

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-512501
(P2025-512501A)

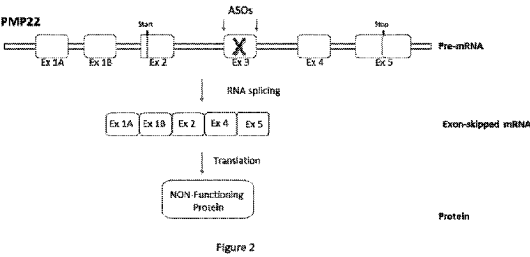
(43)公表日 令和7年4月17日(2025.4.17)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 P	19/34 (2006.01)	C 1 2 P	19/34	A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071		4 C 0 8 6
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全64頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-560756(P2024-560756)			(71)出願人	524377501
(86)(22)出願日	令和5年4月13日(2023.4.13)				シフト ファーマシューティカルズ ホールディング インク.
(85)翻訳文提出日	令和6年11月1日(2024.11.1)				Shift Pharmaceutical
(86)国際出願番号	PCT/US2023/065728				als Holding Inc.
(87)国際公開番号	WO2023/201300				アメリカ合衆国 65211 ミズーリ
(87)国際公開日	令和5年10月19日(2023.10.19)				コロンビア サウス プロヴィデンス ロード 1601
(31)優先権主張番号	63/331,044				1601 South Providence Rd, Columbia, MO
(32)優先日	令和4年4月14日(2022.4.14)				65211, United States of America
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(31)優先権主張番号	63/331,045				
(32)優先日	令和4年4月14日(2022.4.14)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(71)出願人	504238378
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ				ザ キュレイターズ オブ ザ ユニバーシティ オブ ミズーリ
			最終頁に続く		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 シャルコー・マリー・トゥース病に対するポリヌクレオチド治療

(57)【要約】

シャルコー・マリー・トゥース病（CMT）としても知られる遺伝性末梢神経障害は、神経系の最も一般的な遺伝性疾患の一つであり、およそ2500人に1人が罹患している。本開示は、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を用いてPMP22のプレmRNAを標的としてシャルコー・マリー・トゥース病（CMT）を治療する、その方法及び組成物を含む、治療戦略に関する



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を含む組成物であって、前記ASOが、PMP22のプレmRNAの標的領域に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、相補的領域を含むか又はそれらからなり、

細胞内で前記ASOの前記相補的領域が前記PMP22のプレmRNAの前記標的領域に結合することで、RNA転写時のエクソンスキッピングが誘導され、それによってPMP22の全長mRNAの産生が抑制され、PMP22のエクソンスキッピング済みmRNAが産生される、組成物。

10

【請求項 2】

前記ASOが、前記PMP22のプレmRNAの標的領域に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23又は24個の連続するヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなり、又は、

前記PMP22のプレmRNAの標的領域が、前記PMP22のプレmRNAの2つの別々のセグメントを含み、任意選択的に、前記ASOが、前記PMP22のプレmRNAの標的領域の連続した配列の第1のセグメントに対して相補的であるか、又は1、2若しくは3つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約6、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなり、前記ASOが、前記PMP22のプレmRNAの標的領域の連続した配列の第2のセグメントに対して相補的であるか、又は1、2若しくは3つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約6、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる、請求項1に記載の組成物。

20

【請求項 3】

前記ASOが、前記PMP22のプレmRNAの標的領域に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40又は45個のいずれかから約13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45又は50個のいずれかまでのヌクレオチドの相補的領域を含むか又は該相補的領域からなり、

30

任意選択的に、前記ASOが、前記PMP22のプレmRNAの標的領域に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25個のヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる、請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項 4】

前記ASOが、修飾及び／又は合成オリゴヌクレオチドであり、

任意選択的に、前記ASOが、ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー（PMO）である、請求項1から3のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 5】

下流エクソンが依然として発現されている、請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記エクソンスキッピングによって下流エクソンがフレーム外になる、請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記PMP22のプレmRNAの前記標的領域が、コーディングエクソンのうちの1つのイントロン／エクソンジャンクションにまたがり、

50

任意選択的に、前記イントロン／エクソンジャンクションのエクソン部分が、PMP 22のエクソン3を含み、及び／又は、

任意選択的に、前記イントロン／エクソンジャンクションのエクソン部分が、PMP 22のエクソン4を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

前記PMP 22のプレmRNAの前記標的領域が、エクソンの5'末端を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項9】

前記PMP 22のプレmRNAの前記標的領域が、エクソンの3'末端を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項10】

前記PMP 22のプレmRNAの前記標的領域が、前記イントロンの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドと前記エクソンの一部とを含むか又はそれらからなるイントロン／エクソンジャンクションにまたがり、

任意選択的に、前記PMP 22のプレmRNAの前記標的領域が、前記イントロンの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドと前記エクソンの一部とからなる、請求項7から9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項11】

前記PMP 22のプレmRNAの前記標的領域が、前記エクソンの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドと前記イントロンの一部とを含むか又はそれらからなるイントロン／エクソンジャンクションにまたがり、

20

任意選択的に、前記PMP 22のプレmRNAの前記標的領域が、前記エクソンの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドと前記イントロンの一部とからなる、請求項7から10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項12】

前記PMP 22のプレmRNAの標的領域が、SEQ ID NO: 2 (エクソン3、5'末端) SEQ ID NO: 35 (エクソン3、3'末端) SEQ ID NO: 76 (エクソン4、5'末端) SEQ ID NO: 111 (エクソン4、3'末端) SEQ ID NO: 163 (エクソン2、5'末端) 及び／又はSEQ ID NO: 198 (エクソン2、3'末端)、又は、その一部又はサブセット／断片を含むか又はこれらからなる、請求項1から11のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項13】

前記ASOが、SEQ ID NO: 2 (エクソン3、5'末端) SEQ ID NO: 35 (エクソン3、3'末端) SEQ ID NO: 76 (エクソン4、5'末端) SEQ ID NO: 111 (エクソン4、3'末端) 及び／又はSEQ ID NO: 163 (エクソン2、5'末端) 及び／又はSEQ ID NO: 198 (エクソン2、3'末端) に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、相補的領域を含むか又はそれらからなり、

任意選択的に、前記ASOが、SEQ ID NO: 3~34 (エクソン3、5'末端)、SEQ ID NO: 37~70 (エクソン3、3'末端)、SEQ ID NO: 77~110 (エクソン4、5'末端)、SEQ ID NO: 112~145 (エクソン4、3'末端)、SEQ ID NO: 164~197 (エクソン2、5'末端) 又はSEQ ID NO: 199~232 (エクソン2、3'末端) のヌクレオチド配列、又は、PMP 22のプレmRNAにハイブリダイズするのに十分なその断片を含むか又はそれらからなり、又は、

40

前記ASOが、1、2又は3つのヌクレオチド置換を有することを除いて、SEQ ID NO: 3~34 (エクソン3、5'末端)、SEQ ID NO: 37~70 (エクソン3、3'末端)、SEQ ID NO: 77~110 (エクソン4、5'末端)、SEQ ID NO: 112~145 (エクソン4、3'末端)、SEQ ID NO: 164~197 (エクソン2、5'末端) 又はSEQ ID NO: 199~232 (エクソン2、

50

3'末端)のヌクレオチド配列、又はPMP22のプレmRNAにハイブリダイズするのに十分なその断片を含むか又はそれらからなる、請求項12に記載の組成物。

【請求項14】

前記ASOが、

SEQ ID NO: 71 (SHC-006 25-mer)、
 SEQ ID NO: 72 (SHC-001 24-mer)、
 SEQ ID NO: 73 (SHC-005 25-mer)、
 SEQ ID NO: 74 (SHC-010 21-mer)、
 SEQ ID NO: 75 (SHC-012 20-mer)、
 SEQ ID NO: 146 (SHC-029 21-mer)、
 SEQ ID NO: 147 (SHC-028 20-mer)、
 SEQ ID NO: 148 (SHC-027 20-mer)、
 SEQ ID NO: 149 (SHC-031 21-mer)、
 SEQ ID NO: 150 (SHC-030 20-mer)、
 SEQ ID NO: 151 (SHC-032 20-mer)、
 SEQ ID NO: 156、
 SEQ ID NO: 159、
 SEQ ID NO: 162、
 SEQ ID NO: 235、又は

SEQ ID NO: 238の核酸配列を含むか又はそれらからなり、

あるいは、前記ASOが、1、2又は3つのヌクレオチド置換を有することを除いて、

SEQ ID NO: 71 (SHC-006 25-mer)、
 SEQ ID NO: 72 (SHC-001 24-mer)、
 SEQ ID NO: 73 (SHC-005 25-mer)、
 SEQ ID NO: 74 (SHC-010 21-mer)、
 SEQ ID NO: 75 (SHC-012 20-mer)、
 SEQ ID NO: 146 (SHC-029 21-mer)、
 SEQ ID NO: 147 (SHC-028 20-mer)、
 SEQ ID NO: 148 (SHC-027 20-mer)、
 SEQ ID NO: 149 (SHC-031 21-mer)、
 SEQ ID NO: 150 (SHC-030 20-mer)、
 SEQ ID NO: 151 (SHC-032 20-mer)、
 SEQ ID NO: 156、
 SEQ ID NO: 159、
 SEQ ID NO: 162、
 SEQ ID NO: 235、又は

SEQ ID NO: 238の、核酸配列を含むか又はそれらからなる、請求項1に記

載の組成物。

【請求項15】

細胞内でのPMP22の全長mRNAの発現量を減少させる方法であって、請求項1から14のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を含む組成物を前記細胞に投与すること、を含み、

任意選択的に、PMP22のエクソンスキッピング済みmRNAが産生され、及び／又は、

任意選択的に、前記細胞内で産生された機能性PMP22タンパク質の量が減少する、方法。

【請求項16】

前記ASOに応じて、前記細胞内でのPMP22の全長mRNAの量が、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%又は95%減少し、

及び／又は、

前記 A S O に応じて、前記細胞内での P M P 2 2 の m R N A の量が、約 2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 又は 9 5 % 以下減少する、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 A S O に応じて、前記細胞内での P M P 2 2 の全長 m R N A の量が、約 5 %、1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 % 又は 7 5 % のいずれかから約 2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 又は 9 5 % のいずれかまで減少する、請求項 1 5 又は 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 A S O に応じて、前記細胞内での機能性 P M P 2 2 タンパク質の量が、少なくとも約 5 %、1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 5 % 又は 9 5 % 減少し、

及び／又は、

前記 A S O に応じて、前記細胞内での機能性 P M P 2 2 タンパク質の量が、約 2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 又は 9 5 % 以下減少する、請求項 1 5 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 A S O に応じて、前記細胞内での機能性 P M P 2 2 タンパク質の量が、約 5 %、1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 % 又は 7 5 % のいずれかから約 2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 又は 9 5 % のいずれかまで減少する、請求項 1 7 又は 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

P M P 2 2 のプレ m R N A 内のイントロンとエクソンとの間のジャンクションを標的とすることを含む、請求項 1 5 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

P M P 2 2 のエクソンスキッピング済みプレ m R N A を産生する方法であって、請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド（A S O）を含む組成物を細胞に投与することを含む、方法。

【請求項 2 2】

前記細胞内での P M P 2 2 の全長 m R N A の発現量が減少し、
任意選択的に、前記細胞内で産生された機能性 P M P 2 2 タンパク質の量が減少する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記方法は、P M P 2 2 のプレ m R N A 内のイントロンとエクソンとの間のジャンクションを標的とすることを含む、請求項 2 1 又は 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

シャルコー・マリー・トゥース病を治療する方法であって、該治療を必要とする対象に、請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド（A S O）を含む組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 2 5】

前記 A S O が薬学的に許容される塩として投与される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 A S O が、薬学的に許容される担体又は希釈剤で投与される、請求項 2 4 又は 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記疾患の少なくとも 1 つの症状が軽減される、請求項 2 4 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記疾患の少なくとも 1 つの症状の進行速度が低下する、請求項 2 4 から 2 6 のいずれ

10

20

30

40

50

か一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記組成物を投与する投与計画が前記対象の年齢に基づく、請求項 24 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記組成物を投与する投与計画が、前記対象の症状の進行に基づく、請求項 24 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記組成物を投与する投与計画が、前記対象の総体重に基づく、請求項 24 から 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記組成物を投与する投与計画が、前記対象の身体能力に基づく、請求項 24 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

症状の重症度及び／又は年齢の高さに基づき、一定期間のあいだ対象に前記組成物の高い投与量又は負荷投与が与えられ、その投与量が後で低い投与量に変更される、請求項 24 から 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を含む組成物であって、前記 ASO が、PMP22 のプレ mRNA の標的領域に対して相補的であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、相補的領域を含むか又はそれらからなり、

前記 PMP22 のプレ mRNA の前記標的領域が、コーディングエクソンのうちの 1 つのイントロン／エクソンジャンクションを含む、組成物。

【請求項 35】

前記 ASO が、前記 PMP22 のプレ mRNA の標的領域に対して相補的であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 又は 24 個の連続するヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなり、又は、

前記 PMP22 のプレ mRNA の標的領域が、前記 PMP22 のプレ mRNA の 2 つの別々のセグメントを含み、任意選択的に、前記 ASO が、前記 PMP22 のプレ mRNA の標的領域の連続した配列の第 1 のセグメントに対して相補的であるか、又は 1、2 若しくは 3 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約 6、8、9、10、11 又は 12 個のヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなり、前記 ASO が、前記 PMP22 のプレ mRNA の標的領域の連続した配列の第 2 のセグメントに対して相補的であるか、又は 1、2 若しくは 3 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約 6、8、9、10、11 又は 12 個のヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 36】

前記 ASO が、前記 PMP22 のプレ mRNA の標的領域に対して相補的であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、約 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40 又は 45 個のいずれかから約 13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45 又は 50 個のいずれかまでの連続したヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなり、

任意選択的に、前記 ASO が、前記 PMP22 のプレ mRNA の標的領域に対して相補的であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25 個の連続したヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる、請求項 34 又は 35 に記載の組

10

20

30

40

50

成物。

【請求項 37】

前記イントロン／エクソンジャンクションのエクソン部分が、PMP22のエクソン3を含み、及び／又は、

前記イントロン／エクソンジャンクションのエクソン部分が、PMP22のエクソン4を含む、請求項34から36のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 38】

前記PMP22のプレmRNAの前記標的領域が、エクソンの3'末端を含む、請求項34から37のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 39】

前記PMP22のプレmRNAの前記標的領域が、エクソンの5'末端を含む、請求項34から37のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 40】

前記PMP22のプレmRNAの前記標的領域が、前記イントロンの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドと前記エクソンの一部とを含むイントロン／エクソンジャンクションを含み、

任意選択的に、前記PMP22のプレmRNAの前記標的領域が、前記イントロンの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドと前記エクソンの一部とを含むか又はそれらからなる、請求項34から39のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 41】

前記PMP22のプレmRNAの前記標的領域が、前記エクソンの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドと前記イントロンの一部とを含むイントロン／エクソンジャンクションを含み、

任意選択的に、前記PMP22のプレmRNAの前記標的領域が、前記エクソンの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11若しくは12個のヌクレオチドと前記イントロンの一部とを含むか又はそれらからなる、請求項34から40のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 42】

前記ASOが、修飾及び／又は合成オリゴヌクレオチドであり、

任意選択的に、前記ASOが、ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー（PMO）である、請求項34から41のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 43】

前記PMP22のプレmRNAの標的領域が、SEQ ID NO: 2（エクソン3、5'末端）SEQ ID NO: 35（エクソン3、3'末端）SEQ ID NO: 76（エクソン4、5'末端）SEQ ID NO: 111（エクソン4、3'末端）SEQ ID NO: 163（エクソン2、5'末端）及び／又はSEQ ID NO: 198（エクソン2、3'末端）を含むか又はそれらからなる、請求項34から42のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本国際出願は、2022年4月14日付の米国仮出願第63/331,044号及び2022年4月14日付の米国仮出願第63/331,045号の利益を主張し、いずれも全体を本明細書に取り入れたものとする。

【0002】

電子的に提出された配列表の参照

本願と共にST26形式で電子的に提出された配列表の内容（ファイル名：UMC_226824.xml；サイズ：242,797バイト；及び作成日：2023年4月13

10

20

30

40

50

日)は、参照をもって全体を本明細書に取り入れたものとする。

【0003】

本開示は、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) で PMP22 の mRNA を標的することとでシャルコー・マリー・トゥース病 (CMT) を治療する、そのための方法及び組成物を含む治療戦略に関する。

【背景技術】

【0004】

シャルコー・マリー・トゥース病 (CMT) としても知られる遺伝性末梢神経障害は、神経系の最も一般的な遺伝性疾患の一つであり、およそ 2500 人に 1 人が罹患している (Krajewski et al., 2000、Braathén, 2012)。CMT の最も一般的な型である CMT1A は、末梢ミエリタンパク質 22 (PMP22) 遺伝子 (SEQ ID NO: 1) の遺伝子重複によって引き起こされる脱髄性神経障害である (Patel et al., 1992、Timmerman et al., 1992、Valentijn et al., 1992、Matsunami et al., 1992)。PMP22 は、その名が示すように、軸索を取り囲むミエリン鞘の構造的な必須成分である (Lee et al., 2014、Mittendorf et al., 2017、Snipes et al., 1992)。機能的にみて、ミエリンは、軸索に沿った電気インパルスの効率的な伝達を促す生体絶縁体として機能する。CNS ではグリア細胞によってミエリンが産生されるのに対し、末梢神経系 (PNS) ではシュワン細胞 (SC) が PMP22 とミエリンの産生を担う。過剰な PMP22 は常染色体優性疾患の CMT1A の発症をもたらす。一方で、PMP22 の発現を十分に維持することも同じく重要である。なぜなら、PMP22 が減少すると、圧迫麻痺素因を伴う遺伝性神経障害 (HNPP) と呼ばれる明確な神経障害が生じるからである。まとめると、PMP22 はミエリン鞘の必須成分であり、この遺伝子の繊細な恒常性バランスを保つことが、効果的な治療薬の開発上最も重要となる。

【0005】

CMT の原因としては 90 を超える別々の遺伝子の変異が挙げられるが、その中で最も一般的なのは、CMT1A に分類されるヒト 17 番染色体の 1.4 Mb の重複である。主要なミエリタンパク質である末梢ミエリタンパク質 22 をコードする末梢ミエリタンパク質 22 (PMP22) 遺伝子が、その 1.4 Mb の重複区間内に存在している。PMP22 は、脂質の組織化／分布を変化させる、ミエリンの膜内在性タンパク質であり、シュワン細胞による末梢神経のミエリン形成開始時に、シュワン細胞内で誘導形成される。

【0006】

げっ歯類での研究から、PMP22 の過剰発現が脱髄性神経障害の十分な原因になることが立証されている (Magyar et al., 1996、Sereda et al., 1996、Huxley et al., 1996)。コンディショナルノックアウト POC 試験では、PMP22 の過剰発現の減少がミエリン再形成に繋がることが実証されている (Perea et al., 2001)。興味深いことに、同じ 1.4 Mb 領域を欠失させて PMP22 の対立遺伝子を喪失させると、圧迫麻痺を伴う遺伝性神経障害として知られる明確な神経障害を生じる (Chance et al., 1993) ことから、遺伝子量がこのような神経障害の決定的要因であることも確認された。最後に、CMT1A 患者では、真皮神経又は腓腹神経における PMP22 タンパク質レベルの上昇が確認されている。

【0007】

PMP22 発現を減少させるための手法が幾つか提案されてきたが、現在、患者に適用できる治療法はまだない。例えば、げっ歯類モデルでは、高用量のアスコルビン酸によって PMP22 の過剰発現を減少させることができる (Cortese et al., 2020)。しかし、臨床試験では、アスコルビン酸による処置で CMT1A 患者の皮膚生検の PMP22 の mRNA レベルは低下しなかった (Eichinger et al.,

、2018、Gautier et al.、2021、Kagiava et al.、2018）。プロゲステロンアンタゴニスト及びGABABアゴニストも、PMP22のmRNA発現を低下させることが確認されている（Lee et al.、2020、Massade及びCharbel、2020）。しかし、シュワン細胞及び恐らくその他の細胞種の遺伝子発現制御に様々な影響を及ぼすことから、遺伝性疾患の長期治療を複雑にする可能性があり、有望性は低い。

【0008】

CMT1Aは、単一遺伝子疾患である。この病の遺伝子は、特定済みである。PMP22の発現は、様々な分子機序によって阻害が可能である。これまでに、2'-O-2-メトキシエチルホスホロチオエート系骨格（2'MOE）ASOのパネルが、PMP22の発現を妨げる手段として開発分析された（Zhao et al.、2018）。Zhao et al.によるこの報告では、K-562細胞及びC22トランスジェニックマウスモデルなどの幾つかの重要な細胞状況及び生体内状況でPMP22の発現を低下させるASOが同定された。重要なのは、ヒトPMP22遺伝子の存在が、これらの各実験状況の前提となっているという点である。C22マウスでは、ASOで治療するとPMP22の発現が減少し、神経細胞病態、ミエリン形成度、及びCMAP/MNCVなどのCMT表現型が大幅に改善した。

【0009】

PMP22のRNA翻訳を改変させる手法としては、その他にも、ヒトPMP22遺伝子の3'UTRに干渉する分子を形成させてプロセス全体をロックダウンさせる手法が提案されている（例えば、www.jci.org/articles/view/96499のワールドワイドウェブ、米国特許第11,136,577号）。特許出願WO2020/132558 A1には、RNAの標的部分へのハイブリダイズを強化させるとともにRNase H切断を誘導して遺伝子サイレンシングを行うギャップマーの使用が記載されている。

【0010】

これらの手法には、ゲノムサイクルのある段階でPMP22の全長RNAの発現を完全に排除するか又はこのRNAを破壊するという共通点がある。このような手法は効果的であり得るものの、患者に過剰量の薬剤を過剰投与すると、PMP22を過度に除去した上記の場合のように二次疾患及び二次症状に繋がる可能性がある。

【0011】

したがって、CMT病の効果的な治療法の開発が依然として所望されている。

【0012】

発明の概要

本開示は、エクソンスプライシングに関係するヒトPMP22のプレmRNAの領域に結合する分子（小分子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗体など）に関する。分子は、スプライシング前にプレmRNAのこれらの重要な領域の1つ（又は複数）の重要な領域に結合して翻訳／転写時にエクソンスキッピングイベントを誘導する結果、全長バージョンの天然mRNAと似ているが1つ以上のエクソン又はその一部が欠落しているmRNAを産生する。得られるエクソンスキッピング済みmRNAは、生体外でも生体内でもインサイチュでも安定しており且つ測定可能である。

【0013】

本明細書では、PMP22のプレmRNAの標的領域に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、相補的領域を含むか又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を含む組成物を提供する。特定の実施形態では、細胞内でASOの相補的領域がPMP22のプレmRNAの標的領域に結合することで、RNA転写時のエクソンスキッピングが誘導される。特定の実施形態では、エクソンスキッピングの誘導により、PMP22の全長mRNAの産生が減少する。特定の実施形態では、エクソンスキッピングの誘導により、PMP22のエクソンスキッピング済みmRNAが産生される。

