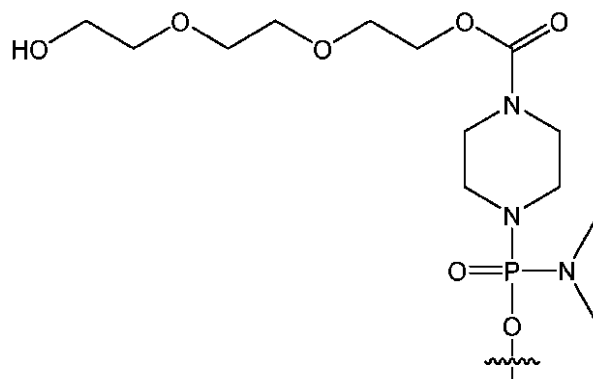
66 % の  $R^1$  基が  $-N(CH_2)_3$  である、項目 3 に記載の化合物。

( 項 目 10 )

$n$  は 2 であり ;

$R^2$  と  $L$  が共に式 :

【化 32】



10

を形成し ;

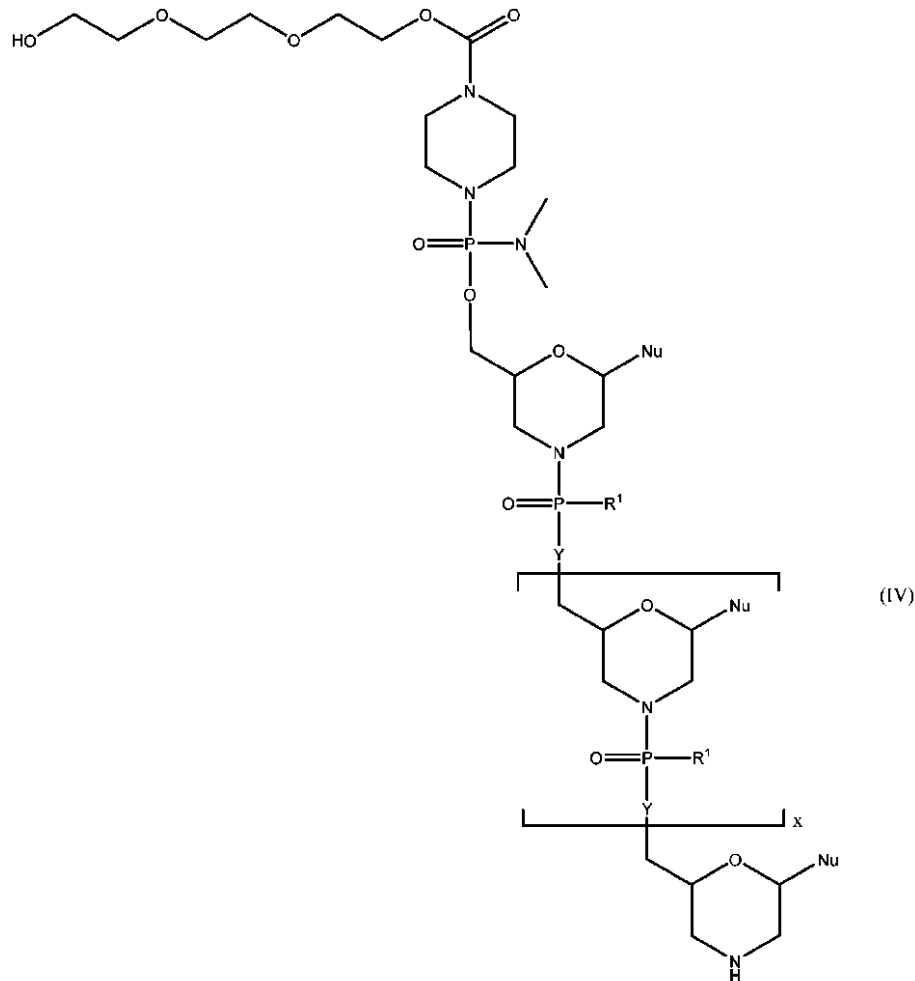
$Y$  は各部位で  $O$  である、項目 3 に記載の化合物

( 項 目 11 )

