

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-538288

(P2018-538288A)

(43) 公表日 平成30年12月27日(2018.12.27)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 C 057
A61P 21/04 (2006.01)	A 61 P 21/04	4 C 084
A61K 31/7125 (2006.01)	A 61 K 31/7125	4 C 086
A61K 31/712 (2006.01)	A 61 K 31/712	
A61K 31/785 (2006.01)	A 61 K 31/785	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-529221 (P2018-529221)	(71) 出願人	518195829 コールド スプリング ハーバー ラボラ トリ アメリカ合衆国 11724 ニューヨー ク州 コールド・スプリング・ハーバー
(86) (22) 出願日	平成28年12月13日 (2016.12.13)		ワン・バンクタウン・ロード ニコラス・ ビルディング ピー. オー. ボックス 1 OO
(85) 翻訳文提出日	平成30年7月27日 (2018.7.27)	(71) 出願人	518195690 ストーク セラピューティクス, インク. アメリカ合衆国 01730 マサチュー セツツ州 ベドフォード プレストン・コ ート 3
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/066414	(74) 代理人	100082072 弁理士 清原 義博
(87) 國際公開番号	W02017/106210		
(87) 國際公開日	平成29年6月22日 (2017.6.22)		
(31) 優先権主張番号	62/267,210		
(32) 優先日	平成27年12月14日 (2015.12.14)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

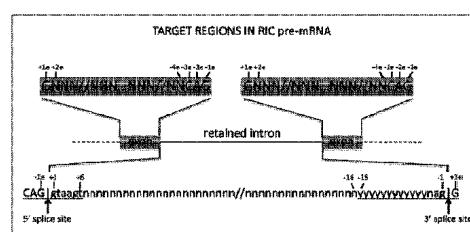
(54) 【発明の名称】アラジール症候群の処置のためのアンチセンスオリゴマー

(57) 【要約】

本明細書には、JAG1の発現を増加させるための、および必要としている被験体、例えば、不足したJAG1タンパク質発現を有する被験体またはアラジール症候群(ALGS)を有する被験体を処置するための方法および組成物が提供される。

【選択図】図1

FIG. 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験体の細胞により標的タンパク質または機能 RNA の発現を増加させることによって必要としている被験体のアラジール症候群を処置する方法であって、該細胞は、保持されたイントロン含有 m RNA 前駆体 (RIC m RNA 前駆体) を有し、該 RIC m RNA 前駆体は、保持されたイントロン、5' スプライス部位に隣接しているエクソン、および 3' スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、ここで RIC m RNA 前駆体は、標的タンパク質または機能 RNA をコードし、該方法は、被験体の細胞を、標的タンパク質または機能 RNA をコードする RIC m RNA 前駆体の標的部分に相補的なアンチセンスオリゴマー (ASO) と接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能 RNA をコードする RIC m RNA 前駆体から構成的にスプライシングされ、それにより、被験体の細胞内で、標的タンパク質または機能 RNA をコードする m RNA のレベルを増加させ、標的タンパク質または機能 RNA の発現を増加させる、方法。10

【請求項 2】

保持されたイントロン含有 m RNA 前駆体 (RIC m RNA 前駆体) を有している細胞によって JAG1 である標的タンパク質の発現を増加させる方法であって、該 RIC m RNA 前駆体は、保持されたイントロン、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に隣接しているエクソン、および保持されたイントロンの 3' スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、ここで RIC m RNA 前駆体は JAG1 タンパク質をコードし、該方法は、細胞を、JAG1 タンパク質をコードする RIC m RNA 前駆体の標的部分に相補的なアンチセンスオリゴマー (ASO) と接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、JAG1 タンパク質をコードする RIC m RNA 前駆体から構成的にスプライシングされ、それにより、細胞内で、JAG1 タンパク質をコードする m RNA のレベルを増加させ、JAG1 タンパク質の発現を増加させる、方法。20

【請求項 3】

標的タンパク質が JAG1 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

標的タンパク質または機能 RNA が、被験体において量または活性が不足している標的タンパク質または機能 RNA を機能的に増強または交換する、補償するタンパク質または補償する機能 RNA である、請求項 1 に記載の方法。30

【請求項 5】

細胞が、JAG1 タンパク質の量または活性の不足によって引き起こされた疾病を有する被験体内にあるか又は被験体に由来する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