【0014】

本明細書では、さらに、細胞内でのPMP22の全長mRNAの発現量を減少させる方法を提供する。このような方法は、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を含むエクソンスキッピング誘導組成物を細胞に投与することを含む。特定の実施形態では、PMP22のエクソンスキッピング済みmRNAが産生される。特定の実施形態では、細胞内で産生されたPMP22のタンパク質の量が減少する。

【0015】

本明細書では、さらに、PMP22のエクソンスキッピング済みプレmRNAを産生する方法を提供する。このような方法は、本開示の任意のアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を含むエクソンスキッピング誘導組成物を細胞に投与することを含む。特定の実施形態では、細胞内でのPMP22の全長mRNAの発現量が減少する。特定の実施形態では、細胞内で産生された機能性PMP22タンパク質の量が減少する。

【0016】

本明細書では、さらに、シャルコー・マリー・トゥース病を治療する方法を提供する。このような方法は、該方法を必要とする対象に、本開示の任意のアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を含むエクソンスキッピング誘導組成物を投与することを含む。

【0017】

本明細書では、さらに、PMP22のプレmRNAの標的領域に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、相補的領域を含むか又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を含む組成物を提供する。特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、コーディングエクソンのうちの1つのイントロン／エクソンジャンクションを含む。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】PMP22のプレmRNA(上図)から、エクソンをコードする全てのアミノ酸を含む全長mRNA(中央図)と機能性タンパク質(下図)とになる様子を示す図であり、各エクソン間のイントロンは横方向の二重線で示されており、その塩基対配列はスプライシング時に除去される。

【図2】プレmRNAの一部にハイブリダイズして該プレmRNAからmRNAへの変換時にスキッピングイベントを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を投入した場合のPMP22遺伝子プロセスを示す図であり、細胞内でエクソンスキッピングアンチセンスオリゴヌクレオチドがRNA転写時に存在していると、スキッピング済みエクソン産物が形成されて非機能性タンパク質が生じる。

【図3】(A)、(B)及び(C)は、スプライシング時のプレmRNAの構造変化を示す模式図である。

【図4】(A)、(B)、(C)及び(D)は、プレmRNAに結合してエクソンスキッピングを誘導する複数の戦略を示す概略図である。

【図5A】PMP22遺伝子のエクソン3の5'領域周辺の配列(全て大文字)、ならびに対応する上流イントロンを示し、該エクソンの5'末端であり、かつ、プレmRNAからmRNAへの変換時にエクソン3のスキッピングを引き起こし得る、本開示の複数の異なる代表的な25merオリゴヌクレオチドASO配列(上部の配列の下)を示す図であり、本開示の配列を含み(あるいは、本明細書で提示する任意のミスマッチを含み)標的領域又は標的領域の一部にハイブリダイズするのであれば、最終的なASO方法が、当業者にとって様々な方法(固相及び液相の両方、かつ、例えば、5'から3'への方向性、又は3'から5'への方向性)が利用可能である。イントロン／エクソンジャンクションに結合するように設計(かつ合成)された、データ提示対象である3種類の代表的なモルフォリノアンチセンスオリゴ配列が描かれている。SEQ ID NO: 2~34、SHC-006 25-mer (SEQ ID NO: 71)、SHC-001 24-mer (SEQ ID NO: 72)、SHC-005 25-mer (SEQ ID NO: 73)。

10

20

30

40

50

【図5B】PMP22遺伝子のエクソン3の3' - 領域周辺の配列（全て大文字）、ならびに対応する下流イントロンを示し、該エクソンの3' 末端であり、かつ、プレmRNAからmRNAへの変換時にエクソン3のスキッピングを引き起こし得る、本開示の複数の異なる代表的な25mer-オリゴヌクレオチドASO配列（上部の配列の下）を示す図であり、本開示の配列を含み（あるいは、本明細書で提示する任意のミスマッチを含み）標的領域又は標的領域の一部にハイブリダイズするのであれば、最終的なASO方法が、当業者にとって様々な方法（固相及び液相の両方、かつ、例えば、5' から3' への方向性、又は3' から5' への方向性）が利用可能である。イントロン／エクソングジャンクションに結合するように設計（かつ合成）された、データ提示対象である3種類の代表的なモルフォリノアンチセンスオリゴ配列が描かれている。SEQ ID NO: 35~70、SCH-010 21-mer (SEQ ID NO: 74)、SCH-012 20-mer (SEQ ID NO: 75)。

10

【図6】図5から選ばれたエクソン3スキッピングASOに対する、PCR増幅、さらに、ゲル電気泳動分析を行った結果を示す図であり、スクランブル注射（PMP22のプレmRNA又はmRNAに対して影響を及ぼさない）対照も示されている。

【図7】SHC-012 (SEQ ID NO: 75)、スクランブル (2x) ASO又は水対照で処置したC3マウス（肝臓）のRT-PCRを示す図であり、GAPDH対照に加えてヒトPMP22の全長mRNAも検出可能であり、SHC-012により誘導されたエクソン3スキッピング（配列により確認）が図示のとおり起こっている。

【図8】SHC-012 (SEQ ID NO: 75) を1回皮下注射した後の複数の組織のPCR結果（ならびにPMP22の全長mRNA量の対応する変化）を示す図であり（動物は2日後に 殺された）、同図のデータは、残存率を表し、具体的には、組織種別ごとに、各組織種別のPMP22の全長mRNAの総量を定量化してSHC-012動物と比較し、残存率が20%とは、プレmRNAの80%が全長mRNAの構築を阻害されてエクソンスキッピング済みmRNAとなったことを表している。

20

【図9】種々の治療群（SHC-012; SEQ ID NO: 75を適用）、スクランブル動物及び野生型マウスが、ダボ装置上を歩くのにかかる時間量を示す図であり、全ての群に関して、各群には3匹の動物が含まれており、ヒストグラムは平均値と標準偏差を表しており、各治療群について（スクランブル対照に対する信頼レベルを求めるための）P値を算出しており（全群で $p < 0.05$ ）、いずれのデータも、12週齢の各動物を平均した値である。

30

【図10】5週齢で1度目の注射を行ったスクランブル群、野生型群及び治療群が、ロータロッド装置上で費やした時間量を示す図であり、全ての群に関して、各群には3匹の動物が含まれており、ヒストグラムは平均値と標準偏差を表しており、各治療群について（スクランブル対照に対する信頼レベルを求めるための）P値を算出・示しており、いずれのデータも、12週齢の各動物を平均した値である。

【図11A】PMP22遺伝子のエクソン4の5' - 領域周辺の配列（全て大文字）、ならびに対応する上流イントロンを示し、該エクソンの5' 末端であり、プレmRNAからmRNAへの変換時にエクソン4のスキッピングを引き起こし得る、本開示の複数の異なる25mer-オリゴヌクレオチドASO配列（上部の配列の下）を示す図であり、イントロン／エクソングジャンクションに結合するように設計（かつ合成）された、データ提示対象である3種類の代表的なモルフォリノアンチセンスオリゴ配列が描かれている。SEQ ID NO: 76~110、SHC-029 21-mer (SEQ ID NO: 146)、SHC-028 20-mer (SEQ ID NO: 147)、SHC-027 20-mer (SEQ ID NO: 148)。

40

【図11B】PMP22遺伝子のエクソン4の3' - 領域周辺の配列（全て大文字）、ならびに対応する下流イントロンを示し、該エクソンの3' 末端であり、プレmRNAからmRNAへの変換時にエクソン4のスキッピングを引き起こし得る、本開示の複数の異なる25mer-オリゴヌクレオチドASO配列（上部の配列の下）を示す図であり、イントロン／エクソングジャンクションに結合するように設計（かつ合成）された、データ提示

50

対象である3種類の代表的なモルフォリノアンチセンスオリゴ配列が描かれている。SEQ ID NO: 111~145、SCH-031 21-mer (SEQ ID NO: 149)、SCH-030 20-mer (SEQ ID NO: 150)、SCH-030 20-mer (SEQ ID NO: 151)。

【図12】図11から選ばれたエクソン4スキッピングASOに対する、PCR増幅、さらに、ゲル電気泳動分析を行った結果を示す図である。

【図13】エクソン4スキッピング化合物のうちの3つについてのゲル結果からの、2つの異なる手法による定量化結果を示す図である。

【図14】エクソン3の5'末端及び3'末端(上部)と、標的領域を架橋するように設計され試験された3つの異なるASO化合物(それぞれ図示)を示す図であり、エクソンのこのようなASO標的領域は、非連続であり、プレmRNAの立体構造に対し、前述のものとは異なる影響を及ぼす。SEQ ID NO: 152~162及びSEQ ID NO: 233~238、SHC-043 (SEQ ID NO: 156)、SHC-044 (SEQ ID NO: 159)、SHC-045 (SEQ ID NO: 162)、SHC-046 (SEQ ID NO: 235)、SHC-047 (SEQ ID NO: 238)。

【図15】図14から選ばれたエクソン3スキッピングASOに対するPCR増幅とそれに続くゲル電気泳動分析の結果を示す図である。

【図16A】PMP22遺伝子のエクソン2の5'-領域周辺の配列(全て大文字)、ならびに対応する上流イントロンを示す図であり、該エクソンの3'末端である。SEQ ID NO: 163~197。

【図16B】PMP22遺伝子のエクソン2の3'-領域周辺の配列(全て大文字)、ならびに対応する下流イントロンを示す図であり、該エクソンの5'末端である。SEQ ID NO: 198~232。

【図17】WT動物、未処置動物及び処置後動物の坐骨神経の画像(上部)、ならびに該神経の腓骨部分の画像(下部)を示す図である。

【図18】腓骨神経の一部の高倍率TEM画像を示す図である。

【図19】(上部)鎮静状態のマウスの坐骨胃切片の電気生理学的プロットを示し、(下部)各群の3匹の測定対象動物のMUNE及びCMAPの平均値を示す。

【図20】治療群の結果を示す図であり(4か月齢での比較のためにスクランブル動物の群と野生型動物も示している)、ヒストグラムの各データセットは、各月末の4日間のダボ歩行時間の平均値である。

【図21】ダボ歩行時間実験の結果を示す図である(比較のために3か月齢の野生型動物もプロットしている)。

【発明を実施するための形態】

【0019】

定義

添付の特許請求の範囲の主題及び／又は文言の全体は、説明の補助が必要な範囲で、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0020】

本記載の説明を読めば、本明細書で説明して請求する例示的な実施形態は、本明細書で詳細に開示されているか又は開示されていない特徴、エレメント又は過程が欠けていたとしても適宜実施され得るということが、誰でも分かるであろう。

【0021】

特記しない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本開示に係る当業者が一般的に理解する意味と同じ意味を持つものとする。

【0022】

なお、「a」や「an」という用語は、1つ以上を指すものとする。例えば、「a compound (化合物)」は、1つ以上の化合物を表すものと理解されたい。つまり、本明細書において「a」(又は、「an」)、「one or more (1つ以上)」

10

20

30

40

50

及び「at least one（少なくとも1）」という用語は、互換的に使用され得る。

【0023】

また、本明細書で使用する「及び／または」は、対象の各構成又は構成要素についての、他方を伴っていても伴ってなくてもよいという具体的な開示であると捉えられたい。つまり、本明細書で「A及び／又はB」などの語句で使用される「及び／又は」という用語には、「A及びB」、「A又はB」、「A（単独）」、及び「B（単独）」が包含されているものとする。同様に、「A、B及び／又はC」などの語句で使用される「及び／又は」という用語には、A、B及びC、A、B又はC、A又はC、A又はB、B又はC、A及びC、A及びB、B及びC、A（単独）、B（単独）、さらには、C（単独）の、各実施形態が包含されているものとする。

10

【0024】

態様が、「含む（comprising）」という用語で本明細書に記載されるいかなる場合も、「からなる（consisting of）」及び／又は「から本質的になる（consisting essentially of）」という用語で記載される別法の類似の態様もまた提供されることが理解される。

【0025】

数値範囲は、範囲の規定値を含んでいる。1、2、3又は4などのように、値を列挙している場合、「及びその間の任意の範囲」などにより明確に記載されていなくても、それらの値の間の、例えば1～3、1～4、2～4等の任意の範囲も、本開示に具体的に含まれているものとする。

20

【0026】

本明細書に設けている表題は、単に参照し易くするためのものに過ぎず、様々な態様や本開示の態様を限定するものではなく、これらの態様は、本明細書全体を参考にすることで理解できるようになるものである。つまり、直後から述べる用語は、本明細書全体を参照することで、より十分に定義される。

【0027】

本明細書で使用されるように、本明細書に開示されるアミノ酸配列又はヌクレオチド配列との「同一性」、例えば、「同一性パーセント」という用語は、2つ以上のヌクレオチド配列間又は2つ以上のアミノ酸配列間の関係を指している。ある配列内の位置が、比較する配列における対応する位置の同じ核酸塩基又はアミノ酸によって占められる場合、これらの配列は、該位置について「同一」であると言える。「配列同一」率は、双方の配列において同じ核酸塩基又はアミノ酸が現れた位置の数を求めて「同一」の位置の数を得ることによって算出される。次に、「同一」の位置の数に比較範囲内の総位置数で割ったものに100を掛けることにより、「配列同一」率が得られる。「配列同一」率は、最適なアライメントを行った2つの配列同士を、比較範囲にわたって比較することで求められる。比較目的で配列同士を最適にアライメントするために、参照配列が一定のままである場合に、比較範囲内のヌクレオチド又はアミノ酸配列の一部にギャップと呼ばれる付加又は欠失が含まれていてもよい。最適なアライメントとは、ギャップがあつたとしても、参照配列と、比較する配列との間に、最大限多くの「同一」位置が生じるアライメントのことである。2つの配列間の「配列同一」率は、例えば、米国国立生物工学情報センターから入手可能な「BLAST」プログラム等を用いて求めることができ、このプログラムは、Karlin及びAltschul（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90（12）：5873－5877，1993）のアルゴリズムに基づく（ヌクレオチド配列比較用の）BLASTNプログラムと（アミノ酸配列比較用の）BLASTPプログラムとを統合したものである。

30

40

【0028】

本明細書で使用する「ポリペプチド」という用語には、単数形の「ポリペプチド」と複数形の「ポリペプチド」とが包含されているものとし、（ペプチド結合としても知られる）アミド結合によって直線状に繋がった単量体（アミノ酸）からなる分子を指す。「ポリ

50

ペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸の任意の鎖を指し、産物の特定の長さ指すものではない。つまり、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、又は2つ以上のアミノ酸の鎖を指すのに用いられる他の任意の用語が、「ポリペプチド」の定義の中に含まれ、「ポリペプチド」という用語は、これらの用語のいずれかの代わりにも、又はこれらの用語のいずれかと互換的にも、使用することができる。「ポリペプチド」という用語は、さらに、ポリペプチドの、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護／封鎖基による誘導体化、タンパク質分解による切断、非標準的なアミノ酸による修飾を含むが、これらに限定されない発現後修飾の産物も指しているものとする。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源に由来するものであってもよいし、組換え技術によって産生されたものであってもよいが、必ずしも特定の核酸配列から翻訳されるものとは限らない。それは、化学合成などの、あらゆる手法で生成されてもよい。

10

【0029】

本明細書で使用される「タンパク質」とは、単一ポリペプチド、すなわち、先に定義した単一アミノ酸鎖を指し得るが、例えば、ジスルフィド結合、水素結合、又は疎水性相互作用で会合して多量体タンパク質を産生する2つ以上のポリペプチドを指してもよい。

【0030】

「単離」されたポリペプチド、又はその断片、変異体若しくは誘導体などは、その自然環境にないポリペプチドを指す。特定のレベルの精製は必須でない。例えば、単離されたポリペプチドは、天然又は自然環境から取り出すことができる。本明細書の開示において、宿主細胞内で発現される、組換え的に産生されたポリペプチド及びタンパク質は、任意の適切な技術によって分離、分画又は部分精製若しくは実質精製された組換えポリペプチドと同じく、単離されたものであるとみなされる。

20

【0031】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単数の核酸と複数の核酸とを含むものとし、単離された核酸分子又は構築体、例えば、プレメッセンジャーRNA（pre-mRNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、又はプラスミドDNA（pDNA）のことをいう。ポリヌクレオチドは、一般的なホスホジエステル結合、又は一般的でない結合（例えば、ペプチド核酸（PNA）に見られるようなアミド結合等）を含み得る。「核酸」という用語は、ポリヌクレオチド内に存在する任意の1つ以上の核酸セグメント、例えば、DNA又はRNA断片のことをいう。「単離」された核酸又はポリヌクレオチドとは、その天然環境から取り出された核酸分子、DNA又はRNAを意味する。本明細書の開示において、例えば、ベクター内に含まれるポリペプチドサブユニットをコードする組換えポリヌクレオチドは、単離されたものであるとみなされる。単離されたポリヌクレオチドのその他の例としては、異種宿主細胞内に維持されている組換えポリヌクレオチド、又は溶液中で（部分的又は実質的に）精製されたポリヌクレオチドが挙げられる。単離されたRNA分子としては、ポリヌクレオチドの生体内又は生体外RNA転写物が挙げられる。また、単離されたポリヌクレオチド又は核酸としては、合成的に産生されたこれらの分子が挙げられる。また、ポリヌクレオチド又は核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーターなどの調節エレメントであってもよいし、それらを備えてもよい。

30

40

【0032】

本明細書で使用する「コード領域」とは、核酸のうち、アミノ酸に翻訳されるコドンを含む一部のことである。「停止コドン」（TAG、TGA又はTAA）は、アミノ酸に翻訳されないものの、コード領域の一部であるとみなすことができるが、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロンなどの隣接配列は、コード領域の一部としない。単一ポリヌクレオチド構築物、例えば、単一ベクター、又は別々のポリヌクレオチド構築物、例えば、別々の（異なる）ベクター、にわたって、2つ以上のコード領域が存在していてもよい。また、任意のベクターは、単一のコード領域を含むものであっても2つ以上のコード領域を含むものであってもよく、例えば、単一のベクターは、選択マーカー遺伝子と目的遺伝子とを別々にコードすることができる。また、ベク

50

一、ポリヌクレオチド又は核酸は、本明細書に提供されるポリペプチドサブユニット又は融合タンパク質をコードする核酸に融合しているか又は融合していない異種コード領域をコードすることができる。異種コード領域としては、分泌シグナルペプチド又は異種機能ドメインなどの特殊なエレメント又はモチーフが挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

本明細書で使用する「エクソン」とは、DNA配列又はRNA配列における、アミノ酸配列が合成される部分のことをいう。

【0034】

本明細書で使用する「イントロン」とは、DNA配列又はRNA配列における、アミノ酸配列が合成されない部分のことをいう。

【0035】

特定の態様において、ポリヌクレオチド又は核酸はDNAである。DNAの場合、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、通常、1つ以上のコード領域と作動可能に関連付けられたプロモーター及び／又はその他の転写若しくは翻訳調節エレメントを含んでいてもよい。作動可能な関連付け又は連結としては、遺伝子産物、例えば、ポリペプチドのコード領域が、遺伝子産物の発現が調節配列の影響又は制御を受けるように、1つ以上の調節配列と関連付けられうる場合が挙げられる。2つのDNA断片（例えば、ポリペプチドコード領域と、それに関連付けられるプロモーター）は、プロモーター機能の誘導により、所望の遺伝子産物をコードするmRNAの転写が生じる場合、及びそれら2つのDNA断片の連結の性質が、発現調節配列が遺伝子産物の発現を導く能力を妨げないか、又はDNAテンプレートの転写能力を妨げない場合、「作動可能に関連付け」又は「作動可能に連結」されている。つまり、ポリペプチドをコードする核酸の転写に影響を与えることができるプロモーターであれば、プロモーター領域と該核酸は作動可能に関連付けられていることになる。プロモーターは、所定の細胞内でのみDNAの実質的な転写を導く細胞特異的プロモーターの場合もある。プロモーター以外の他の転写調節エレメント、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、転写終結シグナルなども、ポリヌクレオチドと作動可能に関連付けられて細胞特異的転写を導くものであり得る。

【0036】

様々な転写調節領域が当業者に知られている。それらは、脊椎動物細胞で機能する転写調節領域を含むが、これらに限定されず、このような転写調節領域としては、サイトメガロウイルス（イントロンAと協働する最初期プロモーター）、シミアンウイルス40（初期プロモーター）、及び（ラウス肉腫ウイルスなどの）レトロウイルスに由来するプロモーター及びエンハンサーセグメントが挙げられるが、これらに限定されない。転写調節領域としては、その他にも、脊椎動物遺伝子に由来するアクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン、ウサギのβグロビンなどや、真核細胞の遺伝子発現を制御することのできる他の配列が挙げられる。適切な転写調節領域としては、さらに、組織特異的プロモーター及びエンハンサーが挙げられる。

【0037】

同様に、様々な翻訳調節エレメントも当業者に知られている。リボソーム結合部位、翻訳開始コドン及び翻訳終止コドン、ピコルナウイルス由来のエレメント（特に、CITE配列とも呼ばれる配列内リボソーム進入部位、又はIRES）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0038】

他の態様において、ポリヌクレオチドは、例えば、プレmRNA又はメッセンジャーRNA（mRNA）の形態のRNAであり得る。

【0039】

ポリヌクレオチド及び核酸コード領域は、本明細書で開示するポリヌクレオチドでコードされたポリペプチドの分泌を導く分泌ペプチド又はシグナルペプチドをコードする追加のコード領域と関連付けられ得る。シグナル仮説によれば、哺乳動物細胞から分泌されるタンパク質はシグナルペプチド又は分泌リーダー配列を有しており、成長途中のタンパク

10

20

30

40

50

質鎖の粗面小胞体からの輸送が始まると、そのようなシグナルペプチド又は分泌リーダーペプチドは成熟タンパク質から切断される。当業者であれば分かるように、脊椎動物細胞から分泌されるポリペプチドは、通常、ポリペプチドのN末端に融合するシグナルペプチドを有し、それらは、完全又は「全長」ポリペプチドから切断されて、分泌形態又は「成熟」形態のポリペプチドを産生する。特定の態様では、天然シグナルペプチド、又はポリペプチドと作動可能に関連付けられることで該ポリペプチドの分泌を導くという同シグナルペプチドの能力を保持した、その配列の機能的誘導体が使用される。あるいは、異種哺乳類シグナルペプチド、又はその機能的誘導体が使用されてもよい。例えば、野生型リーダー配列を、ヒト組織プラスミノゲンアクチベーター（TPA）又はマウスβ-グルクロニダーゼのリーダー配列に置き換えてもよい。

10

【0040】

「ベクター」とは、宿主細胞に導入されることで、形質転換された宿主細胞を産生する核酸分子のことである。ベクターは、宿主細胞内での自身の複製を可能にする核酸配列、例えば、複製起点を含み得る。また、ベクターは、1つ以上の選択可能なマーカー遺伝子及び当技術分野で知られているその他の遺伝因子を有し得る。ベクターの種類の一例としては、プラスミド、ファージ、ウイルス及びレトロウイルスが挙げられる。