式 ( IV ) :

20

## 【化 3 3】



(式中、

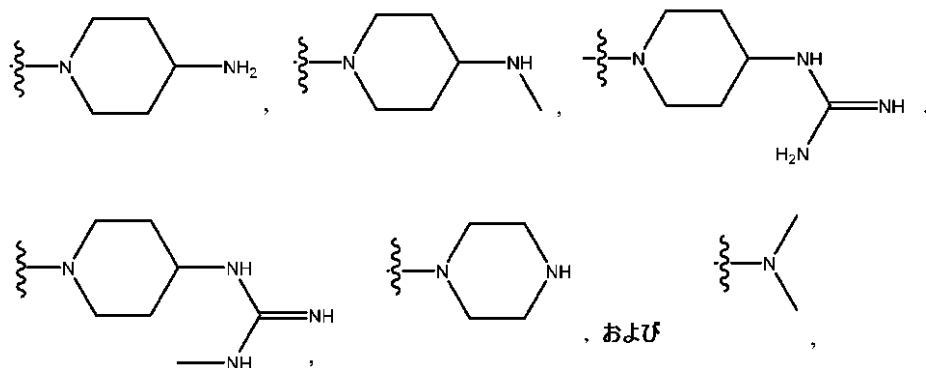
各 Nu は、共にターゲティング配列を形成する核酸塩基であり；

x は 15 ~ 25 の整数であり；

各 Y は O であり；

各 R<sup>1</sup> は、：

## 【化 3 4】



からなる群から独立して選択され、

少なくとも 1 つの R<sup>1</sup> は -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> であり、

ここで、前記ターゲティング配列は配列番号 4 ~ 120 (ここで、X はウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される) の化合物またはその薬学的に許容され得る塩。

ヒト酸性 - グルコシダーゼ ( G A A ) 遺伝子のプレ - m R N A のイントロン 1 ( 配列番号 1 )、イントロン 2 ( 配列番号 2 )、またはエクソン 2 ( 配列番号 3 ) 内の領域に相補的なターゲティング配列を含む、薬学的組成物。

前記ターゲティング配列が、配列番号 4 ~ 120（ここで、Xはウラシル（U）またはチミン（T）から選択される）から選択される、項目 12 に記載の薬学的組成物。

式 ( I ) :

[illegible]

R' は水素またはアシルから選択され、

$m$  は 1 ~ 60 の整数であり、

$R^c$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、アラルキル、および  $-C(=NH)NH_2$  からなる群から選択され、

$R^d$  は、水素、アラルキル、および  $C_1 \sim C_6$  アルキルからなる群から選択され、または

$R^c$  および  $R^d$  がそれぞれ独立して  $C_1 \sim C_6$  アルキルまたはアラルキルである場合、 $R^c$  および  $R^d$  は窒素原子と付着して 5 ~ 7 員環を形成し、前記環は、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され、

$R^e$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

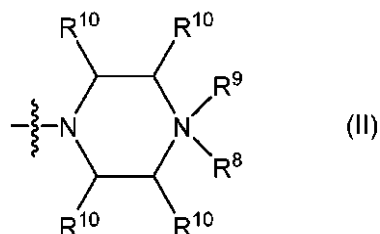
各  $L$  は、 $-P(O)_2OH-$ 、 $-P(O)_2R^1-$ 、 $-P(O)_2(N(CH_3)_3-N(CH_3)CH_2C(O)NH_2$ 、ピペラジニル基、カルボニル基、 $H(O(CH_2)_sO)_w-$ 、 $-(OCH_2CH_2O)_w$ 、および  $-(C(O)CHR'NH)_mR''$  からなる群から独立して選択され、 $w$  は 3 ~ 20 から選択される整数であり、 $s$  は 1 ~ 8 から選択される整数であり；

$n$  は 0 ~ 3 の整数であり；

各  $R^1$  は、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-NR^5R^6$ 、 $-OR^7$ 、