標的タンパク質の量の不足が、標的タンパク質のハプロ不全によって引き起こされ、ここで被験体は、機能的な標的タンパク質をコードする第 1 の対立遺伝子、および標的タンパク質が産生されない第 2 の対立遺伝子、または非機能性の標的タンパク質をコードする第 2 の対立遺伝子を有し、アンチセンスオリゴマーは、第 1 の対立遺伝子から転写された RIC m RNA 前駆体の標的部分に結合する、請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の方法。40

【請求項 7】

被験体が、標的タンパク質の量または機能の不足から結果として生じる障害によって引き起こされた疾病を有し、ここで被験体が、

a. 第 1 の変異対立遺伝子であって、

i. 標的タンパク質が、野生型対立遺伝子からの産生と比較して、低下したレベルで産生される、

ii. 標的タンパク質が、同等の野生型タンパク質と比較して、機能が低下した形態で産生される、または

iii. 標的タンパク質が産生されない、第 1 の変異対立遺伝子、および

10

20

30

40

50

b . 第 2 の変異対立遺伝子であって、

i . 標的タンパク質が、野生型対立遺伝子からの產生と比較して、低下したレベルで產生される、

i i . 標的タンパク質が、同等の野生型タンパク質と比較して、機能が低下した形態で產生される、または

i i i . 標的タンパク質が產生されない、第 2 の変異対立遺伝子を有し、および
ここで被験体が、a . i i i . の第 1 の変異対立遺伝子を有するときに、第 2 の変異対立遺伝子は、b . i . またはb . i i . の変異対立遺伝子であり、被験体が、b . i i i . の第 2 の変異対立遺伝子を有するときに、第 1 の変異対立遺伝子は、a . i . またはa . i i . の変異対立遺伝子であり、およびR I C m R N A 前駆体は、a . i . またはa . i i . である第 1 の変異対立遺伝子及び / 又はb . i . またはb . i i . である第 2 の変異対立遺伝子のいずれかから転写される、請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

標的タンパク質が、同等の野生型タンパク質と比較して機能が低下した形態で產生される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

標的タンパク質が、同等の野生型タンパク質と比較して完全に機能的である形態で產生される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

R I C m R N A 前駆体の標的部分が、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に対する + 6 の領域から、保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対する - 1 6 の領域内にある、請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

R I C m R N A 前駆体の標的部分が、保持されたイントロンにおいて、

(a) 保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に対する、+ 6 から + 5 0 0 、 + 6 から + 4 0 0 、 + 6 から 3 0 0 、 + 6 から 2 0 0 、または + 6 から + 1 0 0 の領域内；または

(b) 保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対する、- 1 6 から - 5 0 0 、 - 1 6 から - 4 0 0 、 - 1 6 から - 3 0 0 、 - 1 6 から - 2 0 0 、または - 1 6 から - 1 0 0 の領域内にある、請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

R I C m R N A 前駆体の標的部分が、

(a) 保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に隣接しているエクソンにおける + 2 e から - 4 e の領域内；または

(b) 保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に隣接しているエクソンにおける + 2 e から - 4 e の領域内にある、請求項 1 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

R I C m R N A 前駆体が、S E Q I D N O : 1 に対して、少なくとも約 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる、請求項 1 乃至 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

R I C m R N A 前駆体が、S E Q I D N O : 2 に対して少なくとも約 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 乃至 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

アンチセンスオリゴマーが、機能 R N A または標的タンパク質をコードする遺伝子から転写された m R N A 前駆体の選択的スプライシングを調節することにより標的タンパク質

10

20

30

40

50

または機能 R N A の量を増加させない、請求項 1 乃至 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

アンチセンスオリゴマーが、標的タンパク質または機能 R N A をコードする遺伝子の突然変異から結果として生じる異常スプライシングを調節することにより標的タンパク質または機能 R N A の量を増加させない、請求項 1 乃至 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

R I C m R N A 前駆体が、全長 m R N A 前駆体の部分的スプライシングまたは野生型 m R N A 前駆体の部分的スプライシングによって產生された、請求項 1 乃至 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

標的タンパク質または機能 R N A をコードする m R N A が、全長成熟 m R N A または野生型成熟 m R N A である、請求項 1 乃至 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

產生される標的タンパク質が、全長タンパク質または野生型タンパク質である、請求項 1 乃至 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