【0041】

「形質転換」細胞、又は「宿主」細胞とは、分子生物学技術によって核酸分子が導入された細胞のことである。本明細書で使用する形質転換という用語には、核酸分子をそのような細胞に導入することのできる、ウイルスベクターによるトランスフェクション、プラスミドベクターによる形質転換、ならびにエレクトロポレーション、リポフェクション、及びパーティクルガン加速法による裸のDNAの導入などの技術が包含される。形質転換細胞、又は宿主細胞は、細菌細胞又は真核細胞であり得る。

20

【0042】

本明細書で使用する「発現」という用語は、遺伝子が、生化学物質、例えば、ポリペプチドを産生する過程のことをいう。この過程としては、遺伝子の機能的存在の、遺伝子のノックダウン、一過性発現、安定した発現を含むが、これらに限定されない、細胞内でのあらゆるかたちの出現が挙げられる。遺伝子からmRNA及びメッセンジャーRNA（mRNA）への転写、ならびにそのようなmRNAからポリペプチド（複数可）への翻訳が含まれるが、これらに限定されない。最終的な所望の産物が生化学物質である場合、その生化学物質及びあらゆる前駆体の生成が、発現に含まれることになる。遺伝子の発現により、「遺伝子産物」が産生される。本明細書で使用する遺伝子産物とは、核酸、例えば、遺伝子の転写によって産生されるメッセンジャーRNA、又は転写物から翻訳されたポリペプチドのいずれでもあり得る。本明細書で説明される遺伝子産物としては、その他にも、転写後修飾、例えば、ポリアデニル化を経た核酸、又は翻訳後修飾、例えば、メチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットとの会合、タンパク質分解による切断を経たポリペプチドが挙げられる。

30

【0043】

本明細書で使用する「操作された」という用語には、合成手段（例えば、組換え技術、生体外ペプチド合成、ペプチドの酵素カップリング若しくは化学カップリング、又はこれらの技術の任意の組合せ等）による核酸分子又はポリペプチド分子の操作が包含される。

40

【0044】

「医薬組成物」という用語は、対象に投与するのに適した調製物又は混合物質、すなわち、有効成分の生体内活性を活性化させることのできる形態の調製物又は混合物質であって、組成物が投与され得る対象に対して許容できないほど毒性を示す成分を追加で含有しない調製物又は混合物質のことをいう。このような組成物は、無菌性であり得る。例えば、医薬組成物は、オリゴマー化合物と滅菌水溶液とを含有したものであり得る。

【0045】

本明細書で使用する「薬学的に許容される担体又は希釈剤」は、投与に適したものである。このような担体としては、医薬組成物を、例えば、対象によって経口摂取される錠剤

50

、丸剤、糖衣錠剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤、トローチ剤等として製剤化させることが可能なものが挙げられる。特定の実施形態では、薬学的に許容される担体又は希釈剤が、滅菌水、滅菌生理食塩水、滅菌緩衝液又は滅菌人工脳脊髄液である。

【0046】

本明細書で使用する「薬学的に許容される塩」とは、化合物の、生理学的に且つ薬学的に許容される塩のことである。薬学的に許容される塩とは、元の化合物の望ましい生体内活性を維持するとともに、望ましくない毒性作用を付加しない塩のことである。

【0047】

本明細書で使用する「アンチセンス化合物」とは、少なくとも1つのアンチセンス活性を実現することが可能な化合物のことである。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、さらには、場合によって、複合基（conjugate group）又は末端基などの1つ以上の追加の構造物を有する。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、（糖及び／又はリン酸骨格の改変物などの）自然に存在しない骨格構造を含むように操作かつ合成されたものである。特定の実施形態では、アンチセンス化合物が、モルフォリノ骨格を有する。

【0048】

本明細書で使用する「アンチセンス活性」とは、アンチセンス化合物による、その標的核酸へのハイブリダイゼーションに起因した、検出可能な及び／又は測定可能なあらゆる変化のことを意味する。ある特定の実施形態では、アンチセンス活性とは、アンチセンス化合物が存在しない中での標的核酸レベル又は標的タンパク質レベルと比較して、そのような標的核酸によりコードされる標的核酸又はタンパク質の量又は発現が低減することである。

【0049】

本開示の目的上、完全ヒトPMP22遺伝子をカリフォルニア大学サンタクルーズ校 genome.ucsc.edu データベースからダウンロードした。図面に示すように、標準命名法にならって、ゲノムのイントロン、又は非コード部分の配列領域は、小文字で記載している。アミノ酸をコードする配列の領域は、大文字で記載している。使用したデータベース及び図面に示した対応する配列については、上記のUCSCのデータベースを使用し、Human Assembly Dec. 2013（GRCh38/hg38）からタンパク質コーディングオプションで配列をダウンロードするという選択肢を選んだ。他のデータベースが許容可能かつ利用可能であるか、又は場合、わずかな配列の変異があるが、許容可能かつ利用可能になった場合、当業者であれば、この説明にそれらの変異が含まれることを理解するであろう。

【0050】

本明細書で使用する、オリゴヌクレオチドについての「相補（的）」という用語は、2本の一本鎖核酸又は一本鎖の一部が、相補的な塩基同士の水素結合により、二本鎖配列へとハイブリダイズできることを指す。相補的な塩基同士としては、アデニン（A）とチミン（T）、アデニン（A）とウラシル（U）、シトシン（C）とグアニン（G）、及び5-メチルシトシン（mC）とグアニン（G）が挙げられる。相補的なオリゴヌクレオチド同士及び／又は核酸同士は、全ての位置で相補的である必要はない。多少のミスマッチは、許容される。本明細書で使用する、オリゴヌクレオチドについての「完全に相補的」又は「100%相補的」とは、2つのオリゴ鎖が、全ての対応する位置に相補的な塩基を有していることを意味する。特定の実施形態では、相補的なオリゴヌクレオチド同士の、全ての対応する位置の塩基のうち、相補的な塩基は70%以上しかない。

【0051】

本明細書で使用する「ハイブリダイゼーション」、ハイブリダイズなどは、相補的なオリゴヌクレオチド同士及び／又は核酸同士の、対合又はアニーリングのことを意味する。最も一般的なハイブリダイゼーションのメカニズムは、特定のメカニズムに限定されず水素結合を伴うものであり、このような水素結合としては、相補的なヌクレオチド間での、

ワトソン・クリック型、フーグスティーン型又は逆フーグスティーン型の結合が挙げられる。

【0052】

本明細書で使用する「オリゴマー化合物」は、オリゴヌクレオチドのことを意味し、複合基、末端基などの1つ以上の追加の構造物があってもよい。オリゴマー化合物は、第1のオリゴマー化合物に対して相補的な第2のオリゴマー化合物と対合する場合もあれば、対合しない場合もある。「一本鎖オリゴマー化合物」とは、対合していないオリゴマー化合物のことである。「オリゴマー二本鎖」という用語は、相補的な核酸塩基配列を有する2つのオリゴマー化合物により形成された二本鎖のことを意味する。オリゴマー二本鎖の各オリゴマー化合物は、「二本鎖オリゴマー化合物」と呼ぶ場合がある。

10

【0053】

本明細書で使用する「エクソンスキッピング」とは、あるエクソンの全体又はあるエクソンの一部を飛ばすことであり得る。

【0054】

本明細書で使用する「エクソンスキッピング化合物」とは、プレmRNA種に結合し、安定で測定可能であるが全長ではないmRNA（すなわち、エクソンスキッピング済みmRNA）の転写を誘導するあらゆる化合物のことである。

【0055】

遺伝子又は遺伝子座は、特定の参照配列、例えば、ヒトPMP22遺伝子（SEQ ID NO: 1）によって特定され得るが、参照配列に対応する遺伝子は、配列上の様々な対立遺伝子形態又は変異を含んでいてもよいということを理解されたく、当業者であれば、その場合も依然として同じ遺伝子であるとみなすであろう。

20

【0056】

本明細書に記載した核酸配列及び対応する各配列番号（SEQ ID NO）の核酸配列は、糖部位、ヌクレオシド間結合又は核酸塩基へのあらゆる修飾が施されていないと理解されたい。つまり、オリゴヌクレオチドを含む本開示のあらゆる核酸は、互いに独立して、糖部位、ヌクレオシド間結合又は核酸塩基に対する1つ以上の修飾を含んでいてもよい。

【0057】

概要

本明細書では、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）でPMP22 RNAを標的とする直接的な治療戦略が提供され、この治療戦略は、PMP22遺伝子カスケードにおけるプレmRNAに結合し、それと相互作用し、かつプレmRNAのスペーサー領域と完全なmRNAに変換されるエクソン領域との間のジャンクションへの結合によって、mRNAの特定の部分を効果的に「スプライシングアウト」するASOを用いた方法を含む。特定の実施形態では、ASOは、PMP22遺伝子の残りのエクソンがアミノ酸に発現されることを妨げない。mRNAから1つ以上のエクソンが除去又は部分的に除去されることで、結果として生じる改変後のアミノ酸配列は、天然に存在するPMP22アミノ酸配列よりも短くなるか又は該アミノ酸配列と異なるものになり、自然に得られるタンパク質と比べて、得られるタンパク質は、機能が損失し及び／又は分解が促進されるようになる（すなわち、機能性PMP22タンパク質が低下／減少する）。他の実施形態では、スプライシングイベントによって、結果として生じる代替的スプライシング済みmRNA（エクソンスキッピング済みmRNA）は、細胞内で全長mRNAよりも速い速度で分解され、これにより、タンパク質産生が減少する。

30

40

【0058】

本開示のASOによってエクソンスキッピング済みmRNAが産生される実施形態では、関係する標的組織内レベル及び対応する血中レベルの双方について、エクソンスキッピング済みmRNAに対する全長mRNAの比率を経時的に監視することが可能である。これにより、薬剤の分子活性を、対象内で（例えば、経時的に実験動物及び／又はヒト患者などの患者内で）特異的に測定することが可能となる。エクソンスキッピング済みmRNA

50

Aの量は、機能性タンパク質レベルの影響及び薬剤への患者又は実験動物の表現型応答を低下させるなどといった良好な結果を患者にもたらし得る、該薬剤の様々な下流効果と相関している可能性がある。このように、本開示の実施形態は、特定の対象内での薬剤の活性の確認、所望の応答を得るために患者に与えられる薬剤の量の変更、及び／又は、所望の応答を得るための薬剤の投与頻度の変更などを行うための診断方法として適用することができる。

【0059】

細胞内では、正常な全長mRNAが産生され、完全に機能するPMP22タンパク質をもたらす(図1)。図1では、マークされた開始領域内のエクソン(2~5)に、機能性の全長PMP22タンパク質を構成するアミノ酸をコードする核酸塩基対が含まれている。図1の上部に、エクソン領域だけでなくイントロン領域も含まれているプレmRNAが示されている。プレmRNAからイントロンがスプライシングアウトされることで、プレmRNAの下に示したmRNAが産生される。そして、翻訳が起こることで、エクソン2~5からタンパク質は、図示の開始部分と停止部分との間で産生される。CMT1A患者は、出生時からPMP22遺伝子のコピーを2つ持っており、これがPMP22の全長mRNAとPMP22全長タンパク質の過剰産生を招いて発病の主要因となる。

【0060】

従来の手法は、mRNAを「ノックダウン」又は「サイレンシング」することでPMP22タンパク質レベルを変化させようとするものであった。薬剤様分子を投入してプレmRNA又はmRNAの調節部分に働きかけることで、あらゆる産生を停止させるという方法もあった。そのほか、RNaseHによるmRNAの切断を促進し、mRNAを破壊させることでPMP22の産生を低下させるギャップマーのような戦略を提案しているものもあった。以上の方法には、活性を監視するのに、全長mRNA又はタンパク質の総量を対照動物又は対照患者との対比で測定することでしか分子の効果を監視できないという明確な欠点がある。正常な身体的健康のためには、少なくとも一定量のPMP22タンパク質が産生されることが必要であるため、PMP22タンパク質を過剰に除去すると、圧迫麻痺素因を伴う遺伝性神経障害として知られる明確な神経障害、末梢神経機能の喪失、身体症状の悪化、さらには、死などの(但し、これに限定されない)数多くの問題症状を引き起こす可能性がある。したがって、良好な臨床結果を得るには、患者の細胞内に存在するタンパク質を全て除去することなく、大量のPMP22タンパク質の量を除去することが重要となる。年齢、体重、生活習慣、自然史、疾患の進行段階などを含む数多くの要因が様々な患者のPMP22タンパク質の総産生及び経時的な安定性に影響を及ぼすため、あらゆる患者及びあらゆるライフスタイルに対して投与スケジュールを同じにすると、この正確な目標は達成できない可能性が高い。患者のmRNAレベル及びタンパク質レベルには様々な身体的要因又は行動的要因から大きな自然差が生じるため、総mRNA削減手法では、患者ごとに分子活性を監視するということがどうしても不可能になる。

【0061】

図2に、本開示の一実施形態を示す。同実施形態は、図2に示すプレmRNAと相互作用してプレmRNAからmRNAへの翻訳時に1つ(又は複数)のエクソンを除去する一方で残りのエクソンを含めておくことができ、全長mRNAと似ているが完全な機能性PMP22タンパク質をコードしない安定で且つ測定可能な全く別物(new)のエクソンスキッピング済みmRNAを生成する任意の化合物に関するものである。図2に、エクソン3を除去する化合物が模式的に示されているが、エクソン2及びエクソン4についての他の例も後で説明する。

【0062】

スプライシング時の「エクソンスキッピング」イベントは、完全連結した非機能性タンパク質を生じさせ得るか、又はフレーム外翻訳をもたらす得る。

【0063】

つまり、本明細書では、所与の対象内での、有効タンパク質をもたらすPMP22の全長mRNAの量と、非機能性タンパク質をもたらすエクソンスキッピング済みmRNAの

存在とを比較することができる方法であって、バックグラウンドのmRNAレベル及びタンパク質レベルの自然な実際の変化を利用してこのような監視を行うことが可能な方法が開示されている。特定の実施形態では、これが、動物試験で実施されてもよく、これらの試験を簡略化するだけでなく、所定の試験内でより多くの情報を提供する。そして、特定の実施形態では、これは、治療を受けているヒト患者で実施され得る。

【0064】

この手法は、患者試料内にインターナルコントロールが存在しないためにどうしても監視が不可能であったり現実的に監視が不可能であった、遺伝性疾患に対する従来の他の薬剤手法とは異なる。つまり、試料採取、患者間の差、分析方法のばらつきなどの要因から、このような試験は不可能又は非現実的であった。対照的に、本開示の手法では、患者試料内で2つの測定可能なマーカーが得られ、それらの2つのマーカーの比率が薬剤活性の決定因子となる。特定の実施形態では、動物又は患者試料内のエクソンスキッピング済みmRNAの量は、治療活性を追跡するために使用される。別の実施形態では、エクソンスキッピング済みmRNAの量が全長mRNAの量と比較され、その比率によって治療活性を追跡する。

【0065】

CMT1Aの場合、PMP22タンパク質の産生を対象にすることが望ましい。さらに、患者の投与スケジュールの変更を伴って実施するのが大いに望ましい。投与条件は、体重、年齢、疾患の進行、ライフスタイルなどを含む数多くの患者因子に大きく依存し得る。CMT1A病（及びその他の単一遺伝子疾患及び多遺伝子疾患）を治療するための従来の手法では、mRNAの産生、つまり、そのmRNAからのタンパク質の全体的な（又は一部の）産生を正確に追跡することができない。

【0066】

最も古典的な薬剤開発では、その総合的な戦略として、多数の細胞実験や動物実験により、送達濃度に対する薬剤効果を調べることで、薬剤効果と表現型応答の変化との相関関係を求める。その後、ヒトで薬剤の試験を行う（通常、主に安全性と毒性のプロファイリングに焦点を当てて複数の投与戦略を実施する）ことにより、対象となる患者集団全体に対する単一の推奨用量が見出され得る。この場合、臨床現場ではそれなりの効果を示す一方で、一部の患者集団では測定可能な表現型効果がしばしば全く示されない薬剤となることがよくある。応答を示さないこれらの患者は、半関連の過去の研究に基づいた、単に効果がない投与量（薬剤が十分でないか又は多過ぎる）を施されている場合が多い。

【0067】

本開示のASOが細胞（又は対象、例えば、生体内治療を受けた動物、ヒト等）に投入されると、該ASOの一部は、プレmRNAと相互作用し、転写時にエクソン（又は複数のエクソン）をスキッピングさせる。「スキッピング」エクソンを有するmRNA（「エクソンスキッピング済みmRNA」）は、依然として産生されるが、非機能性タンパク質を産生する。このような手法の重要な利点の一つとして、エクソンスキッピング済みmRNA分子が、分子レベルでの薬剤活性の測定値として定量化することができるため、得られる結果を混乱させる可能性があるその他の（常に存在する）特定の環境パラメータや実験パラメータに左右されないという点が挙げられる。

【0068】

本明細書では、対象内での分子応答を誘発するとともに、影響を受けていない元々の全長mRNAとエクソンスキッピング済みmRNAの両方を治療過程中に監視して下流のタンパク質産生と関連付けることを可能にする、新しい種類の治療薬が提供される。特定の実施形態では、目的の標的組織から、試料が採取され得る。特定の実施形態では、血漿などの身体の別の（よりアクセスし易い）部分から、試料が採取され得る。このような手法により、動物試験中及び臨床展開中の実際の患者で、本開示の治療用組成物の効果を監視することが可能となる。

【0069】

PCRは、例えば、目的の標的組織と対応する血漿レベルの双方でのRNA量の分析

10

20

30

40

50

ーを行うのに、感度に優れた高特異性の手法であるが、RNAは安定性に乏しく、血中に存在するRNAの量は組織内のRNAの量及び性質よりも大幅に低くなる可能性があるため、PCRによる監視は問題となり得る。患者の活動や、体内分布時の標的組織と身体その他の部分とでの元々のタンパク質安定性の違いなどといった環境要因に基づき、タンパク質レベルがなおいっそう変動し得ることから、標的組織内及び対応する血漿レベルでのタンパク質産生の監視は、なおいっそう問題となり得る。

【0070】

本開示の重要な側面は、転写に先立ってプレmRNAのイントロンとエクソンとの間のジャンクションを標的にするという独特の手法にある。イントロンとエクソンとの間のジャンクション箇所は、数多くの理由から（イントロンのみ又はエクソンのみの非重複領域と比べて）ASOの標的化に対して高い感受性を有する。第1に、ASOの標的への結合は、該ASOを受け入れるための立体的余地がRNAにあるか否かに大きく依存する。細胞内のオリゴヌクレオチドは、複雑な立体構造を有しており、その独特な位置関係により、該構造は「開かれた」状態となって、本提案の薬剤の結合部位が利用できるようになっている。第2に、遺伝子標的への任意のASOの結合は、その結合部位をめぐるタンパク質や酵素（及びその他の分子）と「競合」し、前記タンパク質と置き換えられる可能性がある。ASO化合物は、標的に結合したとしても、（転写、翻訳時などの）機能性酵素に置き換えられてしまえば、実質、効果的に機能しなくなる。驚くべきことに、上記のジャンクション箇所は、非ジャンクション部位と比べて、活発な結合及び（結合を維持するための）競合強度の面で、遥かに利用し易いことが判明した。

【0071】

図3及び図4に、標的化手法の概要を示す。図3Aは、エクソン1、イントロン領域、そして、エクソン2（プレmRNAと称される）の模式図である。プレmRNAからmRNAへの変換時には、イントロンが除去されて連続するエクソン同士が互いに結合するのに先立って、プレmRNAは、snRNPの存在下で立体構造を形成して、エクソン1の3'末端がエクソン2の5'末端に接近した図3Bに示す中間構造を生成する。このような複雑な立体構造が形成されてから、（酵素などの）生体分子は、（snRNP及びその他の補因子の存在下で）該構造に作用することで、プレmRNAのイントロン領域を除去し、2つの隣合うエクソン同士を化学的に結合し得る（図3ではエクソン1とエクソン2として描かれているが、遺伝子内のその他の連続するエクソン同士も同様の方法で結合し得る）。本開示は、このようなゲノム内の選択的領域に分子を結合させて特定のエクソン-イントロン-エクソンジャンクションを阻害し、これ以外の（部分的又は全体的な）転写の発生を可能にするという技術に関する。この領域（図3Bの点線円1z）が示されており、立体構造は、スプライシング過程が効率的に行われるうえで重要な部分である。この領域は、立体構造を認識する酵素、立体構造の化学的性質、繋げる2つのエクソンの末端との近接性などの数多くの要因から重要な部分である。スプライシングが発生すると、エクソン1とエクソン2の2つの末端同士が結合して（図3C）mRNAを形成する。

【0072】

特定の実施形態では、エクソンスキッピングの標的となるイントロン及び／又はエクソン自体の領域に特異的に結合又はハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）が導入される。このような実施形態では、投入されるASOは、記載されている近接部位（図3の1z）近傍の領域内のプレmRNAと相補的な配列を含み、これにより、エクソンインクルージョンを妨害し、標的となったエクソンを含まないが、標的遺伝子内で薬剤が結合しなかったそれ以外のエクソンを含む最終的なmRNA産物を産生する。細胞の（RNA翻訳が起こる）核内にASOが存在していると、プレmRNAとの間で平衡が形成され、この平衡は、存在する薬剤の量、存在するプレmRNAの量、標的領域への結合効率、結合後の付着強度などの影響を直接受ける。本開示の特定の実施形態において、薬剤の導入量は、細胞内に存在する全てのプレmRNAがエクソンスキッピングを生じるわけではない量とされる。つまり、いずれかの所与の組織試料内では、PMP22の全長mRNAとエクソンスキッピング済みmRNAの両方が産生され、発生したスキップ

ングの量は、薬剤の化学組成及び薬剤の投入量などの要因に左右される。エクソンスキッピングの比率に影響を与える可能性がある要因は、その他にも存在する。具体的には、本開示の特定の実施形態は、あらゆる全長mRNAの産生を完全には除去しない分子に関する。短縮された非全長のエクソンスキッピング済みmRNAが産生される測定可能なエクソンスキッピングイベントを誘導するものであるという前提で、プレmRNAの連続領域に対して相補的なASOは、エクソンの3'末端、エクソンの5'末端、又はイントロン若しくはエクソンのその他の領域を標的にするものであってもよい。

【0073】

図4Bに示すASOの長さは、所望の効果によって様々な長さとなり得る。本開示では、PMP22のプレmRNAを特異的に標的とするASOが開示され、したがって、ASO塩基の最小長さは、PMP22のmRNAに特異的であるとともにヒトゲノムのその他の領域には特異的に結合しないことが好ましい。また、DNAやRNAなどの長い鎖は、それ自体の上に折り畳まれていることがあり、標的プレmRNAに結合する余地がなくなる可能性があるため、ASOが長過ぎると、使用に問題が生じる場合がある。さらに、ASOが長過ぎると、製造上の懸念も考慮しなければならない。よって、特定の実施形態において、ASOの長さは、約8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28又は29個のヌクレオチドのいずれかから、約9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30個のヌクレオチドのいずれかまでである。特定の実施形態において、ASOの長さは、約12～30個のヌクレオチドである。特定の実施形態において、ASOの長さは、約15～25個のヌクレオチドである。特定の実施形態において、ASOの長さは、約18～25個のヌクレオチドである。