式 (II) 部分：

【化 36】



(式中、

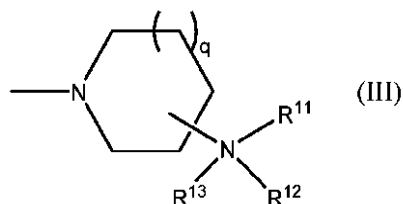
$R^8$  は、水素、メチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-Z-T^2-NHC(=NH)NH_2$ 、および  $-(C(O)CHR'NH)_mR''$  からなる群から選択され、 $Z$  はカルボニルまたは直接結合であり、

$R^9$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

各  $R^{10}$  は、水素またはメチルから独立して選択される)；および

式 (III) 部分：

【化 37】



(式中、

$q$  は 0 ~ 2 の整数であり；

$R^{11}$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、アラルキル、および  $-C(=NH)NH_2$  からなる群から選択され、

$R^{12}$  は、水素、アラルキル、および  $C_1 \sim C_6$  アルキルからなる群から選択され、ま

たは

$R^{11}$  および  $R^{12}$  は窒素原子と付着して 5 ~ 7 員環を形成し、前記環は、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され；

$R^{13}$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択される) からなる群から独立して選択され；

$R^2$  は、水素、OH、ヌクレオチド、 $-(CH_2)_m C(O)NR^f R^g$  からなる群から選択され、 $R^f$  および  $R^g$  は、H、アシル、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、および  $-(C(O)CH(R')NH)_m R''$ 、 $-(C(O)CH(R')NH)_m R''$ 、 $H(O(CH_2)_s O)_w -$ 、 $H(OCH_2CH_2O)_w -$ 、トリチル、 $-C(=O)OR^f$ 、およびアシルから独立して選択され、 $R^f$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分またはその組み合わせを含む  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、または  $R^2$  は存在せず；

$R^3$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、ヌクレオチド、 $-(C(O)CH(R')NH)_m R''$ 、 $-C(=NH)NH_2$ 、トリチル、 $-C(=O)OR^g$ 、アシル、 $-C(O)(CH_2)_m C(O)$ 、および  $T^4 - (4 - (4, 6 - (NR_2) - 1, 3, 5 - \text{トリアジン} - 2 - \text{イル}) \text{ピペラジン} - 1 - \text{イル})$  からなる群から選択され、

$R^g$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分またはその組み合わせを含む  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり；

$T^4$  は  $-C(O)(CH_2)_6 C(O)-$  または  $-C(O)(CH_2)_2 S_2 (CH_2)_2 C(O)-$  から選択され；

$R$  は  $-(CH_2)_6 OC(O)NH(CH_2)_6 NHC(NH)NH_2$  であり、

$R^4$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアシルからなる群から選択され、各  $R^5$  は水素またはメチルから独立して選択され；

各  $R^6$  および各  $R^7$  は、水素または  $-T^3 - NR^c R^d R^e$  から独立して選択され；

$T^1$ 、 $T^2$ 、および  $T^3$  の各々は、独立して、アルキル基、アルコキシ基、もしくはアルキルアミノ基、またはその組み合わせを含む 18 原子長までの任意選択的なリンカーであり、

ここで、前記ターゲティング配列が、ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のブレ-mRNA のイントロン 1 (配列番号 1)、イントロン 2 (配列番号 2)、またはエクソン 2 (配列番号 3) 内の領域に相補的である) の化合物またはその薬学的に許容され得る塩、および

薬学的に許容され得るキャリア

を含む薬学的組成物。

(項目 15)

各  $R^1$  が  $-N(CH_3)_2$  である、項目 14 に記載の薬学的組成物。

(項目 16)

前記ターゲティング配列が、配列番号 4 ~ 120 (ここで、X はウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される、項目 15 に記載の薬学的組成物。

(項目 17)

n は 2 であり；

$R^2$  と L が共に式：

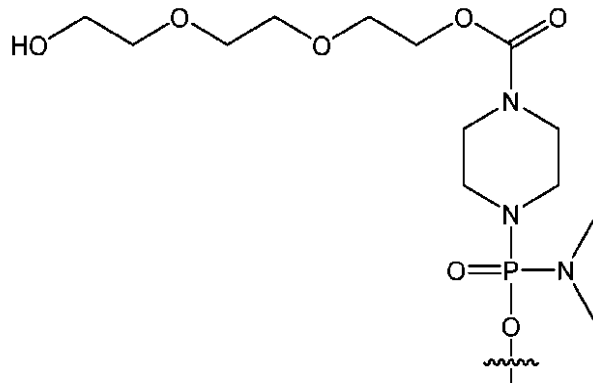
10

20

30

40

## 【化 3 8】



10

を形成し；

Yは各部位でOである、項目14に記載の薬学的組成物。

(項目18)

II型糖原貯蔵障害の処置を必要とする被験体におけるII型糖原貯蔵障害の処置方法であって、有効量の以下：

ホスホリアミダートモルホリノオリゴマーまたはホスホロジアミダートモルホリノオリゴマー (PMO)、ペプチド核酸 (PNA)、ロックド核酸 (LNA)、ホスホロチオアートオリゴマー、トリシクロ-DNAオリゴマー、トリシクロ-ホスホロチオアートオリゴマー、2'-O-Me-ホスホロチオアート (phosphorothioate) オリゴマー、または前記の任意の組み合わせから選択される非天然化学骨格；および

ヒト酸性-グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNAのイントロン1 (配列番号1)、イントロン2 (配列番号2)、またはエクソン2 (配列番号3) 内の領域に相補的なターゲティング配列

を含む10～40個のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのアンチセンスオリゴマー化合物を前記被験体に投与する工程を含む、方法。

(項目19)

前記ターゲティング配列が、配列番号4～120 (ここで、Xはウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される、項目18に記載の方法。

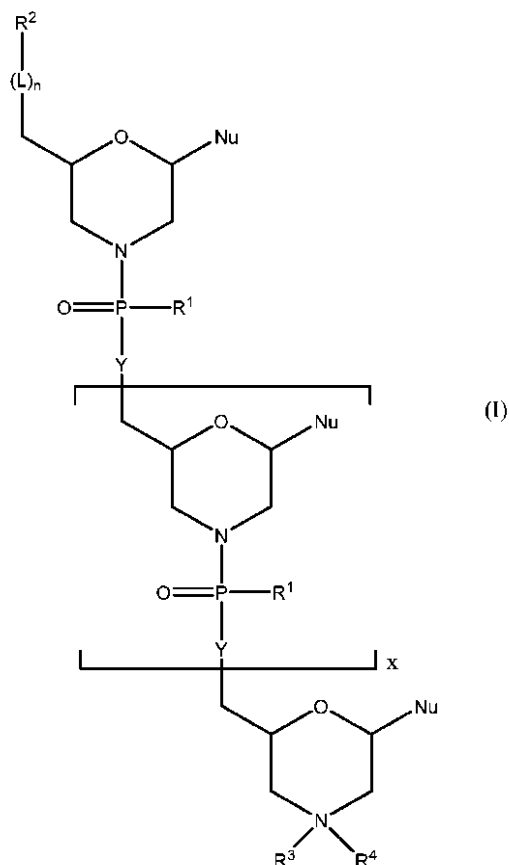
(項目20)

II型糖原貯蔵障害の処置を必要とする被験体におけるII型糖原貯蔵障害の処置方法であって、有効量の式 (I)：

20

30

## 【化 3 9】



10

20

(式中、

各 Nu は、共にターゲティング配列を形成する核酸塩基であり；

x は 8 ～ 38 の整数であり；

各 Y は、独立して、O または -NR<sup>a</sup> から選択され、R<sup>a</sup> は、水素、-T<sup>1</sup>-NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>、R<sup>e</sup>、および -[(C(O)CHR'<sup>''</sup>NH)<sub>m</sub>]R<sup>''</sup> からなる群から選択され；R<sup>'</sup> は、天然に存在するアミノ酸またはその 1 炭素ホモログもしくは 2 炭素ホモログの側鎖であり、