【0074】

本開示のASOは、ハイブリダイズに用いられる全ての標的プレmRNA塩基と完全にマッチする（すなわち、100%相補的な）ものでなくてもよい。例えば、特定の実施形態では、18-mer ASOは、1つ又は1つ以上の塩基が標的プレmRNAに対して相補的ではないが、ハイブリダイズを行う／アンチセンス活性を有するように、設計され合成され得る。例えば、特定の実施形態では、2つ又は2つ以上のASO／標的領域塩基対は、相補的でない「ミスマッチ」と見なされ得る。特定の実施形態において、ASOは、プレmRNAの標的領域に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、相補的領域を含む。特定の実施形態では、ASOは、プレmRNAの標的領域に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%又は99%相補的な相補的領域を含む。

【0075】

本開示の別の実施形態は、図4Bに示されており、ASOは、プレmRNAの連続した部分に結合しないが、プレmRNAの2つの別々の部位にまたがるように使用される。例えば、図4Bに示すASOは、エクソン1の3'末端に対して相補的な塩基と、エクソン2の5'末端に対して相補的な塩基とを含み得る。このASOは、（図4Bに示すように）立体構造が形成されると結合し、実際のスプライシングイベントを妨害し得る。また、ASOは、結合によって立体構造の全形成とそれに対応する化学的性質に影響を及ぼすものである場合もある。ほかにも、存在する1つ以上のエクソンでエクソンスキッピングを誘導するという前提で、数多くのASO形態が想定される。一部の実施形態において、ASOは、イントロンとエクソンとの両方の一部に重なる。他の実施形態では、ASOは、標的領域のエクソン部分のみに重なる。他の実施形態では、ASOは、イントロンの標的領域近傍の一部のみに重なる。

【0076】

別の実施形態として、エクソンスキッピングイベントを生じさせる、所与のイントロン／エクソンジャンクションに特異的な抗体が付加した、図4Cに示すものが挙げられる。さらに別の実施形態として、エクソンスキッピングイベントを誘導する小分子が使用され

た、図 4 D に示すものが挙げられる。

【0077】

重要なのは、本特許に記載の分子は、ゲノムの特定の部分に特異的であり、イントロン／エクソジャンクション領域にランダムに結合しないことであり、後者の場合、望ましくない副作用が引き起こされ、標的でない正常な生物学的過程が妨害される可能性がある。特定の実施形態において、分子は、図示の立体構造の形成と安定化を妨げるように作用する。他の実施形態では、分子が前記領域に結合することで、補因子及び酵素がスプライシングイベントを遂行するのを物理的又は化学的に阻止する。

【0078】

本明細書で開示する方法や組成物は、薬物投与の様々な効果を理解するために動物で A S O の試験を十分に行ってから、ヒト患者に対する安全で効果的な治療戦略を定めることが可能になると考えられる。また、薬剤投与に関連するその他の要因（体重又は疾患の進行など）を動物で試験することも可能であり、これにより、臨床試験時に患者を「階級化」又は「分類」し、個別の患者の具体的な様相に応じて異なる投与量を与えるということも考えられる。また、治療時のコンパニオン診断として、患者の m R N A レベルを監視し、薬剤治療に対する分子応答に基づいて、患者ごとに投与量を変更できるということも考えられる。

【0079】

特定の実施形態では、モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド（又はその他の非荷電骨格化学オリゴヌクレオチド）を使用することで、プレ m R N A の標的領域にハイブリダイズした際の、A S O の結合強度が増強する。非荷電骨格構造は、（2' M e - O A S O や m i R N A 薬剤のように）イオン反発によって塩基対結合と競合することがないため、A S O が結合した際に転写タンパク質（及びその他の補因子）による置換が起き難く、大幅な増強につながる。モルフォリノ骨格は、文献でよく研究されており、S a r e p t a T h e r a p e u t i c s 社では別用途の（エテプリルセンなどの）特定の F D A 承認 A S O 製品に使用されている。

【0080】

本開示の A S O の合成には、その他の非天然アミノ酸骨格も考えられる。例えば、酵素分解に対して A S O を安定化させるために、A S O の糖と骨格に 2' M e - O 修飾が施されてもよい。本開示の方法では、アンチセンス活性を有する安定した A S O を形成するために、多くの骨格化学、糖修飾、末端修飾などが適用されてもよい（U S 2 0 1 9 / 0 0 6 2 7 4 1 A l に列挙されている全ての例を参照のこと）。特定の実施形態では、相補的なプレ m R N A にハイブリダイズしてエクソスキッピングを可能にするあらゆる A S O 構造が包含される。

【0081】

本開示の特定の実施形態は、P M P 2 2 のプレ m R N A の標的領域に対して相補であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、相補的領域を含むか又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチド（A S O）を含む組成物を提供する。特定の実施形態では、相補的領域は、プレ m R N A の標的領域に対して 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 % 又は 9 9 % 相補的である。A S O は、標的領域の全長に相補的である必要はなく、標的領域のハイブリダイズするのに十分な部分に対して相補的であればよく、すなわち、規定の標的領域は A S O の相補的領域よりも、さらには、A S O 全体よりも長くなり得て、すなわち、A S O の相補的領域は標的領域配列のサブセットに相補的なものであってもよいと理解されたい。特定の実施形態では、相補的領域と標的領域とが同じ長さである。本明細書の別の箇所で詳細に説明するように、細胞内で A S O の相補的領域が P M P 2 2 のプレ m R N A の標的領域に結合することで、R N A 転写時のエクソスキッピングが誘導される。A S O が標的領域に結合することで、P M P 2 2 の全長 m R N A の産生が減少し得る。また、P M P 2 2 のエクソスキッピング済み m R N A の産生がもたらされ得る。A S O が標的領域に結合することで、機能性 P M P 2 2 タンパク質の減少及び／又は P M P 2 2 の非機能性タンパク質

10

20

30

40

50

の産生がもたらされ得る。全長mRNAの減少とエクソスキッピング済みmRNAの産生の両方が検出され測定され得る。また、機能性タンパク質の減少及び／又は非機能的タンパク質の産生が検出され測定され得る。また、本明細書の別の箇所で詳細に開示するような目的のために、全長mRNA及びエクソスキッピング済みmRNAと機能性タンパク質及び非機能性タンパク質との相関関係及び／又は比率が求められたり計算されたりし得る。

【0082】

特定の実施形態では、ASOは、PMP22のプレmRNAの標的領域に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23又は24個の連続するヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる。当業者であれば、ASOの相補的領域の長さは、例えば、PMP22のプレmRNAの標的領域配列及び／又は特定の用途若しくは投与条件に応じて変化し得るということが分かるであろう。「連続するヌクレオチド」の相補的領域を含むASOの実例としては、後述の実施例1及び実施例4（例えば、図5A及び図5B、図11A及び図11B）に開示されている。

10

【0083】

特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域は、実施例5で説明するように、PMP22のプレmRNAの2つの別々のセグメントを含む。特定の実施形態では、ASOが、PMP22のプレmRNAの標的領域の連続した配列の第1のセグメントに対して相補的であるか、又は1、2若しくは3つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約6、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなり、ASOが、PMP22のプレmRNAの標的領域の連続した配列の第2のセグメントに対して相補的であるか、又は1、2若しくは3つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約6、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる。つまり、ASOの相補的領域は、PMP22のプレmRNAの第1のセグメントと第2のセグメントとにハイブリダイズし、PMP22のプレmRNAの相補的ではない／ハイブリダイズしない領域にまたがる。

20

【0084】

本開示のASOの特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が連続した1つのセグメントであるか別々の2つのセグメントであるかにかかわらず、ASOが、PMP22のプレmRNAの標的領域に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40又は45個のいずれかから約13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45又は50個のいずれかまでのヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる。特定の実施形態では、ASOが、PMP22のプレmRNAの標的領域に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25個のヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる。

30

40

【0085】

本開示の任意のASOの特定の実施形態では、プレmRNAの標的領域が連続した1つのセグメントであるか別々の2つのセグメントであるかにかかわらず、ASOが、約8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、60又は75個のいずれかから約13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、60、75又は100個のいずれかまでのヌクレオチドの長さを有する。

50

【0086】

特定の実施形態では、ASOが、当技術分野で知られている及び／又は本明細書の別の箇所で定義されている修飾及び／又は合成オリゴヌクレオチドである。例えば、ASOは、ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー（PMO）であり得る。

【0087】

ASOによってPMP22のプレmRNAのエクソンスキッピングが引き起こされるが、特定の実施形態では、スキッピングしたエクソン由来の部分以外の下流エクソンが、PMP22の全長プレmRNAの場合と同じように依然として発現し得る。しかしながら、特定の実施形態では、エクソンスキッピングにより、タンパク質翻訳が早期終止し、及び／又は、下流エクソンがフレーム外になる。

10

【0088】

エクソンスキッピング及びPMP22のエクソンスキッピング済みmRNAの産生には、PMP22のエクソンスキッピング済みmRNAの産生を開示していない従来の方法と比べて、特定の利点があることが分かった。つまり、特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、少なくとも1つのコーディングエクソン（例えば、PMP22のエクソン2、エクソン3、エクソン4及びエクソン5）とのイントロン／エクソングランクションにまたがる。標的となるイントロン／エクソングランクションは、エクソンの3'末端及び／又は5'末端に存在し得る。例えば、特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソンの3'末端を含む。また、特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソンの5'末端を含む。特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、イントロンの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドとエクソンの一部とを含むか又はそれらからなるイントロン／エクソングランクションにまたがる（例えば、図5A及び図5B、図11A及び図11B）。特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、イントロンの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドとエクソンの一部とからなる。同様に、特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソンの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドとイントロンの一部とを含むか又はそれらからなるイントロン／エクソングランクションにまたがる（例えば、図5A及び図5B、図11A及び図11B）。特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソンの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドとイントロンの一部とからなる。特定の実施形態では、イントロン／エクソングランクションのエクソン部分が、PMP22のエクソン3を含む（図5A及び図5B）。特定の実施形態では、イントロン／エクソングランクションのエクソン部分が、PMP22のエクソン4を含む（図11A及び図11B）。

20

30

【0089】

特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソン3の5'末端を含む。例えば、PMP22のプレmRNAの標的領域は、SEQ ID NO: 2又はその一部若しくはサブセット／断片を含むか、又はそれらからなる。

【0090】

特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソン3の3'末端を含む。例えば、PMP22のプレmRNAの標的領域は、SEQ ID NO: 35又はその一部若しくはサブセット／断片を含むか、又はそれらからなる。

40

【0091】

特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソン4の5'末端を含む。例えば、PMP22のプレmRNAの標的領域は、SEQ ID NO: 76又はその一部若しくはサブセット／断片を含むか、又はそれらからなる。

【0092】

特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソン4の3'末端を含む。例えば、PMP22のプレmRNAの標的領域は、SEQ ID NO: 111

50

又はその一部若しくはサブセット／断片を含むか、又はそれらからなる。

【0093】

特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソン2の5'末端を含む。例えば、PMP22のプレmRNAの標的領域は、SEQ ID NO:163 又はその一部若しくはサブセット／断片を含むか、又はそれらからなる。

【0094】

特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソン2の3'末端を含む。例えば、PMP22のプレmRNAの標的領域は、SEQ ID NO:198 又はその一部若しくはサブセット／断片を含むか、又はそれらからなる。

【0095】

特定の実施形態では、ASOが、SEQ ID NO:2 (エクソン3、5'末端)、SEQ ID NO:35 (エクソン3、3'末端)、SEQ ID NO:76 (エクソン4、5'末端)、SEQ ID NO:111 (エクソン4、3'末端)、SEQ ID NO:163 (エクソン2、5'末端) 及び／又はSEQ ID NO:198 (エクソン2、3'末端) に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、相補的領域を含むか又はそれらからなる。特定の実施形態では、ASOが、SEQ ID NO:3~34 (エクソン3、5'末端)、SEQ ID NO:37~70 (エクソン3、3'末端)、SEQ ID NO:77~110 (エクソン4、5'末端)、SEQ ID NO:112~145 (エクソン4、3'末端)、SEQ ID NO:164~197 (エクソン2、5'末端) 若しくはSEQ ID NO:199~232 (エクソン2、3'末端) のヌクレオチド配列、又はPMP22のプレmRNAにハイブリダイズするのに十分なそのサブセット／断片を含むか又はそれらからなる。特定の実施形態では、ASOが、SEQ ID NO:3~34 (エクソン3、5'末端)、SEQ ID NO:37~70 (エクソン3、3'末端)、SEQ ID NO:77~110 (エクソン4、5'末端)、SEQ ID NO:112~145 (エクソン4、3'末端)、SEQ ID NO:164~197 (エクソン2、5'末端) 若しくはSEQ ID NO:199~232 (エクソン2、3'末端) の、1、2又は3つのヌクレオチドが置換されたヌクレオチド配列、又はPMP22のプレmRNAにハイブリダイズするのに十分なそのサブセット／断片を含むか又はそれらからなる。

【0096】

特定の実施形態では、ASOが、SEQ ID NO:71 (SHC-006 25-mer)、SEQ ID NO:72 (SHC-001 24-mer)、SEQ ID NO:73 (SHC-005 25-mer)、SEQ ID NO:74 (SHC-010 21-mer)、SEQ ID NO:75 (SHC-012 20-mer)、SEQ ID NO:146 (SHC-029 21-mer)、SEQ ID NO:147 (SHC-028 20-mer)、SEQ ID NO:148 (SHC-027 20-mer)、SEQ ID NO:149 (SHC-031 21-mer)、SEQ ID NO:150 (SHC-030 20-mer)、SEQ ID NO:151 (SHC-032 20-mer)、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:162、SEQ ID NO:235、又はSEQ ID NO:238の核酸配列を含むか又はそれらからなる。特定の実施形態では、ASOが、SEQ ID NO:71 (SHC-006 25-mer)、SEQ ID NO:72 (SHC-001 24-mer)、SEQ ID NO:73 (SHC-005 25-mer)、SEQ ID NO:74 (SHC-010 21-mer)、SEQ ID NO:75 (SHC-012 20-mer)、SEQ ID NO:146 (SHC-029 21-mer)、SEQ ID NO:147 (SHC-028 20-mer)、SEQ ID NO:148 (SHC-027 20-mer)、SEQ ID NO:149 (SHC-031 21-mer)、SEQ ID NO:150 (SHC-030 20-mer)、SEQ ID NO:151 (SHC-032 20-mer)、SEQ ID NO:156、SEQ ID NO:159、SEQ

10

20

30

40

50

ID NO: 162、SEQ ID NO: 235、又はSEQ ID NO: 238の、1、2又は3つのヌクレオチドが置換された核酸配列を含むか又はそれらからなる。

【0097】

本明細書では、細胞内でのPMP22の全長mRNAの発現量を減少させる方法であって、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を含む組成物を前記細胞に投与する過程を含む方法が提供される。特定の実施形態では、PMP22の全長mRNAの量を減少させることは、本明細書の別の箇所で詳細に説明するように、PMP22のプレmRNA内のイントロンとエクソンとのジャンクションを標的にすることを含む。本明細書の別の箇所で使用する「細胞に投与する」ことは、ASOが細胞と接触することで該細胞がASOを取り込み得て且つそれによってASOが自身のアンチセンス活性を発揮し得ることになる、あらゆる状況をカバーしていると理解されたい。例えば、細胞に投与することは、生体外実験で細胞をASOに曝露すること、例えば、組織培養で増殖した細胞に曝露することを含む。細胞に投与することは、対象の少なくとも1つの細胞が局所投与、全身投与などでASOと接触するように、対象、例えば、生体内実験の研究動物にASOを与えることを含む。細胞に投与することは、患者の少なくとも1つの細胞が局所投与、全身投与などでASOと接触するように、患者にASOを与え、例えば、ヒト患者を治療することを含む。つまり、対象の細胞は、組織、器官、身体の部位、生体液、生体全体などに存在し得る。

10

【0098】

PMP22の全長mRNAの量を減少させる特定の実施形態では、細胞内でのPMP22の全長mRNAの量は、ASOに応じて、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%又は95%減少する。後述の実施例で説明するように、本開示の任意の方法におけるPMP22の全長mRNAの量及び／又はその減少は、ASO組成物が投与されていない未処置の細胞、対象、患者などのPMP22の全長mRNAの量との比較に供され得る。特定の実施形態では、PMP22の全長mRNA(又は機能性PMP22タンパク質)を完全に除去することが考えられていないか、又は望ましくないため、細胞内でのPMP22の全長mRNAの量は、ASOに応じて、約25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95%以下減少する。特定の実施形態では、細胞内でのPMP22の全長mRNAの量は、ASOに応じて、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%又は75%のいずれかから約25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95%のいずれかまで減少する。本明細書の別の箇所で詳細に説明するように、特定の実施形態では、PMP22のエクソンスキッピング済みmRNAが産生される。つまり、特定の実施形態では、PMP22の全長mRNAの量／減少をPMP22のエクソンスキッピング済みmRNAの量と比較することで、相関関係を求めたり、比率を計算したりなどが可能となる。特定の実施形態では、細胞内での機能性PMP22タンパク質の産生量が減少する。本開示の任意の方法での機能性タンパク質のこのような減少は、ASO組成物が投与されていない未処置の対照細胞、対象、患者などとの対比で求められ得る。特定の実施形態では、細胞内での機能性PMP22タンパク質の量は、ASOに応じて、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%又は95%減少する。前述のように、一部の実施形態では、PMP22のタンパク質を完全に除去することは考えられていないか、又は望ましくない。したがって、一部の実施形態では、細胞内での機能性PMP22タンパク質の量は、ASOに応じて、約25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95%以下減少する。特定の実施形態では、細胞内での機能性PMP22タンパク質の量は、ASOに応じて、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%又は75%のいずれかから約25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95%のいずれかまで減少する。

20

30

40

【0099】

本明細書では、PMP22のエクソンスキッピング済みプレmRNAを産生する方法で

50

あって、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）を含む組成物を細胞に投与する過程を含む方法が提供される。特定の実施形態では、同方法が、本明細書の別の箇所で詳細に説明するように、ＰＭＰ２２のプレｍＲＮＡ内のイントロンとエクソンとのジャンクションを標的とすることを含む。特定の実施形態では、細胞内でのＰＭＰ２２の全長ｍＲＮＡの発現量が減少する。特定の実施形態では、細胞内のＰＭＰ２２の全長ｍＲＮＡの量は、ＡＳＯに応じて、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７５％又は９５％減少する。特定の実施形態では、ＰＭＰ２２の全長ｍＲＮＡ（又は機能性ＰＭＰ２２タンパク質）を完全に除去することが考えられていないか、又は望ましくないため、細胞内でのＰＭＰ２２の全長ｍＲＮＡの量は、ＡＳＯに応じて、約２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％又は１０
９５％以下減少する。特定の実施形態では、細胞内でのＰＭＰ２２の全長ｍＲＮＡの量は、ＡＳＯに応じて、約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％又は７５％のいずれかから約２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％又は９５％のいずれかまで減少する。特定の実施形態では、ＰＭＰ２２の全長ｍＲＮＡの量／減少をＰＭＰ２２のエクソンスキッピング済みｍＲＮＡの産生量と比較することで、相関関係を求めたり、比率を計算したりするなどが可能となる。また、特定の実施形態では、細胞内での機能性ＰＭＰ２２タンパク質の産生量が減少する。特定の実施形態では、細胞内での機能性ＰＭＰ２２タンパク質の量は、ＡＳＯに応じて、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７
５％又は９５％減少する。前述のように、一部の実施形態では、ＰＭＰ２２のタンパク質
を完全に除去することは考えられていないか、又は望ましくない。したがって、一部の
実施形態では、細胞内での機能性ＰＭＰ２２タンパク質の量は、ＡＳＯに応じて、約２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％又は９５％以下減少する。特定の実施形態では、細胞内での機能性ＰＭＰ２２タンパク質の量は、ＡＳＯに応じて、約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％又は７５％のいずれかから約２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％又は
９５％のいずれかまで減少する。

【０１００】

本明細書では、シャルコー・マリー・トゥース病、例えば、シャルコー・マリー・トゥース病１Ａ型を治療する方法であって、必要とする対象に、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）を含む組成物を投与する過程を含む方法が提供される。特定の実施形態では、対象が、シャルコー・マリー・トゥース病についての研究動物などのモデル系である。特定の実施形態では、対象が、ヒト患者である。特定の実施形態では、組成物が、経口、局所、全身、例えば、皮下、神経周囲投与などによって投与される。特定の実施形態では、同方法は、本明細書の別の箇所で詳細に説明するように、ＰＭＰ２２のプレｍＲＮＡ内のイントロンとエクソンとのジャンクションを標的とする過程を含む。特定の実施形態では、ＰＭＰ２２のエクソンスキッピング済みｍＲＮＡが産生される。特定の実施形態では、本明細書の別の箇所で詳細に説明するように、ＰＭＰ２２の全長ｍＲＮＡの量／減少との比較に供され得る。特定の実施形態では、細胞内でのＰＭＰ２２の全長ｍＲ
ＮＡの量が減少する。特定の実施形態では、細胞内のＰＭＰ２２の全長ｍＲＮＡの量は、
ＡＳＯに応じて、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７５％又は９５％減少する。特定の実施形態では、ＰＭＰ２２の全長
ｍＲＮＡ（又は機能性ＰＭＰ２２タンパク質）を完全に除去することが考えられていない
か、又は望ましくないため、細胞内でのＰＭＰ２２の全長ｍＲＮＡの量は、ＡＳＯに
応じて、約２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％又は
９５％以下減少する。特定の実施形態では、細胞内でのＰＭＰ２２の全長ｍＲＮＡの
量は、ＡＳＯに応じて、約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、
５０％、６０％又は７５％のいずれかから約２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、
７０％、８０％、９０％又は９５％のいずれかまで減少する。特定の実施形態では、細胞内での機能性
Ｐ
Ｍ
Ｐ
２
２
タンパク質の量が減少する。特定の実施形態では、細胞内での機能性
Ｐ
Ｍ
Ｐ
２
２

タンパク質の量は、A S O に応じて、少なくとも約 5 %、1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 5 % 又は 9 5 % 減少する。前述のように、一部の実施形態では、P M P 2 2 のタンパク質を完全に除去することは考えられていないか、又は望ましくない。したがって、一部の実施形態では、細胞内での機能性 P M P 2 2 タンパク質の量は、A S O に応じて、約 2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 又は 9 5 % 以下減少する。特定の実施形態では、細胞内での機能性 P M P 2 2 タンパク質の量は、A S O に応じて、約 5 %、1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 % 又は 7 5 % のいずれかから約 2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 又は 9 5 % のいずれかまで減少する。

【0101】

特定の実施形態では、A S O が、薬学的に許容される塩として投与される。特定の実施形態では、A S O が、薬学的に許容される担体又は希釈剤で投与される。

【0102】

特定の実施形態では、疾患の少なくとも 1 つの症状が軽減される。特定の実施形態では、疾患の少なくとも 1 つの症状の進行速度が低下する。特定の実施形態では、この治療方法が、別の C M T 処置と比べて、副作用を生じないか又は重篤な副作用が少ないか若しくは小さい。特定の実施形態では、P M P 2 2 のエクソスキッピング済み m R N A の産生量と P M P 2 2 の全長 m R N A の量／減少との相関関係又は比率によって、A S O 治療の投与量を調節して、その効果の向上及び／又は副作用の軽減をもたらすことができる。