30

R<sup>''</sup> は水素またはアシルから選択され、

m は 1 ～ 60 の整数であり、

R<sup>c</sup> は、水素、C<sub>1</sub> ～ C<sub>6</sub> アルキル、アラルキル、および -C(=NH)NH<sub>2</sub> からなる群から選択され、R<sup>d</sup> は、水素、アラルキル、および C<sub>1</sub> ～ C<sub>6</sub> アルキルからなる群から選択され、またはR<sup>c</sup> および R<sup>d</sup> がそれぞれ独立して C<sub>1</sub> ～ C<sub>6</sub> アルキルまたはアラルキルである場合、R<sup>c</sup> および R<sup>d</sup> は窒素原子と付着して 5 ～ 7 員環を形成し、前記環は、C<sub>1</sub> ～ C<sub>6</sub> アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され、

40

R<sup>e</sup> は、電子対、水素、C<sub>1</sub> ～ C<sub>6</sub> アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；各 L は、-P(O)<sub>2</sub>OH-、-P(O)<sub>2</sub>R<sup>1</sup>-、-P(O)<sub>2</sub>(N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>、ピペラジニル基、カルボニル基、H(O(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>O)<sub>w</sub>-、-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>w</sub>-、および -[(C(O)CHR'<sup>''</sup>NH)<sub>m</sub>]R<sup>''</sup> からなる群から独立して選択され；

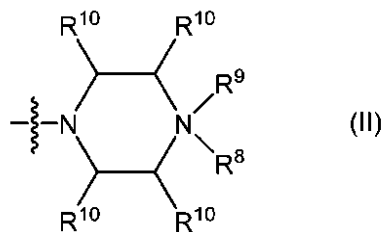
n は 0 ～ 3 の整数であり；

各 R<sup>1</sup> は、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>、-OR<sup>7</sup>、

式 (II) 部分：

50

## 【化 4 0】



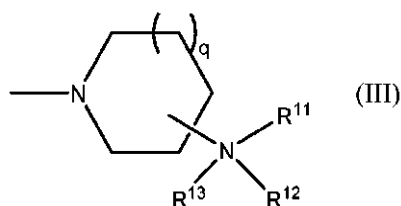
(式中、

$R^8$  は、水素、メチル、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-Z-T^2-NHC(=NH)NH_2$ 、および  $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$  からなる群から選択され、 $Z$  はカルボニルまたは直接結合であり、

$R^9$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択され；

各  $R^{10}$  は、水素またはメチルから独立して選択される)；および  
式(III)部分：

## 【化 4 1】



(式中、

$q$  は 0 ~ 2 の整数であり；

$R^{11}$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、アラルキル、および  $-C(=NH)NH_2$  からなる群から選択され、

$R^{12}$  は、水素、アラルキル、および  $C_1 \sim C_6$  アルキルからなる群から選択され、または

$R^{11}$  および  $R^{12}$  は窒素原子と付着して 5 ~ 7 員環を形成し、前記環は、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、フェニル、ハロゲン、およびアラルキルからなる群から選択される置換基と必要に応じて置換され；

$R^{13}$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアラルキルからなる群から選択される)からなる群から独立して選択され；

$R^2$  は、OH、オリゴマー、 $-(CH_2)_mC(O)NR^fR^g$  からなる群から選択され、 $R^f$  および  $R^g$  は、H、アシル、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、および  $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$ 、 $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$ 、 $H(O(CH_2)_sO)_w-$ 、 $H(OCH_2CH_2O)_w-$ 、トリチル、 $-C(=O)OR^f$ 、およびアシルから独立して選択され、 $w$  は 3 ~ 20 から選択される整数であり、 $s$  は 1 ~ 4 から選択される整数であり、 $R^f$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分またはその組み合わせを含む  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、または  $R^2$  は存在せず；

$R^3$  は、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、オリゴマー、 $-[(C(O)CHR'NH)_m]R''$ 、 $-C(=NH)NH_2$ 、トリチル、 $-C(=O)OR^g$ 、アシル、 $-C(O)(CH_2)_mC(O)$ 、および  $T^4-(4-(4,6-(NR_2)-1,3,5-トリアジン-2-イル)ピペラジン-1-イル)$  からなる群から選択され、

$R^g$  は、1 つまたはそれを超える酸素部分もしくはヒドロキシル部分またはその組み合わせを含む  $C_1 \sim C_{30}$  アルキルであり、



$T^4$  は  $-C(O)(CH_2)_6C(O)-$  または  $-C(O)(CH_2)_2S_2(CH_2)_2C(O)-$  から選択され、

$R$  は  $-(CH_2)OC(O)NH(CH_2)_6NHC(NH)NH_2$  であり；

$R^4$  は、電子対、水素、 $C_1 \sim C_6$  アルキル、およびアシルからなる群から選択され、

各  $R^5$  は水素またはメチルから独立して選択され；

各  $R^6$  および各  $R^7$  は、水素または  $-T^3-NR^cR^dR^e$  から独立して選択され；

$T^1$ 、 $T^2$ 、および  $T^3$  の各々は、独立して、アルキル基、アルコキシ基、もしくはアルキルアミノ基、またはその組み合わせを含む 18 原子長までの任意選択的なリンカーであり、

ここで、前記ターゲティング配列が、ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNA のイントロン 1 (配列番号 1)、イントロン 2 (配列番号 2)、またはエクソン 2 (配列番号 3) 内の領域に相補的である) のアンチセンスオリゴマー化合物またはその薬学的に許容され得る塩を前記被験体に投与する工程を含む、方法。

10

(項目 21)

各  $R^1$  が  $-N(CH_3)_2$  である、項目 20 に記載の方法。

(項目 22)

前記ターゲティング配列が、配列番号 4 ~ 120 (ここで、X がウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択される、項目 21 に記載の方法。

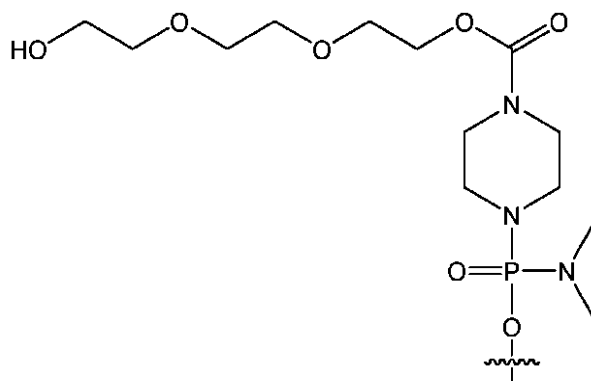
(項目 23)

$n$  は 2 であり；

20

$R^2$  と  $L$  は共に式：

【化 42】



30

を形成し；

Y は各部位で O である、項目 20 に記載の方法。

(項目 24)

ヒト酸性 - グルコシダーゼ (GAA) 遺伝子のプレ-mRNA のイントロン 1 (配列番号 1)、エクソン 2 (配列番号 2)、またはイントロン 2 (配列番号 3) 内の領域に特異的にハイブリッド形成するのに十分な長さおよび相補性のターゲティング配列を含むアンチセンスオリゴマー。

40

(項目 25)

前記ターゲティング配列が、配列番号 4 ~ 120 (ここで、X はウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択されるターゲティング配列の少なくとも 10 個の連続するヌクレオチドを含む、項目 24 に記載のアンチセンスオリゴマー。

(項目 26)

前記ターゲティング配列が、配列番号 4 ~ 120 (ここで、X はウラシル (U) またはチミン (T) から選択される) から選択されるターゲティング配列と 80 % の配列が同一である、項目 24 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【図 1】