【0103】

本明細書では、さらに、P M P 2 2 のプレ m R N A の、コーディングエクソンのうちの 1 つの（すなわち、P M P 2 2 のエクソン 2、エクソン 3、エクソン 4 又はエクソン 5）のイントロン／エクソジャンクションを含む標的領域に対して相補的であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、相補的領域を含むか、又はそれらからなるアンチセンスオリゴヌクレオチド（A S O）を含む組成物が提供される。A S O は、標的領域の全長に相補的である必要がないが、標的領域のハイブリダイズするのに十分な部分に対して相補的であり、すなわち、規定の標的領域は A S O の相補的領域よりも、さらには、A S O 全体よりも長くてもよいことを理解されたい。特定の実施形態では、A S O は、P M P 2 2 のプレ m R N A の標的領域に対して相補的であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3 又は 2 4 個の連続するヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる。特定の実施形態では、A S O は、P M P 2 2 のプレ m R N A の標的領域に対して相補的であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、約 1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、3 0、3 5、4 0 又は 4 5 個のいずれかから約 1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 5、4 0、4 5 又は 5 0 個のいずれかまでの連続するヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる。特定の実施形態では、A S O は、P M P 2 2 のプレ m R N A の標的領域に対して相補的であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4 又は 2 5 個の連続したヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる。特定の実施形態では、P M P 2 2 のプレ m R N A の標的領域は、エクソンの 3' 末端を含む。特定の実施形態では、P M P 2 2 のプレ m R N A の標的領域は、エクソンの 5' 末端を含む。特定の実施形態では、P M P 2 2 のプレ m R N A の標的領域は、イントロンの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1 又は 1 2 個のヌクレオチドとエクソンの一部とを含むイントロン／エクソジャンクションを含む。特定の実施形態では、P M P 2 2 のプレ m R N A の標的領域は、イントロンの 2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1 又は 1 2 個のヌクレオチドとエクソンの一部とを含むか、又はそれらからなる。同様に、特定の実施形態では、P M P 2 2 のプレ m R N A の標的領域は、エクソンの少なくとも 2、3

10

20

30

40

50

、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドとイントロンの一部とを含むイントロン／エクソンジャンクションを含む。特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域は、エクソンの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドとイントロンの一部とを含むか、又はそれらからなる。特定の実施形態では、イントロン／エクソンジャンクションのエクソン部分は、PMP22のエクソン3を含む。特定の実施形態では、イントロン／エクソンジャンクションのエクソン部分は、PMP22のエクソン4を含む。特定の実施形態では、ASOは、当業者に知られており、及び／又は本明細書に開示されるような修飾及び／又は合成オリゴヌクレオチドである。例えば、特定の実施形態では、ASOは、ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー（PMO）である。特定の実施形態では、PMP22のプレmRNAの標的領域は、SEQ ID NO: 2（エクソン3、5'末端）、SEQ ID NO: 35（エクソン3、3'末端）、SEQ ID NO: 76（エクソン4、5'末端）、SEQ ID NO: 111（エクソン4、3'末端）、SEQ ID NO: 163（エクソン2、5'末端）及び／又はSEQ ID NO: 198（エクソン2、3'末端）を含むか又はそれらからなる。

10

【0104】

特定の実施形態では、患者の年齢及び症状の重症度に応じて、患者に合った治療法が適用され得る（例えば、実施例9）。低齢の対象及び／又は症状が重症でない場合は、本開示の組成物を少量投与するだけで、軸索の改善に良い影響を完全に与えることができる。しかしながら、例えば、実施例9に示すように、30日間の5mg/kgの群は、30日目に試験した50mg/kgの群（群2及び4）と比べて、改善が僅かであった。一方で、群5の2回目の治療及びそれに続く60日間での試験の後、ダボ歩行時間は大幅に改善された。このことは、高齢の対象及び／又は症状レベルが重い若しくは疾患の進行時間が長い対象では、そうでない患者よりも、投与量を増やす必要があるか、又は（治療の最初の数か月間は数回注射し、その後、標準的な治療コースに戻るといふ）負荷投与計画が所望され得るという可能性が高いことを示唆している。疾患が進行していない他の対象では、負荷投与期間は不要となり得る。このような見解は、30日間以上かけて正常化した動物のPMP22のmRNAレベル（表4に示す）が、与えた投与量にかかわらず、どれも同等の効果を示しているように見受けられるため、生物学的観点からみても、大いに驚くべきことである。試験され 殺されてから僅か1週間の動物（群1）は、PMP22のmRNAレベルを正常化する時間がなかったと考えられる。また、群1では能力の改善が確認できず、これは、PMP22のレベルに影響が生じたものの、軸索を取り囲むミエリン鞘の改善が未だ始まっていなかったことを示唆している。

20

30

【0105】

したがって、特定の実施形態では、症状の進行又は年齢に基づいて、対象ごとに投与計画が定められる。特定の実施形態では、対象に投与される本開示の組成物の治療量は、その疾患の進行及び総体重の両方に基づく。別の実施形態では、疾患の進行は、患者の年齢、患者の身体能力、又はその両方に基づく。別の実施形態では、症状の重症度が重い及び／又は年齢が高い対象に対し、本記載の治療を負荷投与量で一定期間与え、次いで、それをより低い投与量に変更する。負荷期間では、同量の薬剤を対象に対して単により頻繁に与えるだけであってもよいし、最初に投与される組成物の用量を多くするようにしてもよい。一定期間（時間に基づくものであってもよいし、身体的改善又は何らかのバイオマーカーの改善に基づくものであってもよい）の後、投与量及び／又は投与頻度が下げられ得る。

40

【実施例】

【0106】

実施例1－エクソン3のスキッピング

PMP22のプレmRNAに結合し、エクソンスキッピングを促す（図2）ための、数多くの化合物（図5）を設計した。これらの化合物には、イントロン／エクソン領域の5'末端と相互作用するように設計されたものもあれば、3'領域と相互作用するものもある

50

。図 5 A 及び図 5 B では、PMP 22 のプレ mRNA 内の標的領域を上部に図示し、本記載の特定の 25-mer ASO をその下に図示している。図示のヌクレオチド塩基には、小文字のもの（イントロン領域に関する）と、タンパク質コーディングエクソン領域に関する大文字のものがある（例えば、g と G は同じ構造である）。これらの化合物は、プレ mRNA に結合し、エクソン 3 のスキッピングを誘導するように設計されたものである。図 5 の ASO は 25 塩基対の長さに設計されているが、当業者であれば、ASO の相補的領域は様々な長さになり得て、より長くしてもより短くしてもよく、PMP 22 のプレ mRNA の標的領域に特異的にハイブリダイズできるものであれば依然として効果的であることが分かるであろう。例えば、いくつかの試験された ASO は、長さがより短い。図 5 A では、PMO SHC-001 (SEQ ID NO: 72) の配列は c t a a g a g a g a t c G T T A C C T A G C A C であり、それは、長さが 22 塩基対であり、図 5 に示す 25-mer (SEQ ID NO: 15) のサブセットである。

10

【0107】

これらの化合物の多くは、モルフォリノ骨格で化学的に合成されたものであり、細胞アッセイとマウスモデルの双方の試験によって PMP 22 の mRNA 産生の阻害と測定可能なエクソンスキッピング産物の産生の効果を確認することで、作用機序と活性を確認した。上記のように、これらの化合物には、様々な長さのものがあつた（全ての化合物の長さが完全な 25 塩基であるわけではなく、図示の 25 塩基対 ASO のサブセットであるものもあつた）。

20

【0108】

図 5 の化合物を、細胞がヒト PMP 22 遺伝子を発現する HEK 293 細胞アッセイでスクリーニングした。細胞を増殖させて、試験対象の化合物を添加した。48 時間のインキュベーション期間後、トランスフェクト細胞を採取して総 RNA をエンドポイント RT-PCR に供した。図 6 に、化合物 SHC-006 (SEQ ID NO: 71)、SHC-001 (SEQ ID NO: 72)、SHC-005 (SEQ ID NO: 73)、SHC-010 (SEQ ID NO: 74)、SHC-012 (SEQ ID NO: 75) の細胞アッセイ結果を示す。

30

【0109】

これらの各化合物は、PMP 22 の全長 mRNA の総量を効果的に減少させ（つまり、PMP 22 のタンパク質の産生量を低下させることになり）、かつ、安定したエクソンスキッピング済み mRNA 産物を産生し、シーケンシングにより、この産物が PMP 22 の全長 mRNA からエクソン 3 の配列を差し引いたものを含んでいることが確認された。同様の結果は、K-562 細胞（骨髄性白血病細胞株）とヒトシュワン細胞株である CLR-3392 細胞の 2 種類のさらなる細胞状況を用いても得られた（データは図示せず）。これらの細胞は、HEK 293 細胞ほどトランスフェクトしないが、トランスフェクション効率の低下により、同様のレベルのエクソンスキッピングが観察された。

40

【0110】

シュワン細胞は、PMP 22 の主な産生源であるため、CMT1A について想定されるあらゆる治療法の主な標的となる。シュワン細胞は、重度ミエリン化され、その生化学が周囲の組織に大きく影響されるため、その他の標的細胞に比べて細胞試験が（実行可能ではあるものの）極めて困難である。しかし、本明細書では、これを行うための最適な方法を開示するとともに、プレ mRNA での PMP 22 エクソンスキッピングを誘導する堅牢なアッセイ法を開発した。

【0111】

ヒト PMP 22 由来のエクソン 3 のエクソンスキッピングを誘導する、比較的簡単な RT-PCR アッセイ法により、全長 mRNA とエクソンスキッピング済み mRNA の双方の DNA から、「標的結合」と分子効果を調べることを可能にする、明確な分子の読取りを得るようになる。これにより、同時に起こる全長 PMP 22 の減少とエクソンスキッピング済み PMP 22 の増加について、信頼性の高いターゲットを利用してインターナルコントロール付き RT-PCR 反応で容易に監視できるようになることから、医薬品開発の

50

観点から有利である。

【0112】

実施例 2

生体内活性を、C3マウス（ヒトPMP22の3コピー）を使用して試験した。C3マウスは、Jackson Labsから公開されている手順に従って飼育して遺伝子型を特定した。5週において、動物に単回6.7mgのSHC-012（SEQ ID NO: 75）又はスクランブル対照PMOを皮下注射した。未処置のC3マウスを、対照に含めた。注射から24時間後に動物を殺し、組織（坐骨神経、腎臓、肝臓、脳、脊髄など）を採取し、PMP22のmRNAの減少／発現とPMP22のmRNAのエクソンスキッピングバージョンについて分析した。RT-PCR（3%アガロースゲル）により、PMP22発現を調べた。GAPDHを対照として反応に含めることで、レーン間の比較をできるようにした（図7）。肝臓が、当然ながら、末梢に送達される治療薬を大量に受け入れることになるため、本発明者らは、肝臓のPMP22発現を調べたところ、全長PMP22の発現の減少とともに、エクソンスキッピング済みPMP22産物の蓄積を確認した（図7）。SHC-012動物では、PMP22の全長mRNAが大幅に減少するとともに、PMP22のエクソン3スキッピング済みmRNAが測定可能な量で存在している（シーケンシングにより確認済み）。

10

【0113】

そのほか、上記動物からの別の組織についても、同じPCR法及びゲル分析で分析し（図8）、本発明者らは、全長とエクソンスキッピング済みの量を比較してこれらの組織における総合的な減少を確認した。この証拠から、C3マウスの末梢神経組織（坐骨神経）などの幾つかの組織について、（背部のくびれ部分への）単回注射により、PMP22の減少及び／又はエクソンスキッピングが起こることが分かる。

20

【0114】

重要なのは、末梢神経組織（例えば、生体内のシュワン細胞の代わり）を調べたとき、全長PMP22発現の明らかな減少が観察されたという点である。なお、このC3マウスは、ヒトゲノムPMP22遺伝子を発現しており、その様々なエクソン内及び周囲の重要な調節配列をASOの標的にすることができる。

【0115】

実施例 3－長期的な動物試験

C3マウス（3ヒトPMP22遺伝子）は、CMTのような行動を示すことが認められているため動物モデルとして選択され、よく研究されており、かつ、このプロジェクトにとって最も重要なことであるが、ヒトゲノムPMP22遺伝子を発現する（Huxley C, Passage E, Manson A, Putzu G, Figarella-B, Pellissier JF, Fontes M. Construction of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A by pronuclear injection of human YAC DNA. Human molecular genetics. 1996; 5(5): 563-9. Epub 1996/05/01. doi: 10.1093/hmg/5.5.563. PubMed PMID: 8733121）。このことは、ASOがエクソン領域及びイントロン領域内の配列同一性に左右されるため、重要である。

30

40

【0116】

（初期の症候性疾患段階で一部の行動変化を示した）5週齢の動物と（測定可能なCMT行動変化前に治療を行った）3日齢の動物の、2種類の動物群を調べた。全ての動物に、SCH-012を注射した。5週において、C3動物（n=3）に対して3.3、17又は50mg/kgのSCH-012又はスクランブル対照PMOを週1回で5週間皮下注射した。第2の群のC3マウスも試験し、初期注射を、（ヒトでの発病前をシミュレートするために）3日齢から、各動物あたり1mg/kg及び10mg/kgで週に一回（週1回で12週間）行った（背中上部へのSQ）。未処置（n=4）のWTマウスを対照に

50

含めて、それ以外のマウスと同様に試験を行った。有害反応は観察されず、どの動物も試験期間を通じて健康を維持し、全ての投与量範囲で同様の速度で体重が増加し、明らかな毒性の兆候も見受けられなかった。予想どおり、どの動物も各注射による合併症を示すことなく円滑かつ迅速に回復し、注射手順による即時又は遅発の歩行、行動又は神経の障害を示さなかった。

【0117】

訓練及び順応期間を設けるために、全ての動物において、初期注射の1週間前に、標準的なロータロッド機械システムとダボ歩行を用いて、4週齢から試験手順を開始させた（毎週約4回）。ダボ歩行では、円筒状の10mm木製ダボを吊り下げ、マウスを装置の一方の端からもう一方の端まで（補助なし案内なしで）歩行させた。歩行にかかった時間、歩行中に滑った回数、さらに、歩行中の全ての転倒を記録した。初期の訓練期間は、データ分析に使わなかった。注射後、動物の1日1回の試験を継続して行い、全体のバランス、脚の能力、尾の安定性などを、疾患の進行に対して監視し、それらは、本モデルでの疾患進行に対する測定可能な表現型応答であることが分かっている（Huxley C, Passage E, Manson A, Putzu G, Figarella-Bran ger D, Pellissier JF, Fontes M. Construction of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A by pronuclear injection of human YAC DNA. Human molecular genetics. 1996; 5(5): 563-9. Epub 1996/05/01. doi: 10.1093/hmg/5.5.563. PubMed PMID: 8733121）。過去の報告どおり、未処置の動物は、6～8週齢で極めて顕著な歩行障害を示し始めた。

【0118】

全ての動物について、12週齢で（双方の試験対象群からの）全データを分析し、直接比較し、ダボを歩行するのに必要な時間、滑り、転倒、ためらいなどの回数などを求め、実験が進むにつれて、未処置の動物は時間の経過とともによりゆっくりと歩行するようになり、滑りは少なくなったが、明らかにダボを「掴んで」より慎重に歩行することが多くなった。映像の証拠から、処置動物と未処置動物との間に、顕著な行動の違いが極めて明確に確認された。図9は、補助なしでダボを歩行するのににかかった時間量を比較することによる、試験対象の動物と対照及び野生型との能力（表現型）データの比較を示す。ダボ上での滑り（及び転倒）の回数も、同様の傾向を示した。約12週齢で5日続けて試験を行って分析し、ダボを歩行する時間と滑りの回数について、投与群内の全動物の平均と標準偏差を算出した。ロータロッド試験も実施したが、試験ごとのばらつきが遥かに高くなった。PMP22を完全に排除することは有害であるとの理解のもとで（細胞データや、及び同様の分子の体内分布に関する過去の知見に基づいて）濃度を仮選択し、低用量（3mg/kg）、中用量（17mg/kg）及び高用量（50mg/kg）とした。17mg/kg（5週齢）では、どの動物の能力も、対照群よりも遥かに優れており（映像データからも極めて顕著）、P3では、いずれの群の動物も、野生型動物に近い能力を示した。

【0119】

本研究では、市販のロータロッドシステムでも動物の試験を行い、図10に、その能力データを示す。

【0120】

双方の実験について、（スクランブル対照動物に対する）p値を算出し、図9及び図10に示されている。

【0121】

実施例2及び実施例3のデータから、本開示に記載のSCH-012によるPMP22のmRNAの改変が、使用動物について所望の表現型効果を示すこと、つまり、歩行を改善させ、PMP22タンパク質の過剰産生による特定の症状を軽減させるということは明らかである。

【0122】

驚くべきことに、本手法は、CMT1Aマウスモデルでの症状の軽減において、従来のノックダウン手法よりも遥かに高い効果を示す。例えば、Zhao達の論文(The Journal of Clinical Investigation, Volume 128, No. 1., January 2018, pp 359-368)の図1Dを見ると、C22ヒト化CMT1Aマウスモデル(ヒトPMP22遺伝子を7コピー含む)について、ロータロッド試験で統計的に有意な結果を得るには、ヒトPMP22遺伝子の3'UTRを標的とする最も効果的なASOを、毎週100mg/kg注射する必要があった。毎週50mg/kgでは、統計的な差は得られなかった。同じ試験開始年齢の動物について、本発明の分析では、毎週3.3mg/kgという低用量で注射を行った動物でも、大幅な改善が認められた。若い時に治療を開始した動物の場合、必要なのはわずか1mg/kgであった(図9及び図10を参照のこと)。本発明で用いたC3動物モデルはPMP22遺伝子のコピーが3つしかないのに対し、C22動物は7つのコピーを有する(標的RNAが2.3倍である)が、50mg/kgとは、3.3mg/kg動物よりも15倍高く、1mg/kg動物よりも50倍高い。本記載のエクソンスキッピング手法は、明らかに、投与量あたりの効果の面で3'UTR戦略よりも大幅に有利である。

10

【0123】

軸索での重大な疾患関連病態の改善が、有効性についての重要な代替マーカーとなる。PMP22についての分子変化の観測が軸索病態の改善に繋がったか否かを確認するために、野生型マウス、処置マウス及びスクランブル処置C3マウス由来の様々な軸索を調べた。17mg/kg治療群の動物、野生型動物及びスクランブル対照群のC3動物を、20週齢(上記の17mg/kg治療群の治療の停止から6週間後)で殺した。各動物から神経(坐骨神経、腓骨神経、尺骨神経及び脛骨神経)を取り出し、神経の切片部を調製して透過型電子顕微鏡(TEM)の分析に供した。

20

【0124】

図17(上部)は、WT型動物、未処置動物及び処置動物の坐骨神経の画像を示す図である。図17(下部)は、神経の腓骨部分の画像を示す図である。

【0125】

図18は、各動物の腓骨神経の一部の高倍率TEM画像である。

【0126】

切片の分析から、脱髄、厚さ、構造的完全性及び軸索の壊死頻度に基づき、SHC-012治療により、スクランブル治療の場合の軸索と比べて、複数の神経(図示は坐骨神経)の病態が有意に改善されたことが分かった。SHC-012で処置した場合の軸索よりも、依然として野生型組織のほうが良好であったが、ASOが疾患における上記の重要な構造的特徴の改善をもたらしたことは明白である。尺骨神経と脛骨神経の切片を分析した際にも同様の結果が確認され、使用された皮下注射(動物の背部の首筋)により、分子が動物の身体全体に効果的に分散し、良い影響を与えるのに十分であることを示唆している。

30

【0127】

次に、このような改善の機能的影響を、ミエリン鞘の改善に基づいて調べた。処置C3マウスの機能回復を測定するために、電気生理学的検査を実施した。上記と同じ治療群の治療C3マウス(及び対照である未治療C3マウス)群の治療マウスには、CMAP及びMUNEの改善が検出された(図19)。

40

【0128】

図19(上部)に、鎮静状態のマウスの坐骨胃切片の電気生理学的プロットを示す。図19の下部の表に、各群の3匹の測定対象動物のMUNE及びCMAPの平均値を示す。全身の健康状態、バランス及び可動性の尺度である「ダボ歩行時間」(後述)も含めており、電気生理学的測定結果の改善に追従してダボ歩行の能力が改善することを表している。

【0129】

50

想定される C M T 1 A 治療の注目すべき仕様は、各患者に対する治療が年に 2 ～ 4 回だけで済むという点である。これが可能となり得るのは、P M O A S O がヌクレアーゼ耐性を有し、細胞に取り込まれた後も極めて安定しているからである。S H C - 0 1 2 活性の持続期間と持続性を調べるために、上記の 1 m g / k g 治療群と 1 0 m g / k g 治療群の動物を、最後の治療から 5 か月間監視した (図 2 0)。P M O 分子の (シュワン細胞などの細胞に到達してからの) 半減期は、大半の組織で約 3 ～ 4 か月である。よって、治療効果は長期間持続するものと仮説付けられる。注目すべきは、C 3 動物が治療後 5 か月の時点でもダボ歩行試験で良い結果を維持しており、最後の治療から 4 か月 (試験は長期継続中) 経っても活性がほとんど又は全く低下していないという点である。

【0130】

10

図 2 0 に、双方の治療群の結果を示す (生後 4 か月齢のスクランブル動物の群及び野生型動物を比較のために図示している)。ヒストグラムの各データセットは、各月末の 4 日間のダボ歩行時間の平均値である。つまり、最後にプロットしたデータセットは、7 か月齢の動物を対象としている。

【0131】

実施例 4

P M P 2 2 の R N A のエクソン 4 のスキッピングを行う A S O を、数多く設計した (図 1 1 A 及び図 1 1 B)。2 5 塩基対の長さの A S O を図示しているが、より短いサブセットも想定され、開示されている。5' 末端領域と 3' 末端領域の両方の A S O を設計した。図 3 を参照して、エクソン 4 の 3' 末端と 5' 末端に対し、このような A S O を設計した。図 1 2 に、選択した A S O を細胞アッセイで試験した結果を示す (S H C - 0 2 7 (S E Q I D N O : 1 4 8)、S H C - 0 2 8 (S E Q I D N O : 1 4 7)、S H C - 0 2 9 (S E Q I D N O : 1 4 6)、S H C - 0 3 0 (S E Q I D N O : 1 5 0)、S H C - 0 3 1 (S E Q I D N O : 1 4 9) 及び S H C - 0 3 2 (S E Q I D N O : 1 5 1))。大量のエクソン 4 スキッピング済み産物 (及び P M P 2 2 の全長 m R N A の減少) は、観察され、シーケンシングによって確認された。