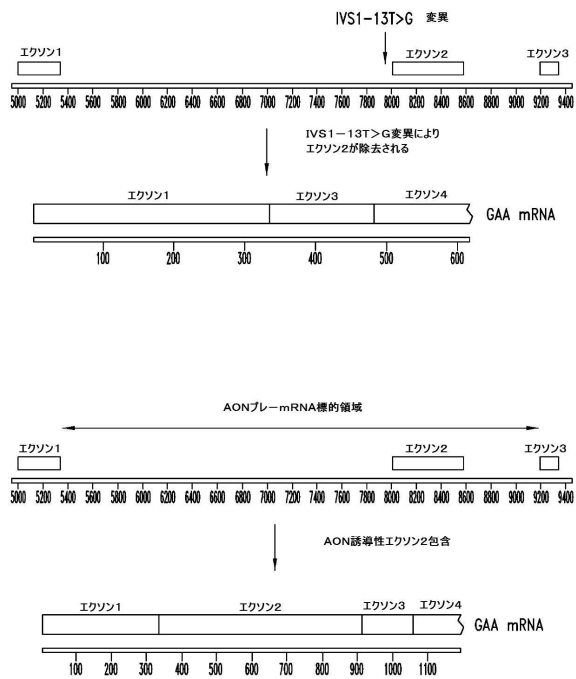


FIG. 1

【図 2】

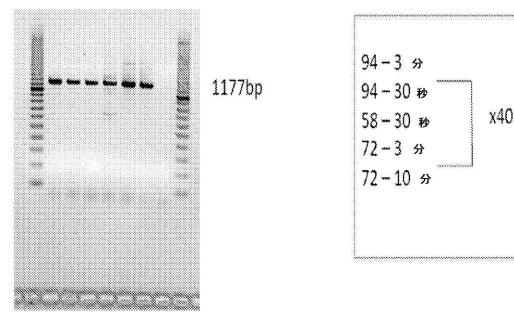


Fig. 2

【図 3 A】

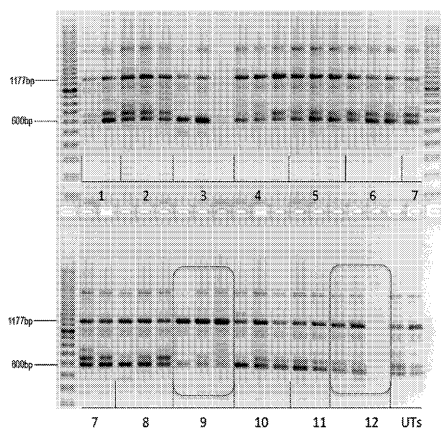


Fig. 3A

【図 3 B】

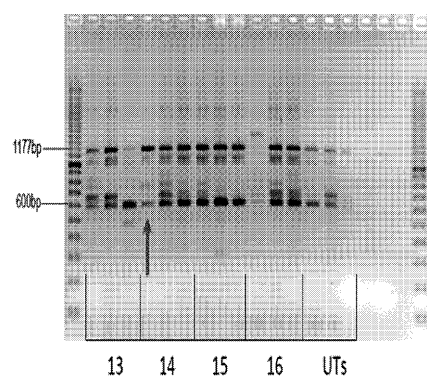


Fig. 3B

【 図 3 C 】

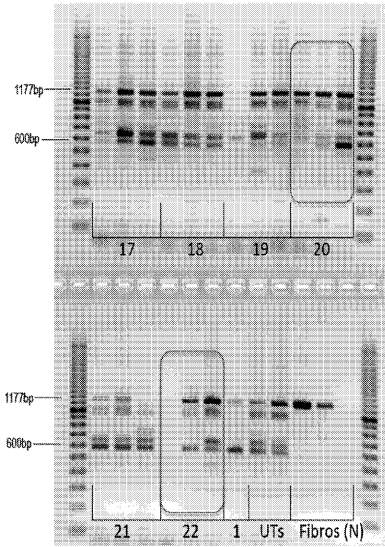


Fig. 3C

【 図 4 A 】

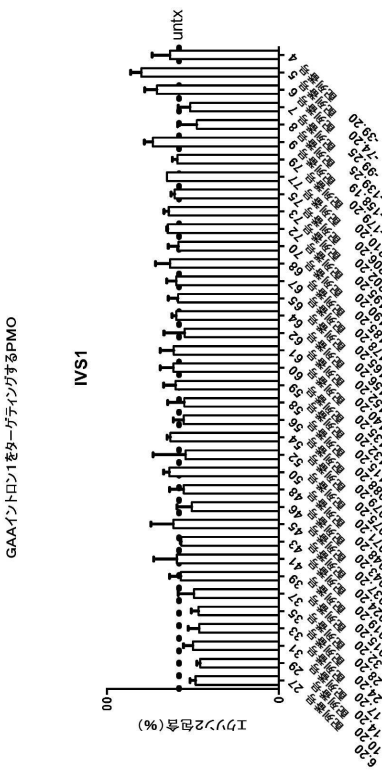


Fig. 4A

【 図 4 B 】

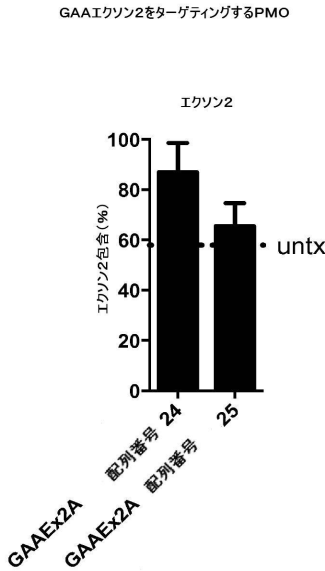


Fig. 4B

【 図 4 C 】

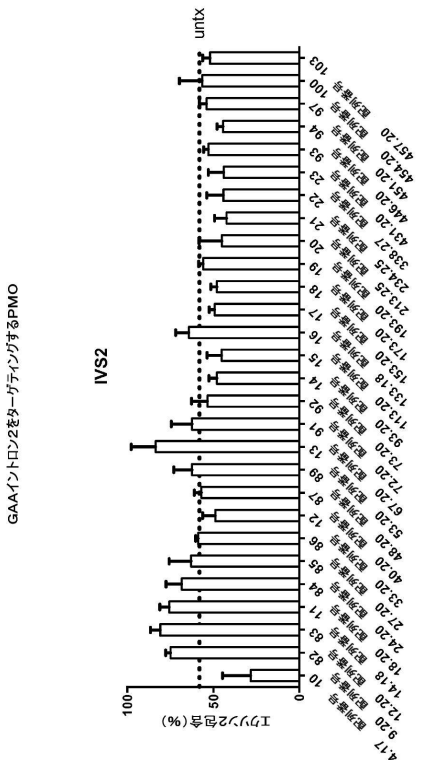


Fig. 4C

【配列表】

0006618910000001.app

## フロントページの続き

## 前置審査

- (74)代理人 100181674  
弁理士 飯田 貴敏
- (74)代理人 100181641  
弁理士 石川 大輔
- (74)代理人 230113332  
弁護士 山本 健策
- (72)発明者 ウィルトン, スティーブン ドナルド  
オーストラリア国 6150 ウェスタン オーストラリア, マードック, サウス ストリート 90
- (72)発明者 フレッチャー, スー  
オーストラリア国 6150 ウェスタン オーストラリア, マードック, サウス ストリート 90
- (72)発明者 ハンソン, ガンナー ジェイムズ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ファースト ストリート 215
- (72)発明者 ベストウィック, リチャード キース  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ファースト ストリート 215

審査官 小林 薫

- (56)参考文献 特表2013-515504(JP,A)  
特表2013-532965(JP,A)  
特開2013-049714(JP,A)  
特表2012-506698(JP,A)  
Hum. Mol. Genet., 1994, Vol.3, No.12, p.2231-2236, URL, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/3.12.2231>  
Nature, 2011, Vol.478, p.127-131
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 15/00 - 15/90  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)