20

【0132】

エクソンスキッピング済み産物と全長 P M P 2 2 の両方の存在を定量化できるということが、重要になる (図 1 2)。ゲル内でのバンドを分析し、2 種類の手法によって化合物の「活性」を算出した (図 1 3)。第 1 の方法では、標準試料 (同図に図示せず) 中の P M P 2 2 の全長 m R N A の量を、P M P 2 2 の全長 m R N A の結果量と比較した。従来のノックアウト及び R N A サイレンシングの手法では、(試料中に存在する測定可能な m R N A は 1 種類だけであるため) この方法が唯一可能な方法である。この方法のデータは、実験のばらつきから、図 1 3 の下部の最初の行に示す結果となり、つまり、S H C - 0 2 7 の活性 (%) は負となり、S H C - 0 3 2 の活性は極めて低くなった (< 1 0 %)。いずれの化合物も、効果がないか又は効果が僅かしかないと誤って認定される可能性がある。しかし、全長 m R N A の量とエクソンスキッピング済み m R N A の量 (シーケンシングで確認されたゲル内の下部バンド) を比べることで、化合物の相対活性を極めて正確に特定することができた (これら 2 種類の m R N A の配列長の差については調整済み)。なお、ゲルの各レーン是完全に別々に実行された細胞アッセイである (これらは同じウェルからの複数の注射ではなく、異なるアッセイからの注射である) にもかかわらず、この方法の標準偏差は従来の P M P 2 2 産生減少法よりも遥かに小さくなる。上側の行の定量法 (全長比較) の場合の値は、単に測定ピークを全長標準ピークで割ったものとなる。比率法の場合、エクソンスキッピング済みピークを、サイズに合わせて調整された総 m R N A のピークで割った。

30

40

【0133】

実施例 5

P M P 2 2 のプレ m R N A に対する連続配列ではなく前述したような橋掛け部分を含む、(モルフォリノ骨格を用いた) ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー P M O を数多く設計し、合成した。図 1 4 の上部に、エクソン 3 の 5' 末端と 3' 末端の配列を示し

50

、エクソンにはイントロ部分が隣接している。上部にはギャップ（スペースとその下の「／」という単語）があり、これは、エクソン3のうちの位置20（G）と位置86（C）を結合する部分の図示が省略されていることを示している。図示のように、3'末端と5'末端の双方の部分に対するPMOのSHC-043（SEQ ID NO:156）、SHC-044（SEQ ID NO:159）及びSHC-045（SEQ ID NO:162）を設計した。これらのPMOは（図14で見て取れるように）連続した分子であるが、PMP22のプレmRNAの非連続部分にハイブリダイズするものである。PMP22のプレmRNAにハイブリダイズし、エクソンスキッピング済みmRNA産物の産生と全長mRNAの減少の双方を誘導できるものであるという前提で、上記以外の橋掛け型ASOも想定される。

10

【0134】

これらの化合物は、それらの性能を確かめるために（前述のような）細胞アッセイに適用され、結果が図15に示されており、ここでも、個別に定量化して活性を求めることができる全長産物とエクソンスキッピング産物の両方が示されている。

【0135】

実施例6

PMP22のプレmRNAのエクソン2のエクソンスキッピングを行うASOを、数多く設計した（図16）。本明細書の別の箇所で開示するように、より短い長さのASO及びミスマッチASOも想定する。これらのASOは、エクソン2の3'末端と5'末端に対して設計したものである。

20

【0136】

実施例7

CMT1Aでは、目的の組織にアクセスしてPMP22のプレmRNA、mRNA又はタンパク質に影響が生じているか否かを確認するのに、（研究試験中）動物を殺したりヒト患者に大規模な生検を実施したりすることなく、所与の薬剤の分子レベルでの活性を経時的に監視できるのが望ましい。CMT1Aは、PMP22のレベルに影響を加えるべき組織が末梢神経組織と該組織内における該組織周囲のミエリン鞘シートであり、主にこの領域内のシュワン細胞内でPMP22タンパク質が大量に産生される疾患である。つまり、シュワン細胞に対する薬剤の効果を効果的に測定するには、大規模な組織生検を実施し及び／又は動物を殺して、そのような組織の評価を行う必要がある。このような測定は、薬剤の臨床試験又は治療中のヒト患者では、現実的でないか又は不可能である。つまり、経時的に活性を測定することは、ヒトでは不可能であり、動物でも困難である。実験室での実験では、大規模な動物群を試験対象とし、定期的な殺によってそれらの組織を調べる場合が多い。

30

【0137】

PMP22のプレmRNA及びmRNAの大部分は目的の細胞及び組織内に存在するものの、大規模な生検又は解剖を行わずにアクセスできる血流又は他の生体液中にも、極めて少量ではあるが、双方の物質が検出可能な量で存在する。血液中のこの物質は（そこでは合成されないものの）、身体内部の死滅した細胞血流内へと非特異的に漏れ出したRNAに存在する。損傷した細胞又は非特異的細胞排出物には、これ以外の物質も存在し得る。総mRNAが薬剤の作用機序に応じて減少する従来の薬剤手法では、（運動、食事、代謝、疾患、損傷などによる）自然変動に起因したバックグラウンドのばらつきが大きい中で、薬剤の効果による血流中の総mRNAのほんの僅かな低下を測定することは非現実的である。天然の総mRNAのこのような変動は、24時間全体でも極めて大きい場合があるので、薬剤による僅かな減少を定量化することは現実的でない。特定の実施形態では、エクソンスキッピング用薬剤の不在下では、血流中のエクソンスキッピング済みPMP22の量がほぼゼロとなる。つまり、血流中のエクソンスキッピング済みmRNAの量を定量化した場合、それは薬剤の活性と正比例することになる。さらに定量化するためには、血流中のエクソンスキッピング済みmRNAに対するPMP22の全長mRNAの量の比率を任意の時点で比較して薬剤活性を確認し、定量化する。例えば、患者に薬剤を与えて

40

50

から1日も経てば、薬剤は、身体全体をめぐって効果的に分布し、目的の組織及び細胞に入るのに十分な時間がある。その時点で、所与の薬剤組成及び用量に応じた、細胞レベルでのほぼ最大量のPMP22タンパク質の新規産生が得られるはずである。血液中のエクソンスキッピング済みmRNAの濃度は、血液から長期間にわたって定期的に監視したり薬剤活性と相関させることが可能である。さらに好ましいのは、全長mRNAとエクソンスキッピング済みmRNAの両方を定量化し、その比率を薬剤活性と相関付けることである。この方法は、測定値にインターナルコントロールを与えられ、アッセイ測定を簡素化し、精度を向上させる。その数値が時間の経過とともに減少する（薬物を含まない新しい細胞の形成や、薬剤の活性の低下などを示唆している）ため、その時点で、選択された薬剤の追加投与量を与えることにより、エクソンスキッピングを所望の値にて再平衡化させることができる。

10

【0138】

血液中のエクソンスキッピング済みmRNAを測定するという本開示の手法により、患者ごとに初期用量を調節したり、臨床試験の用量漸増試験時の初期用量を調節したりすることも可能になる。CMT1A（及びその他の疾患）では、（正味の分子生物学的活性と比べて）実際の測定値のバラつきは、患者によってひどくなる可能性がある。結果が不正確であると、患者に対する過小投与（つまり、薬剤活性範囲からのズレ）や、患者に対する大幅な過剰投与（危険な副作用が発生する可能性）につながる場合がある。数多くの要因から、別々の2人の患者では、PMP22の所望の低下レベルを達成するために必要な薬剤量が異なる可能性がある。例えば、PMP22のタンパク質産生の50%を阻止することが望ましい場合には、身体の小さい患者のほうは、体重の重い患者よりも必要な薬剤が少ない場合がある。代謝やライフスタイルが異なる患者同士では、最適な分子変化を達成するために必要な、各治療ごとの薬剤量が異なる場合もある。（本開示で説明されるように）自然には発生しない安定したmRNA産物を動物や患者内で生じさせることで、これらの測定が可能になる。

20

【0139】

実施例8

CMTの治療で重要となる検討事項は、疾患が長期間進行して他の患者よりも多くの軸索損傷を抱えている可能性がある高齢患者に対し、どのようにすれば治療を効果的なものにできるのかということである。C3動物を3ヶ月齢まで成長させ、前述のように吊り下げダボを歩行する歩行能力について監視した。治療に先立って、ダボを歩行するにかかった時間量を監視した。次いで、動物に毎週17mg/kgのSCH-012で6週間処置し、その後、さらに6週間（処置せず）成長させて、その歩行能力を再度監視した。

30

【0140】

図21に、この実験の結果を示す（比較のために3ヶ月齢の野生型動物もプロットしている）。見て取れるように、この動物の群は、3ヶ月齢での能力が極めて悪かった（平均ダボ歩行時間＝18.1秒、標準偏差＝7.1秒）。治療と回復期間を経た後、同動物は平均歩行時間＝7.1秒、標準偏差2.4秒まで大幅に改善した。図示のグラフの各棒は、動物を4日間（2日おき）測定し、これらの時点の平均値を示した。

【0141】

40

実施例9

C3動物の別の群を、12ヶ月齢まで処置せず成長させた。野生型動物でも、12ヶ月齢になると、歩行能力及びバランス能力の低下がいくらか見られ始めるため、野生型動物も試験に含めた。12ヶ月齢にて、C3動物の処置を行った（表1）。治療群1、2、3、5、6及び7については、各群に5匹の動物を試験対象とし、群4及び5については、4匹の動物を試験対象とした。

50

【表 1】

表 1

群	動物の 種類	治療内容	治療日	試験時 点 1	試験時 点 2	試験時 点 3	屠殺
1	C 3	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g	1 日 目	0 日 目	8 日 目		8 日 目
2	C 3	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g	1 日 目	0 日 目	3 0 日 目		3 0 日 目
3	C 3	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g	1 日 目	0 日 目		6 0 日 目	6 0 日 目
4	C 3	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g - 2	1 日 目、 3 1 日 目	0 日 目	3 0 日 目	6 0 日 目	6 0 日 目
5	C 3	S H C 1 A - 0 1 2 5 m g / k g - 2	1 日 目、 3 1 日 目	0 日 目	3 0 日 目	6 0 日 目	6 0 日 目
6	C 3	5 0 m g / k g ス クランブル	1 日 目	0 日 目			
7	W T	なし	なし	0 日 目			

10

【 0 1 4 2 】

表 2 に、試験の成績の結果をそのまま示す。ダボ歩行時間については、以前と同じ装置を使用し、各動物の時間（秒単位で）を 2 日続けて記録し、両日を利用して算出したものを群の平均値とした。握力については、各データセットは、1 日に試験した群全体の前足握力（グラムでの 2 5 ニュートンの引張設定）である。

20

【表 2】

表 2

群	治療内容	ダボ歩行時間			握力		
		1 回 目	2 回 目	3 回 目	1 回 目	2 回 目	3 回 目
1	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g	1 4 . 2	1 5 . 8		5 3	5 4	
2	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g	1 5 . 1	1 1 . 2		3 8	5 8	
3	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g	1 3 . 4	1 1 . 6		4 0	5 6	
4	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g - 2	1 6 . 1	1 0 . 8	7 . 3	2 0	3 8	7 2
5	S H C 1 A - 0 1 2 5 m g / k g - 2	1 4 . 3	1 3 . 9	8 . 5	4 0	4 4	4 4
6	5 0 m g / k g ス クランブル	1 6 . 5	8 . 8		4 3	4 3	
7	なし	7 . 2	6 . 5		9 9	9 2	

30

40

【 0 1 4 3 】

表 3 に、表 2 のデータについての（各群の 1 日目と個別に比べた場合の）平均改善率を示す。例えば、群 2 のダボ歩行時間では（時間の短縮が歩行の改善であるため）、同群の動物は、治療前と治療後とで平均 2 6 % の歩行能力の改善を示した。能力試験日が 2 日（3 0 日目と 6 0 日目）あった群 4 と群 5 の動物の各時点での改善率は、最初の試験前データの改善率と比較される。例えば、群 4 の動物の握力は、治療前の値と比べて、1 回目の治療後（1 回目から 2 回目）に 9 0 % 改善し、6 0 日目では 2 5 6 % 改善した。握力のプラス増加は、改善を表している。

50

【表 3】

表 3

群	改善率 治療内容	ダボ歩行時間		握力	
		1 回目か ら 2 回目	2 回目か ら 3 回目	1 回目 から 2 回目	2 回目 から 3 回目
1	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g	1 1 %		3 %	
2	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g	- 2 6 %		5 5 %	
3	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g	- 1 3 %		3 9 %	
4	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g - 2	- 3 3 %	- 5 5 %	9 0 %	2 5 6 %
5	S H C 1 A - 0 1 2 5 m g / k g - 2	- 3 %	- 4 0 %	1 0 %	1 1 %
6	5 0 m g / k g ス クランブル	- 4 6 %		0 %	
7	なし	- 1 0 %		- 7 %	

10

【0 1 4 4】

20

本実施例では、表 1 に示す 殺時点の後、神経を取り出して定量 P C R 分析に供して、神経に存在するヒト P M P 2 2 の m R N A の総量を求めた。S H C - 0 1 2 が効果的であれば、スクランブル処置動物と比べて、ヒト P M P 2 2 の m R N A の量が減少するはずである。表 4 に、全ての動物のデータを示す。減少率としては、スクランブル群の P M P 2 2 の m R N A の量を求め、（スクランブル対照に比較して）各治療群の減少率を算出した。

【表 4】

表 4

ヒト P M P 2 2 の減少率			
群	治療内容	屠殺時点	
1	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g	1 週 間 目	6 1 %
2	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g	2 か 月 目	9 6 %
3	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g	1 か 月 目	9 6 %
4	S H C 1 A - 0 1 2 5 0 m g / k g - 2	2 か 月 目	8 6 %
5	S H C 1 A - 0 1 2 5 m g / k g - 2	2 か 月 目	9 5 %

30

40

【0 1 4 5】

上記の能力データについては、治療日の違いで値に影響を生じるか否かを調べるために、野生型動物も監視対象に含めた。表 3 でのその値は、影響が小さいことを示しているが、これは単に試験のばらつきによる可能性が高い（歩行時間は 1 0 % の改善、握力は 7 % の悪化）。

【0 1 4 6】

本開示の特定の実施形態は、以下の番号付き段落のいずれかで定義することができる：

【0 1 4 7】

50

【段落 1】 アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を含む組成物であって、ASO が、PMP22 のプレmRNA の標的領域に対して相補的であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、相補的領域を含むか又はそれらからなり、

細胞内で ASO の相補的領域が PMP22 のプレmRNA の標的領域に結合することで、RNA 転写時のエクソンスキッピングが誘導され、それによって PMP22 の全長 mRNA の産生が抑制され、PMP22 のエクソンスキッピング済み mRNA が産生される、組成物。

【0148】

【段落 2】

ASO が、PMP22 のプレmRNA の標的領域に対して相補的であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 又は 24 個の連続するヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなり、又は、

PMP22 のプレmRNA の標的領域が、該 PMP22 のプレmRNA の 2 つの別々のセグメントを含み、任意選択的に、ASO が、PMP22 のプレmRNA の標的領域の連続した配列の第 1 のセグメントに対して相補的であるか、又は 1、2 若しくは 3 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約 6、8、9、10、11 又は 12 個のヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなり、ASO が、PMP22 のプレmRNA の標的領域の連続した配列の第 2 のセグメントに対して相補的であるか、又は 1、2 若しくは 3 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約 6、8、9、10、11 又は 12 個のヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる、段落 1 に記載の組成物。

【0149】

【段落 3】 ASO が、PMP22 のプレmRNA の標的領域に対して相補的であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、約 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40 又は 45 個のいずれかから約 13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45 又は 50 個のいずれかまでのヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなり、

任意選択的に、ASO が、PMP22 のプレmRNA の標的領域に対して相補的であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 又は 25 個のヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる、段落 1 又は 2 に記載の組成物。

【0150】

【段落 4】 ASO が、修飾及び／又は合成オリゴヌクレオチドであり、

任意選択的に、ASO が、ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー（PMO）である、段落 1 から 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【0151】

【段落 5】 下流エクソンが依然として発現されている、段落 1 から 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【0152】

【段落 6】 エクソンスキッピングによって下流エクソンがフレーム外になる、段落 1 から 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【0153】

【段落 7】 PMP22 のプレmRNA の標的領域が、コーディングエクソンのうちの 1 つのイントロン／エクソンジャンクションにまたがり、

任意選択的に、イントロン／エクソンジャンクションのエクソン部分が、PMP22 の

10

20

30

40

50

エクソン 3 を含み、及び／又は、

任意選択的に、イントロン／エクソンジャンクションのエクソン部分が、PMP 22 のエクソン 4 を含む、段落 1 から 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【0154】

【段落 8】PMP 22 のプレ mRNA の標的領域が、エクソンの 5' 末端を含む、段落 1 から 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【0155】

【段落 9】PMP 22 のプレ mRNA の標的領域が、エクソンの 3' 末端を含む、段落 1 から 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【0156】

【段落 10】PMP 22 のプレ mRNA の標的領域が、イントロンの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 又は 12 個のヌクレオチドとエクソンの一部とを含むか又はそれらからなるイントロン／エクソンジャンクションにまたがり、

任意選択的に、PMP 22 のプレ mRNA の標的領域が、イントロンの 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 又は 12 個のヌクレオチドとエクソンの一部とからなる、段落 7 から 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【0157】

【段落 11】PMP 22 のプレ mRNA の標的領域が、エクソンの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 又は 12 個のヌクレオチドとイントロンの一部とを含むか又はそれらからなるイントロン／エクソンジャンクションにまたがり、

任意選択的に、PMP 22 のプレ mRNA の標的領域が、エクソンの 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 又は 12 個のヌクレオチドとイントロンの一部とからなる、段落 7 から 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【0158】

【段落 12】PMP 22 のプレ mRNA の標的領域が、SEQ ID NO: 2 (エクソン 3、5' 末端)、SEQ ID NO: 35 (エクソン 3、3' 末端)、SEQ ID NO: 76 (エクソン 4、5' 末端)、SEQ ID NO: 111 (エクソン 4、3' 末端)、SEQ ID NO: 163 (エクソン 2、5' 末端) 及び／又は SEQ ID NO: 198 (エクソン 2、3' 末端)、又は、その一部又はサブセット／断片を含むか又はそれらからなる、段落 1 から 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【0159】

【段落 13】前記 ASO が、SEQ ID NO: 2 (エクソン 3、5' 末端)、SEQ ID NO: 35 (エクソン 3、3' 末端)、SEQ ID NO: 76 (エクソン 4、5' 末端)、SEQ ID NO: 111 (エクソン 4、3' 末端)、SEQ ID NO: 163 (エクソン 2、5' 末端) 及び／又は SEQ ID NO: 198 (エクソン 2、3' 末端) に対して相補的であるか、又は 1、2、3、4 若しくは 5 つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、相補的領域を含むか又はそれらからなり、

任意選択的に、ASO が、SEQ ID NO: 3~34 (エクソン 3、5' 末端)、SEQ ID NO: 37~70 (エクソン 3、3' 末端)、SEQ ID NO: 77~110 (エクソン 4、5' 末端)、SEQ ID NO: 112~145 (エクソン 4、3' 末端)、SEQ ID NO: 164~197 (エクソン 2、5' 末端) 又は SEQ ID NO: 199~232 (エクソン 2、3' 末端) のヌクレオチド配列、又は、PMP 22 のプレ mRNA にハイブリダイズするのに十分なその断片を含むか又はそれらからなり、又は、

ASO が、1、2 又は 3 つのヌクレオチド置換を有することを除いて、SEQ ID NO: 3~34 (エクソン 3、5' 末端)、SEQ ID NO: 37~70 (エクソン 3、3' 末端)、SEQ ID NO: 77~110 (エクソン 4、5' 末端)、SEQ ID NO: 112~145 (エクソン 4、3' 末端)、SEQ ID NO: 164~197 (エクソン 2、5' 末端) 又は SEQ ID NO: 199~232 (エクソン 2、3' 末端) のヌクレオチド配列、又は PMP 22 のプレ mRNA にハイブリダイズするの

10

20

30

40

50

に十分なその断片を含むか又はそれらからなる、段落 1 2 に記載の組成物。

【0160】

〔段落 1 4〕

A S O が、

SEQ ID NO: 71 (SHC-006 25-mer)、

SEQ ID NO: 72 (SHC-001 24-mer)、

SEQ ID NO: 73 (SHC-005 25-mer)、

SEQ ID NO: 74 (SHC-010 21-mer)、

SEQ ID NO: 75 (SHC-012 20-mer)、

SEQ ID NO: 146 (SHC-029 21-mer)、

SEQ ID NO: 147 (SHC-028 20-mer)、

SEQ ID NO: 148 (SHC-027 20-mer)、

SEQ ID NO: 149 (SHC-031 21-mer)、

SEQ ID NO: 150 (SHC-030 20-mer)、

SEQ ID NO: 151 (SHC-032 20-mer)、

SEQ ID NO: 156、

SEQ ID NO: 159、

SEQ ID NO: 162、

SEQ ID NO: 235、又は

SEQ ID NO: 238 の核酸配列を含むか又はそれらからなり、

あるいは、A S O が、1、2 又は 3 つのヌクレオチド置換を有することを除いて、

SEQ ID NO: 71 (SHC-006 25-mer)、

SEQ ID NO: 72 (SHC-001 24-mer)、

SEQ ID NO: 73 (SHC-005 25-mer)、

SEQ ID NO: 74 (SHC-010 21-mer)、

SEQ ID NO: 75 (SHC-012 20-mer)、

SEQ ID NO: 146 (SHC-029 21-mer)、

SEQ ID NO: 147 (SHC-028 20-mer)、

SEQ ID NO: 148 (SHC-027 20-mer)、

SEQ ID NO: 149 (SHC-031 21-mer)、

SEQ ID NO: 150 (SHC-030 20-mer)、

SEQ ID NO: 151 (SHC-032 20-mer)、

SEQ ID NO: 156、

SEQ ID NO: 159、

SEQ ID NO: 162、

SEQ ID NO: 235、又は

SEQ ID NO: 238 の、核酸配列を含むか又はそれらからなる、段落 1 に記載

の組成物。

【0161】

〔段落 1 5〕細胞内での P M P 2 2 の全長 m R N A の発現量を減少させる方法であって、段落 1 から 1 4 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O) を含む組成物を細胞に投与すること、を含み、

任意選択的に、P M P 2 2 のエクソスキッピング済み m R N A が産生され、及び／又は、

任意選択的に、細胞内で産生された機能性 P M P 2 2 タンパク質の量が減少する、方法。

【0162】

〔段落 1 6〕A S O に応じて、細胞内での P M P 2 2 の全長 m R N A の量が、少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、40 %、50 %、60 %、75 % 又は 95 % 減少し、

及び／又は、

A S O に応じて、細胞内での P M P 2 2 の m R N A の量が、約 2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 又は 9 5 % 以下減少する、段落 1 5 に記載の方法。

【0163】

〔段落 1 7〕 A S O に応じて、細胞内での P M P 2 2 の全長 m R N A の量が、約 5 %、1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 % 又は 7 5 % のいずれかから約 2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 又は 9 5 % のいずれかまで減少する、段落 1 5 又は 1 6 に記載の方法。

【0164】

〔段落 1 8〕

A S O に応じて、細胞内での機能性 P M P 2 2 タンパク質の量が、少なくとも約 5 %、1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 5 % 又は 9 5 % 減少し、

及び／又は、

A S O に応じて、細胞内での機能性 P M P 2 2 タンパク質の量が、約 2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 又は 9 5 % 以下減少する、段落 1 5 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【0165】

〔段落 1 9〕 A S O に応じて、細胞内での機能性 P M P 2 2 タンパク質の量が、約 5 %、1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 % 又は 7 5 % のいずれかから約 2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 又は 9 5 % のいずれかまで減少する、段落 1 7 又は 1 8 に記載の方法。

【0166】

〔段落 2 0〕 P M P 2 2 のプレ m R N A 内のイントロンとエクソンとの間のジャンクションを標的とすることを含む、段落 1 5 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【0167】

〔段落 2 1〕 P M P 2 2 のエクソンスキッピング済みプレ m R N A を産生する方法であって、段落 1 から 1 4 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド（A S O）を含む組成物を細胞に投与することを含む、方法。

【0168】

〔段落 2 2〕 細胞内での P M P 2 2 の全長 m R N A の発現量が減少し、

任意選択的に、細胞内で産生された機能性 P M P 2 2 タンパク質の量が減少する、段落 2 1 に記載の方法。

【0169】

〔段落 2 3〕 方法は、P M P 2 2 のプレ m R N A 内のイントロンとエクソンとの間のジャンクションを標的とすることを含む、段落 2 1 又は 2 2 に記載の方法。

【0170】

〔段落 2 4〕 シャルコー・マリー・トゥース病を治療する方法であって、該治療を必要とする対象に、段落 1 から 1 4 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド（A S O）を含む組成物を投与することを含む、方法。

【0171】

〔段落 2 5〕 A S O が薬学的に許容される塩として投与される、段落 2 4 に記載の方法。

【0172】

〔段落 2 6〕 A S O が、薬学的に許容される担体又は希釈剤で投与される、段落 2 4 又は 2 5 に記載の方法。

【0173】

〔段落 2 7〕 疾患の少なくとも 1 つの症状が軽減される、段落 2 4 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0174】

〔段落28〕疾患の少なくとも1つの症状の進行速度が低下する、段落24から26のいずれか一項に記載の方法。

【0175】

〔段落29〕組成物を投与する投与計画が対象の年齢に基づく、段落24から28のいずれか一項に記載の方法。

【0176】

〔段落30〕組成物を投与する投与計画が、対象の症状の進行に基づく、段落24から29のいずれか一項に記載の方法。

【0177】

〔段落31〕組成物を投与する投与計画が、対象の総体重に基づく、段落24から30のいずれか一項に記載の方法。

【0178】

〔段落32〕組成物を投与する投与計画が、対象の身体能力に基づく、段落24から31のいずれか一項に記載の方法。

【0179】

〔段落33〕症状の重症度及び／又は年齢の高さに基づき、一定期間のあいだ対象に組成物の高い投与量又は負荷投与が与えられ、その投与量が後で低い投与量に変更される、段落24から32のいずれか一項に記載の方法。

【0180】

〔段落34〕アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を含む組成物であって、ASOが、PMP22のプレmRNAの標的領域に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、相補的領域を含むか又はそれらからなり、

PMP22のプレmRNAの標的領域が、コーディングエクソンのうちの1つのイントロン／エクソンジャンクションを含む、組成物。

【0181】

〔段落35〕

ASOが、PMP22のプレmRNAの標的領域に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23又は24個の連続するヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなり、又は、

PMP22のプレmRNAの標的領域が、該PMP22のプレmRNAの2つの別々のセグメントを含み、任意選択的に、ASOが、PMP22のプレmRNAの標的領域の連続した配列の第1のセグメントに対して相補的であるか、又は1、2若しくは3つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約6、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなり、ASOが、PMP22のプレmRNAの標的領域の連続した配列の第2のセグメントに対して相補的であるか、又は1、2若しくは3つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、少なくとも約6、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる、段落34に記載の組成物。

【0182】

〔段落36〕ASOが、PMP22のプレmRNAの標的領域に対して相補的であるか、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40又は45個のいずれかから約13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45又は50個のいずれかまでの連続したヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなり、

任意選択的に、ASOが、PMP22のプレmRNAの標的領域に対して相補的である

10

20

30

40

50

か、又は1、2、3、4若しくは5つのミスマッチヌクレオチドを除いて相補的である、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25個の連続したヌクレオチドの相補的領域を含むか又はそれらからなる、段落34又は35に記載の組成物。

【0183】

【段落37】

イントロン／エクソジャンクションのエクソン部分が、PMP22のエクソン3を含み、及び／又は、

イントロン／エクソジャンクションのエクソン部分が、PMP22のエクソン4を含む、段落34から36のいずれか一項に記載の組成物。

【0184】

【段落38】 PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソンの3'末端を含む、段落34から37のいずれか一項に記載の組成物。

【0185】

【段落39】 PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソンの5'末端を含む、段落34から37のいずれか一項に記載の組成物。

【0186】

【段落40】 PMP22のプレmRNAの標的領域が、イントロンの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドとエクソンの一部とを含むイントロン／エクソジャンクションを含み、

任意選択的に、PMP22のプレmRNAの標的領域が、イントロンの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドとエクソンの一部とを含むか又はそれらからなる、段落34から39のいずれか一項に記載の組成物。

【0187】

【段落41】 PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソンの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個のヌクレオチドとイントロンの一部とを含むイントロン／エクソジャンクションを含み、

任意選択的に、PMP22のプレmRNAの標的領域が、エクソンの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11若しくは12個のヌクレオチドとイントロンの一部とを含むか又はそれらからなるものであってもよい、段落34から40のいずれか一項に記載の組成物。

【0188】

【段落42】 ASOが、修飾及び／又は合成オリゴヌクレオチドであり、

任意選択的に、ASOが、ホスホロジアミデートモルフォリノオリゴマー（PMO）である、段落34から41のいずれか一項に記載の組成物。

【0189】

【段落43】 PMP22のプレmRNAの標的領域が、SEQ ID NO: 2（エクソン3、5'末端）、SEQ ID NO: 35（エクソン3、3'末端）、SEQ ID NO: 76（エクソン4、5'末端）、SEQ ID NO: 111（エクソン4、3'末端）、SEQ ID NO: 163（エクソン2、5'末端）及び／又はSEQ ID NO: 198（エクソン2、3'末端）を含むか又はそれらからなる、段落34から42のいずれか一項に記載の組成物。

【0190】

本開示の外延及び範囲は、前述した例示的な実施形態のいずれかによっても制限されるべきではなく、添付の特許請求の範囲及びそれらの均等物のみに従って定まるべきである。

【0191】

参考文献

Krajewski KM, Lewis RA, Fuerst DR, Turansky C, Hinderer SR, Garbern J, Kamholz J, Shy ME. Neurological dysfunction and axonal deg

10

20

30

40

50

eneration in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain : a journal of neurology*. 2000;123 (Pt 7) :1516-27. Epub 2000/06/27. doi:10.1093/brain/123.7.1516. PubMed PMID:10869062.

Braathen GJ. Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2012 (193) :iv-22. Epub 2012/11/01. doi:10.1111/ane.12013. PubMed PMID:23106488.

Patel PI, Roa BB, Welcher AA, Schoener-Scott R, Trask BJ, Pentao L, Snipes GJ, Garcia CA, Francke U, Shooter EM, Lupski JR, Suter U. The gene for the peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nature genetics*. 1992;1 (3) :159-65. Epub 1992/06/01. doi:10.1038/ng0692-159. PubMed PMID:1303228.

Timmerman V, Nelis E, Van Hul W, Nieuwenhuijsen BW, Chen KL, Wang S, Ben Othman K, Cullen B, Leach RJ, Hanemann CO, et al. The peripheral myelin protein gene PMP-22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Nature genetics*. 1992;1 (3) :171-5. Epub 1992/06/01. doi:10.1038/ng0692-171. PubMed PMID:1303230.

Valentijn LJ, Bolhuis PA, Zorn I, Hoogendijk JE, van den Bosch N, Hensels GW, Stanton VP, Jr., Housman DE, Fischbeck KH, Ross DA, et al. The peripheral myelin gene PMP-22/GAS-3 is duplicated in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nature genetics*. 1992;1 (3) :166-70. Epub 1992/06/11. doi:10.1038/ng0692-166. PubMed PMID:1303229.

Matsunami N, Smith B, Ballard L, Lensch MW, Robertson M, Albertsen H, Hanemann CO, Muller HW, Bird TD, White R, et al. Peripheral myelin protein-22 gene maps in the duplication in chromosome 17p11.2 associated with Charcot-Marie-Tooth 1A. *Nature genetics*. 1992;1 (3) :176-9. Epub 1992/06/01. doi:10.1038/ng0692-176. PubMed PMID:1303231.

Lee S, Amici S, Tavori H, Zeng WM, Freeland S, Fazio S, Notterpek L. PMP22 is critical for actin-mediated cellular functions and for establishing lipid rafts. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014;34 (48) :16140-52. Epub 2014/11/28. doi:10.1523/JNEUROSCI.1908-14.2014. PubMed PMID:2542

10

20

30

40

50

9154;PMCID:PMC4244477.

Mittendorf KF, Marinko JT, Hampton CM, Ke Z, Hadziselimovic A, Schleich JP, Law CL, Li J, Wright ER, Sanders CR, Ohi MD. Peripheral myelin protein 22 alters membrane architecture. *Sci Adv.* 2017;3(7):e1700220. Epub 2017/07/12. doi:10.1126/sciadv.1700220. PubMed PMID:28695207;PMCID:PMC5498104.

Snipes GJ, Suter U, Welcher AA, Shooter EM. Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *The Journal of cell biology.* 1992;117(1):225-38. Epub 1992/04/01. doi:10.1083/jcb.117.1.225. PubMed PMID:1556154;PMCID:PMC2289391.

Magyar JP, Martini R, Ruelicke T, Aguzzi A, Adlkofer K, Dembic Z, Zielasek J, Toyka KV, Suter U. Impaired differentiation of Schwann cells in transgenic mice with increased PMP22 gene dosage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1996;16(17):5351-60. Epub 1996/09/01. PubMed PMID:8757248;PMCID:PMC6578876.

Sereda M, Griffiths I, Puhlhofer A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmerman F, Magyar JP, Schneider A, Hund E, Meinck HM, Suter U, Nave KA. A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron.* 1996;16(5):1049-60. Epub 1996/05/01. doi:10.1016/s0896-6273(00)80128-2. PubMed PMID:8630243.

Huxley C, Passage E, Manson A, Putzu G, Figarella-Branger D, Pellissier JF, Fontes M. Construction of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A by pronuclear injection of human YAC DNA. *Human molecular genetics.* 1996;5(5):563-9. Epub 1996/05/01. doi:10.1093/hmg/5.5.563. PubMed PMID:8733121.

Perea J, Robertson A, Tolmachova T, Muddle J, King RH, Ponsford S, Thomas PK, Huxley C. Induced myelination and demyelination in a conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Human molecular genetics.* 2001;10(10):1007-18. Epub 2001/05/02. doi:10.1093/hmg/10.10.1007. PubMed PMID:11331611.

Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, Swanson PD, Odelberg SJ, Distèche CM, Bird TD. DNA deletion as

sociated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell*. 1993; 72 (1) : 143–51. Epub 1993/01/15. doi:10.1016/0092-8674(93)90058-x. PubMed PMID: 8422677.

Zhao HT, Damle S, Ikeda-Lee K, Kuntz S, Li J, Mohan A, Kim A, Hung G, Scheideler MA, Scherer SS, Svaren J, Swayze EE, Kordasiewicz H B. PMP22 antisense oligonucleotides reverse Charcot-Marie-Tooth disease type 1A features in rodent models. *The Journal of clinical investigation*. 2018;128 (1) : 359–68. Epub 2017/12/05. doi:10.1172/JCI96499. PubMed PMID: 29202483; PMCID: PMC5749515.

Boutary, Suzan et al. 「Squalenoyl siRNA PMP22 nanoparticles are effective in treating mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1 A.」 *Communications biology* vol. 4, 1 317. 9 Mar. 2021, doi:10.1038/s42003-021-01839-2.

Cornett, Kayla M D et al. 「Natural history of Charcot-Marie-Tooth disease during childhood.」 *Annals of neurology* vol. 82, 3 (2017) : 353–359. doi:10.1002/ana.25009 18. Cortese, Andrea et al. 「Targeted next-generation sequencing panels in the diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease.」 *Neurology* vol. 94, 1 (2020) : e51–e61. doi:10.1212/WNL.0000000000008672.

Eichinger, Katy et al. 「The Charcot-Marie-Tooth Functional Outcome Measure (CMT FOM).」 *Neurology* vol. 91, 15 (2018) : e1381–e1384. doi:10.1212/WNL.00000000000006323.

Gautier, Benoit et al. 「AAV2/9-mediated silencing of PMP22 prevents the development of pathological features in a rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A.」 *Nature communications* vol. 12, 1 2356. 21 Apr. 2021, doi:10.1038/s41467-021-22593-3 21. Kagiava, A et al. 「Intrathecal gene therapy in mouse models expressing CMT1X mutations.」 *Human molecular genetics* vol. 27, 8 (2018) : 1460–1473. doi:10.1093/hmg/ddy056.

Lee, Ji-Su et al. 「Targeted PMP22 TATA-box editing by CRISPR/Cas9 reduces demyelinating neuropathy of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A in mice.」 *Nucleic acids research* vol. 48, 1 (2020) : 130–140. doi:10.1093/nar/gkz1070.

Massade, Liliane, 及び Charbel Massaad. 「Antis

10

20

30

40

50

ense RNA Targeting PMP22 for the Treatment of Charcot Marie-Tooth 1A Disease.] EP O Patent 18306241. 3. 1 Apr. 2020.

Morelli, Kathryn H et al. 「Allele-specific RNA interference prevents neuropathy in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D mouse models.» The Journal of clinical investigation vol. 129, 12 (2019) : 5568-5583. doi: 10.1172/JCI130600.

Reynolds, Angela et al. 「Rational siRNA design for RNA interference.» Nature biotechnology vol. 22, 3 (2004) : 326-30. doi: 10.1038/nbt936 26. Sandelius, Asa et al. 「Plasma neurofilament light chain concentration in the inherited peripheral neuropathies.» Neurology vol. 90, 6 (2018) : e518-e524. doi: 10.1212/WNL.0000000000004932.

Schorling, Elisabeth et al. 「Cost of illness in Charcot-Marie-Tooth neuropathy: Results from Germany.» Neurology vol. 92, 17 (2019) : e2027-e2037. doi: 10.1212/WNL.0000000000007376

Stavrou, Marina et al. 「Emerging Therapies for Charcot-Marie-Tooth Inherited Neuropathies.» International journal of molecular sciences vol. 22, 11 6048. 3 Jun. 2021, doi: 10.3390/ijms22116048.

Stavrou, Marina et al. 「Genetic mechanisms of peripheral nerve disease.» Neuroscience letters vol. 742 (2021) : 135357. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135357.

Tozza, S et al. 「Motor performance deterioration accelerates after 50 years of age in Charcot-Marie-Tooth type 1A patients.» European journal of neurology vol. 25, 2 (2018) : 301-306. doi: 10.1111/ene.13494.

Wang, Hongge et al. 「MicroRNAs as Biomarkers of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A.» Neurology vol. 97, 5 (2021) : e489-e500. doi: 10.1212/WNL.00000000000012266.

Wang, Hongge et al. 「Transmembrane protease serine 5: a novel Schwann cell plasma marker for CMT1A.» Annals of clinical and translational neurology vol. 7, 1 (2020) : 69-82. doi: 10.1002/acn3.50965.

Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontes M. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth

10

20

30

40

50

th disease. *Nat Med*. 2004;10(4):396-401. doi:10.1038/nm1023. PubMed PMID:15034573.

Gess B, Baets J, De Jonghe P, Reilly MM, Pareyson D, Young P. Ascorbic acid for the treatment of Charcot-Marie-Tooth disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015(12):CD011952. Epub 2015/12/15. doi:10.1002/14651858.CD011952. PubMed PMID:26662471; PMCID:PMC6823270.

Pareyson D, Reilly MM, Schenone A, Fabrizi GM, Cavallaro T, Santoro L, Vita G, Quattrone A, Padua L, Gemignani F, Visioli F, Laura M, Radice D, Calabrese D, Hughes RA, Solarì A, Cmt T, groups C-T. Ascorbic acid in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAL及びCMT-TRAUK): a double-blind randomised trial. *Lancet Neurol*. 2011;10(4):320-8. doi:10.1016/S1474-4422(11)70025-4. PubMed PMID:21393063; PMCID:PMC3154498.

Pareyson D, Schenone A, Fabrizi GM, Santoro L, Padua L, Quattrone A, Vita G, Gemignani F, Visioli F, Solarì A, Group C-T. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of long-term ascorbic acid treatment in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAL): the study protocol [EudraCT no.: 2006-000032-27]. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2006;54(6):436-41. Epub 2006/10/13. doi:10.1016/j.phrs.2006.09.001. PubMed PMID:17029975.

Meyer zu Horste G, Prukop T, Liebetanz D, Mobius W, Nave KA, Sereda MW. Antiprogesterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Ann Neurol*. 2007;61(1):61-72. doi:10.1002/ana.21026. PubMed PMID:17262851.

Sereda MW, Meyer zu Horste G, Suter U, Uzma N, Nave KA. Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med*. 2003;9(12):1533-7. doi:10.1038/nm957. PubMed PMID:14608378.

Prukop T, Stenzel J, Wernick S, Kungl T, Mroczek M, Adam J, Ewers D, Nabirotschkin S, Nave KA, Hajj R, Cohen D, Sereda MW. Early short-term PXT3003 combinational therapy delays disease onset in a transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A (CMT

10

20

30

40

50

1A). PLoS One. 2019;14(1):e0209752. doi:10.1371/journal.pone.0209752. PubMed PMID:30650121;PMCID:PMC6334894. [Pharnext, the employer of Serguei Nabirovitchkin, Rodolphe Hajj及びDaniel Cohen. DC, RH, MWS, TP 及び KAN submitted a patent based on this work: Full patent name: Early treatment of CMT disease Number:US2018/0000813. MWS, TP 及び KAN act as consultants to Pharnext. PXT3003 achieved a Phase 3 trial in CMT1A adult patients. There are no further patents related to this study, or marketed products to declare. This does not alter our adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.]

Sociali G, Visigalli D, Prukop T, Cervellini I, Mannino E, Venturi C, Bruzzone S, Sereda MW, Schenone A. Tolerability and efficacy study of P2X7 inhibition in experimental Charcot-Marie-Tooth type 1A (CMT1A) neuropathy. Neurobiol Dis. 2016;95:145-57. doi:10.1016/j.nbd.2016.07.017. PubMed PMID:27431093.

Verhamme C, King RH, ten Asbroek AL, Muddle JR, Nourallah M, Wolterman R, Baas F, van Schaik IN. Myelin and axon pathology in a long-term study of PMP22-overexpressing mice. Journal of neuropathology and experimental neurology. 2011;70(5):386-98. Epub 2011/04/14. doi:10.1097/NEN.0b013e318217eba0. PubMed PMID:21487305.

Landis SC, Amara SG, Asadullah K, Austin CP, Blumenstein R, Bradley EW, Crystal RG, Darnell RB, Ferrante RJ, Fillit H, Finkelstein R, Fisher M, Gendelman HE, Golub RM, Goudreau JL, Gross RA, Gubitza AK, Hesterlee SE, Howells DW, Huguenard J, Kelner K, Koroshetz W, Krainc D, Lazic SE, Levine MS, Macleod MR, McCall JM, Moxley RT, 3rd, Narasimhan K, Noble LJ, Perrin S, Porter JD, Steward O, Unger E, Utz U, Silberberg SD. A call for transparent reporting to optimize the predictive value of preclinical research. Nature. 2012;490(7419):187-91. Epub 2012/10/13. doi:10.1038/nature11556. PubMed PMID:23060188;PMCID:3511845.

FDA. Current Good Manufacturing Practice for Phase 1 Investigational Drugs. 2008.

FDA. CMC Regulatory Considerations for Ol

10

20

30

40

50

igonucleotide Drug Products: FDA Perspective. 2019.

FDA. IND Submissions for Individualized Antisense Oligonucleotide Drug Products: Administrative and Procedural Recommendations. 2020.

Fledrich R, Schlotter-Weigel B, Schnizer T J, Wichert SP, Stassart RM, Meyer zu Horste G, Klink A, Weiss BG, Haag U, Walter MC, Rautenstrauss B, PAULUS W, Rossner MJ, Sereda M W. A rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1A recapitulates disease variability and supplies biomarkers of axonal loss in patients. *Brain : a journal of neurology*. 2012;135 (Pt 1) :72-87. Epub 2011/12/23. doi:10.1093/brain/awr322. PubMed PMID:22189569.

10

Gautier B, Hajjar H, Soares S, Berthelot J, Deck M, Abbou S, Campbell G, Ceprian M, Gonzalez S, Fovet CM, Schutza V, Jouvenel A, Rivat C, Zerah M, Francois V, Le Guiner C, Aubourg P, Fledrich R, Tricaud N. AAV2/9-mediated silencing of PMP22 prevents the development of pathological features In a rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1 A. *Nature communications*. 2021;12 (1) :2356. Epub 2021/04/23. doi:10.1038/s41467-021-22593-3. PubMed PMID:33883545; PMCID:PMC8060274.

20

Duchesne M, Danigo A, RICHARD L, Vallat JM, Attarian S, Gonnaud PM, Lacour A, Pereon Y, Stojkovic T, Nave KA, Bertrand V, Nabitotchkina S, Cohen D, Demiot C, Magy L. Skin Biopsy Findings in Patients With CMT1A: Baseline Data From the CLN-PXT3003-01 Study Provide New Insights Into the Pathophysiology of the Disorder. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2018;77 (4) :274-81. doi:10.1093/jnen/nly001. PubMed PMID:29408953.

30

40

Svaren J, Moran JJ, Wu X, Zuccarino R, Bacon C, Bai Y, Ramesh R, Gutmann L, Anderson DM, Pavelec D, Shy ME. Schwann cell transcript biomarkers for hereditary neuropathy skin biopsies. *Annals of neurology*. 2019;85 (6) :887-98. Epub 20190422. doi:10.1002/ana.25480. PubMed PMID:30945774; PMCID:PMC7050273.

Wang H, Davison M, Wang K, Xia TH, Call KM, Luo J, Wu X, Zuccarino R, Bacha A, Bai Y, Gutm

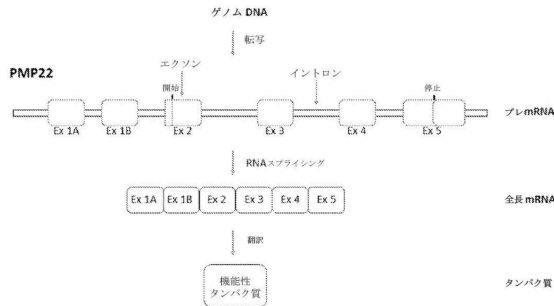
50

- ann L, Feely SME, Grider T, Rossor AM, Reilly MM, Shy ME, Svaren J. MicroRNAs as Biomarkers of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A. *Neurology*. 2021;97(5):e489–e500. Epub 20210524. doi:10.1212/WNL.00000000000012266. PubMed PMID:34031204;PMCID:PMC8356381.
- Park NY, Kwak G, Doo HM, Kim HJ, Jang SY, Lee YI, Choi BO, Hong YB. Farnesol Ameliorates Demyelinating Phenotype in a Cellular and Animal Model of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A. *Curr Issues Mol Biol*. 2021;43(3):2011–21. Epub 20211113. doi:10.3390/cimb43030138. PubMed PMID:34889893.
- Morrow JM, Evans MRB, Grider T, Sinclair CD J, Thedens D, Shah S, Yousry TA, Hanna MG, Nopoulos P, Thornton JS, Shy ME, Reilly MM. Validation of MRC Centre MRI calf muscle fat fraction protocol as an outcome measure in CMT1A. *Neurology*. 2018;91(12):e1125–e9. Epub 20180817. doi:10.1212/WNL.00000000000006214. PubMed PMID:30120135;PMCID:PMC6161551.
- Scharner J, Qi S, Rigo F, Bennett CF, Kraine AR. Delivery of GalNAc-Conjugated Splice-Switching ASOs to Non-hepatic Cells through Ectopic Expression of Asialoglycoprotein Receptor. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;16:313–25. doi:10.1016/j.omtn.2019.02.024. PubMed PMID:30965276;PMCID:PMC6453860.
- Brennan KM, Bai Y, Shy ME. Demyelinating CMT—what's known, what's new and what's in store? *Neuroscience letters*. 2015;596:14–26. Epub 20150124. doi:10.1016/j.neulet.2015.01.059. PubMed PMID:25625223.
- Morrow JM, Sinclair CD, Fischmann A, Machado PM, Reilly MM, Yousry TA, Thornton JS, Hanna MG. MRI biomarker assessment of neuromuscular disease progression: a prospective observational cohort study. *Lancet neurology*. 2016;15(1):65–77. Epub 2015/11/10. doi:10.1016/S1474-4422(15)00242-2. PubMed PMID:26549782;PMCID:PMC4672173.
- Fridman V, Sillau S, Acsadi G, Bacon C, Doolley K, Burns J, Day J, Feely S, Finkel RS, Grider T, Gutmann L, Herrmann DN, Kirk CA, Knause SA, Laura M, Lewis RA, Li J, Lloyd TE, Moroni I, Muntoni F, Pagliano E, Pisciotto C, Piscosquito G, Ramchandren S, Saporta M, Sadjadi R, Shy RR, Siskind CE, Sumner CJ, Walk

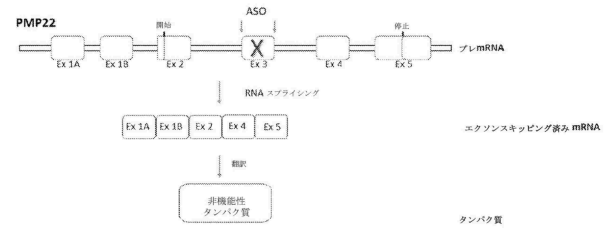
D, Wilcox J, Yum SW, Zuchner S, Scherer SS, Pareyson D, Reilly MM, Shy ME, Inherited Neuropathies Consortium—Rare Diseases Clinical Research N. A longitudinal study of CMT1A using Rasch analysis based CMT neuropathy and examination scores. *Neurology*. 2020;94(9):e884–e96. Epub 2020/02/13. doi: 10.1212/WNL.00000000000009035. PubMed PMID: 32047073; PMCID: PMC7238948.

【図面】

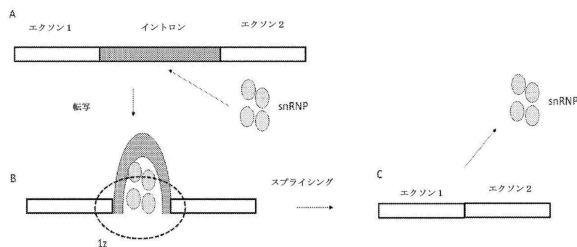
【図 1】



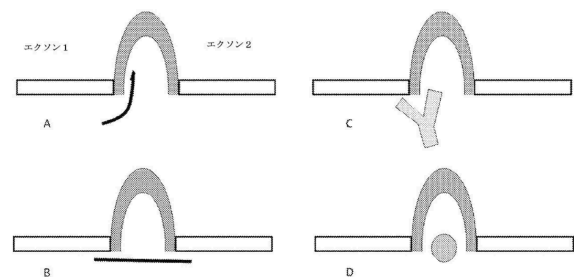
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

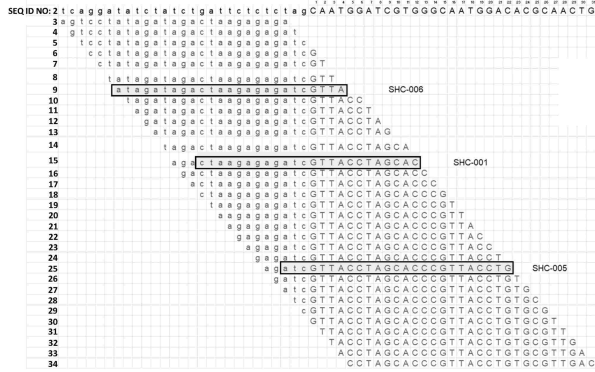
20

30

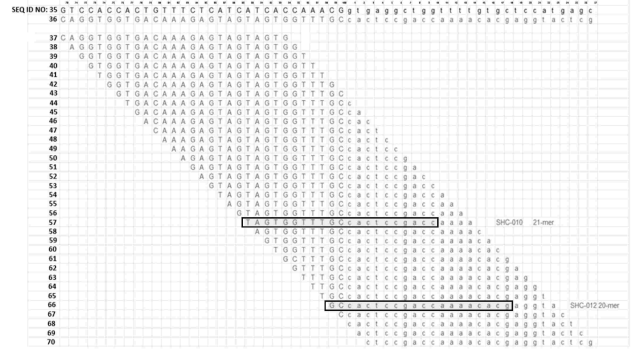
40

50

【図 5 A】

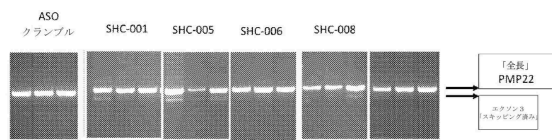


【図 5 B】

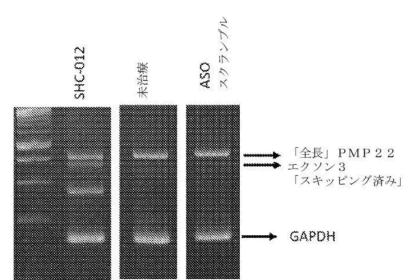


10

【図 6】

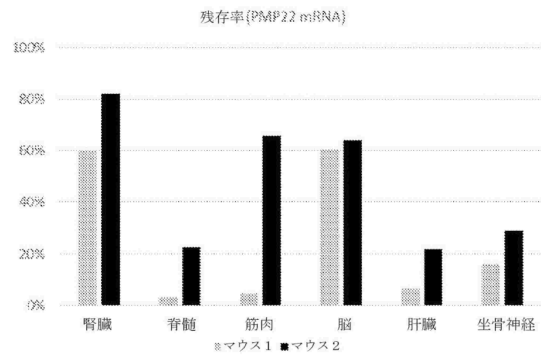


【図 7】

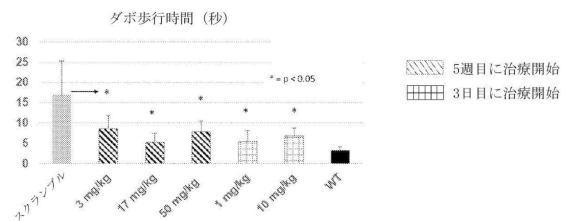


20

【図 8】



【図 9】

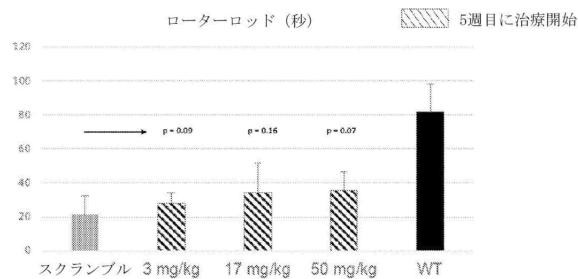


30

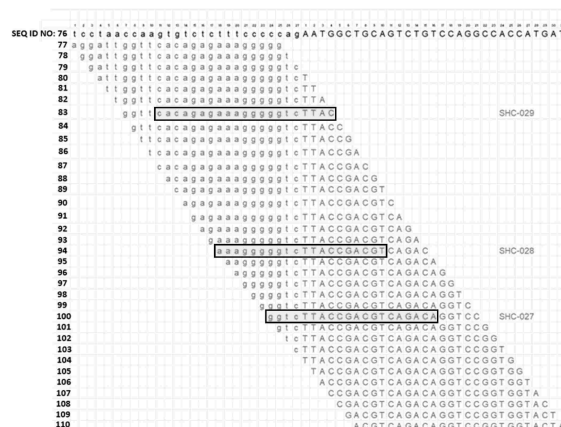
40

50

【図 10】

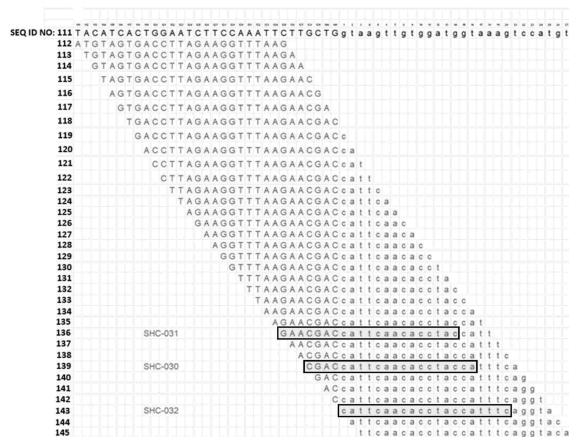


【図 1 1 A】

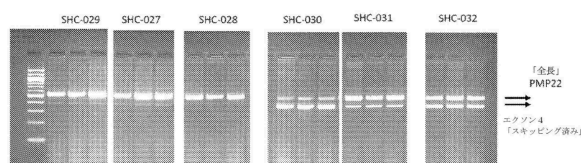


10

【図 11 B】



【图 12】



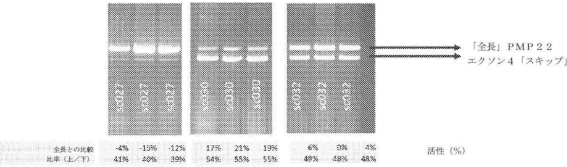
20

30

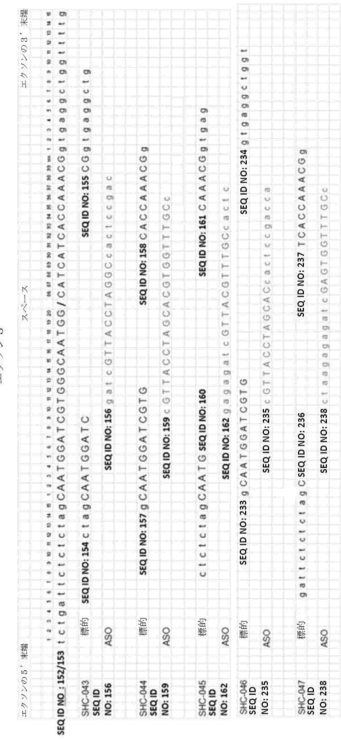
40

50

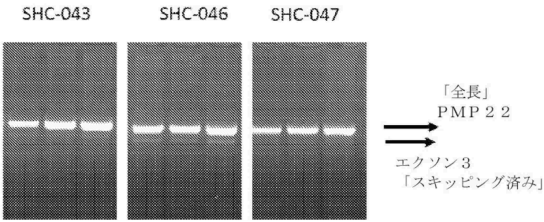
【図 1 3】



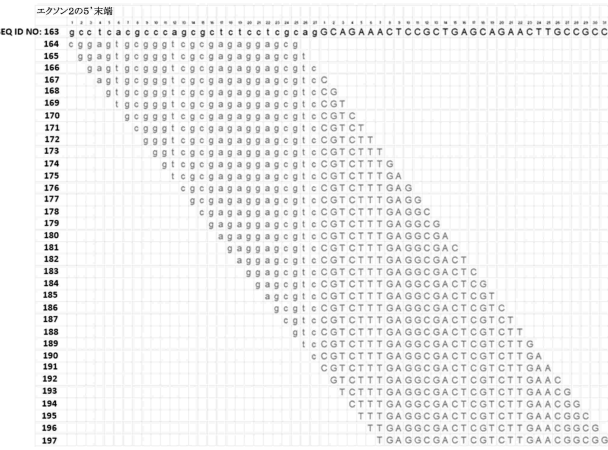
【図 1 4】



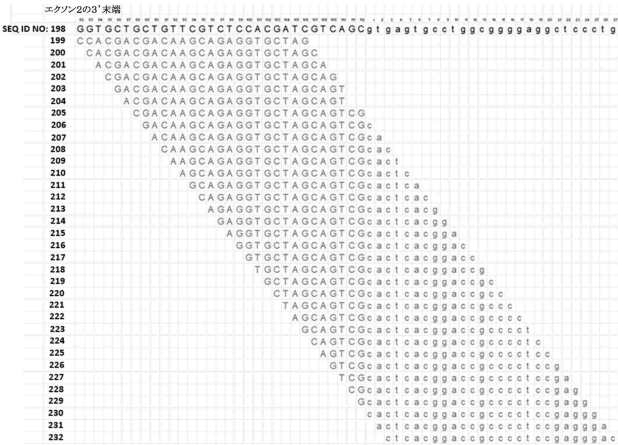
【図 1 5】



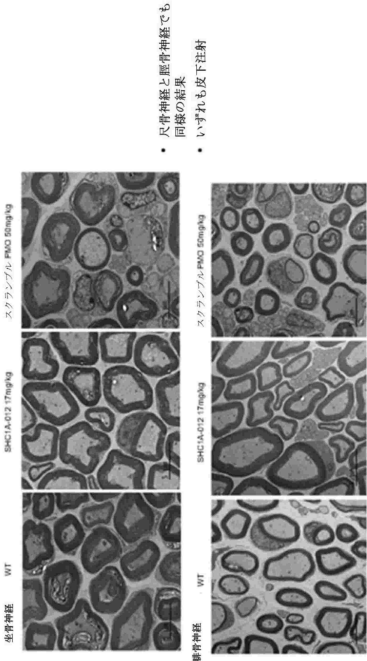
【図 1 6 A】



【図 16 B】



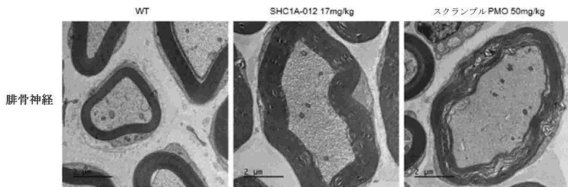
【図 17】



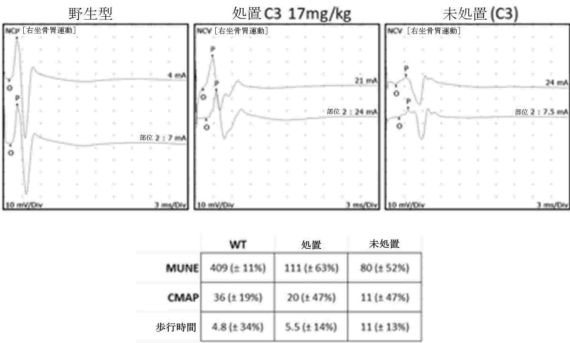
10

20

【図 18】



【図 19】

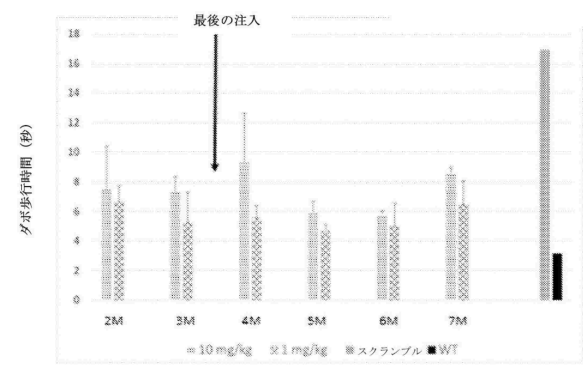


30

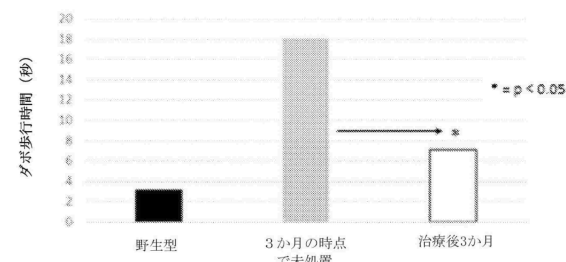
40

50

【図 20】



【図 21】



10

【配列表】

2025512501000001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/65728

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - INV. C12N 15/113; A61K 9/00; A61K 31/7088; C12N 9/22 (2023.01) ADD. A61P 25/02; A61P 25/28 (2023.01)		
CPC - INV. C12N 15/113; A61K 9/0019; A61K 31/7088; C12N 9/22 ADD. A61P 25/02; A61P 25/28; C12N 2310/11; C12N 2320/33		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/113390 A1 (SHAPE THERAPEUTICS INC.) 10 June 2021; Paragraphs [0002], [0020], [0041], [0053], [0067], [0070]	1-3 14
A		
X	WO 2017/156242 A1 (IONIS PHARMACEUTICALS INC.) 14 September 2017; Pages 32, 34; Claim 28	34-36
A	WO 2007/140506 A1 (HUMAN GENETIC SIGNATURES PTY LTD) 13 December 2007; Page 7	14
A	US 2015/0086982 A1 (BECKER, MM et al.) 26 March 2015; Paragraph [0015]	14
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 July 2023 (06.07.2023)		Date of mailing of the international search report SEP 28 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/65728

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/65728

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-13, 15-33, 37-43
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***-Please See Supplemental Page-***-

20

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, claims 1-3, 14, and 34-36, SEQ ID NO: 71 [SHC-0006 25-mer] (ASO sequence).

30

Remark on Protest

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

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/65728

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

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

Groups I+, claims 1-3, 14, and 34-36, antisense oligonucleotide comprising a complementary region to target region of a PMP22 pre-mRNA; SEQ ID NO: 71 [SHC-0006 25-mer] (ASO sequence).

The methods of Claims 1-3, 14 (in-part), and 34-36 are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched to the extent that they are complementary to PMP22 pre-mRNA target region wherein the ASO consists of SEQ ID NO: 71. This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of the genus found in claim 14 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional targets to be searched. Additional target(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected target(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be wherein ASO consists of SEQ ID NO: 72.

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

Groups I+ share the technical features including: a composition comprising an antisense oligonucleotide "ASO", wherein the ASO comprises or consists of a complementary region that is complementary nucleotides, to a target region of a PMP22 pre-mRNA; wherein binding in a cell of the complementary region of the ASO to the target region of the PMP22 pre-mRNA induces exon skipping during RNA transcription, thereby reducing full-length PMP22 mRNA production and producing exon-skipped PMP22 mRNA; a composition comprising an antisense oligonucleotide "ASO", wherein the ASO comprises or consists of a complementary region that is complementary to a target region of a PMP22 pre-mRNA; wherein the target region of the PMP22 pre-mRNA comprises an intron/exon junction of one of the coding exons.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2017/156242 A1 to Ionis Pharmaceuticals Inc. (hereinafter "Ionis") in view of WO 2021/113390 A1 to Shape Therapeutics Inc. (hereinafter "Shape").

Ionis discloses a composition comprising an antisense oligonucleotide "ASO", wherein the ASO comprises or consists of a complementary region that is complementary nucleotides, to a target region of a PMP22 pre-mRNA (antisense oligonucleotide included in method wherein the composition is complementary to PMP22 pre-mRNA; abstract; page 2, lines 16-19; page 3, lines 29-32; page 15, line 18), thereby reducing full-length PMP22 mRNA production (amount of PMP22 mRNA expression was reduced with oligonucleotide; embodiment 5); a composition comprising an antisense oligonucleotide "ASO", wherein the ASO comprises or consists of a complementary region that is complementary to a target region of a PMP22 pre-mRNA (antisense oligonucleotide included in method wherein the composition is complementary to PMP22 pre-mRNA; abstract; embodiments 5 and 28; page 15, lines 18); wherein the target region of the PMP22 pre-mRNA comprises an intron/exon junction of one of the coding exons (target region of PMP22 pre-mRNA spans an intron/exon junction; abstract; page 15, line 18; page 32, lines 31-34).

Ionis does not disclose wherein binding in a cell of the complementary region of the ASO to the target region of the PMP22 pre-mRNA induces exon skipping during RNA transcription; and producing exon-skipped PMP22 mRNA.

Shape discloses wherein binding in a cell of the complementary region of the oligonucleotide to the target region of the PMP22 pre-mRNA induces exon skipping during RNA transcription (oligonucleotide utilized in method for binding to complementary region of PMP22 pre-mRNA induces exon skipping during transcription of RNA in cell; abstract; paragraphs [0002], [0041], [0067], [0070]); and producing exon-skipped PMP22 mRNA (exon skipping is detected in mRNA after targeting of exon skipping in exon of target pre-mRNA; paragraph [0002]).

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art, at the time the invention was made, to modify the antisense oligonucleotide of Ionis to include exon skipping during RNA transcription, as taught by Shape, because exon skipping is a method of editing by RNA entity to correct mutation or modulate expression of target RNA (Shape; paragraph [0021]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Ionis and Shape reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	25/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/02	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	

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

アメリカ合衆国 6 5 2 1 1 ミズーリ州 コロンビア ユニバーシティホール 3 1 6

(74)代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(74)代理人 100098501

弁理士 森田 拓

(74)代理人 100116403

弁理士 前川 純一

(74)代理人 100134315

弁理士 永島 秀郎

(74)代理人 100162880

弁理士 上島 類

(74)代理人 100210099

弁理士 遠藤 太介

(72)発明者 スティーヴン ディー・ オコナー

アメリカ合衆国 6 5 2 1 1 ミズーリ コロンビア サウス プロヴィデンス ロード 1 6 0 1 シ
フト ファーマシューティカルズ ホールディング インク.

(72)発明者 クリスチャン ローソン

アメリカ合衆国 6 5 2 1 1 ミズーリ州 コロンビア ユニバーシティホール 3 1 6 ユニバーシテ
ィ オブ ミズーリーコロンビア

F ターム (参考) 4B064 AF27 AG01 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90X AA91X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA04 CA23 CA24 CA44

4C084 AA13 NA14 ZA20 ZB21

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA20 ZB21