アンチセンスオリゴマーと接触させられた細胞内で產生された標的タンパク質または機能 R N A をコードする m R N A の総量は、対照細胞において產生された標的タンパク質または機能 R N A をコードする m R N A の総量と比較して、約 1 . 1 倍から約 1 0 倍、約 1 . 5 倍から約 1 0 倍、約 2 倍から約 1 0 倍、約 3 倍から約 1 0 倍、約 4 倍から約 1 0 倍、約 1 . 1 倍から約 5 倍、約 1 . 1 倍から約 6 倍、約 1 . 1 倍から約 7 倍、約 1 . 1 倍から約 8 倍、約 1 . 1 倍から約 9 倍、約 2 倍から約 5 倍、約 2 倍から約 6 倍、約 2 倍から約 7 倍、約 2 倍から約 8 倍、約 2 倍から約 9 倍、約 3 倍から約 6 倍、約 3 倍から約 7 倍、約 3 倍から約 8 倍、約 3 倍から約 9 倍、約 4 倍から約 7 倍、約 4 倍から約 8 倍、約 4 倍から約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3 . 5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、または少なくとも約 1 0 倍増加される、請求項 1 乃至 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

アンチセンスオリゴマーと接触させられた細胞によって產生された標的タンパク質の総量は、対照細胞によって產生された標的タンパク質の総量と比較して、約 1 . 1 倍から約 1 0 倍、約 1 . 5 倍から約 1 0 倍、約 2 倍から約 1 0 倍、約 3 倍から約 1 0 倍、約 4 倍から約 1 0 倍、約 1 . 1 倍から約 5 倍、約 1 . 1 倍から約 6 倍、約 1 . 1 倍から約 7 倍、約 1 . 1 倍から約 8 倍、約 1 . 1 倍から約 9 倍、約 2 倍から約 5 倍、約 2 倍から約 6 倍、約 2 倍から約 7 倍、約 2 倍から約 8 倍、約 2 倍から約 9 倍、約 3 倍から約 6 倍、約 3 倍から約 7 倍、約 3 倍から約 8 倍、約 3 倍から約 9 倍、約 4 倍から約 7 倍、約 4 倍から約 8 倍、約 4 倍から約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3 . 5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、または少なくとも約 1 0 倍増加される、請求項 1 乃至 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

アンチセンスオリゴマーが、ホスホロチオエート結合またはホスホジアミデート結合を含む骨格修飾を含む、請求項 1 乃至 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

アンチセンスオリゴマーが、ホスホジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2' - O - メチル、2' - フルオロ、または 2' - O - メトキシエチル部分を含む、請求項 1 乃至 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

アンチセンスオリゴマーが、少なくとも 1 つの修飾された糖部を含む、請求項 1 乃至 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

各糖部が、修飾された糖部である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

アンチセンスオリゴマーが、8～50 の核酸塩基、8～40 の核酸塩基、8～35 の核酸塩基、8～30 の核酸塩基、8～25 の核酸塩基、8～20 の核酸塩基、8～15 の核酸塩基、9～50 の核酸塩基、9～40 の核酸塩基、9～35 の核酸塩基、9～30 の核酸塩基、9～25 の核酸塩基、9～20 の核酸塩基、9～15 の核酸塩基、10～50 の核酸塩基、10～40 の核酸塩基、10～35 の核酸塩基、10～30 の核酸塩基、10～25 の核酸塩基、10～20 の核酸塩基、10～15 の核酸塩基、11～50 の核酸塩基、11～40 の核酸塩基、11～35 の核酸塩基、11～30 の核酸塩基、11～25 の核酸塩基、11～20 の核酸塩基、11～15 の核酸塩基、12～50 の核酸塩基、12～40 の核酸塩基、12～35 の核酸塩基、12～30 の核酸塩基、12～25 の核酸塩基、12～20 の核酸塩基、または12～15 の核酸塩基から成る、請求項 1 乃至 25 のいずれか 1 項に記載の方法。
10

【請求項 27】

アンチセンスオリゴマーが、タンパク質をコードする R I C m R N A 前駆体の標的部分に、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 相補的である、請求項 1 乃至 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

R I C m R N A 前駆体の標的部分が、S E Q I D N O : 4 3 7 - 4 3 9 から選択される配列内にある、請求項 1 乃至 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 29】

アンチセンスオリゴマーが、S E Q I D N O : 3 - 4 3 6 のいずれか 1 つに対して、少なくとも約 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 配列同一性であるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 乃至 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

アンチセンスオリゴマーが、S E Q I D N O : 3 - 4 3 6 から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 乃至 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 31】

細胞が、標的タンパク質または機能 R N A をコードする遺伝子から転写された R I C m R N A 前駆体の集団を含み、ここで R I C m R N A 前駆体の集団は、2 つ以上の保持されたイントロンを含み、アンチセンスオリゴマーは、R I C m R N A 前駆体の集団において最も豊富な保持されたイントロンに結合する、請求項 1 乃至 30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

最も豊富な保持されたイントロンへのアンチセンスオリゴマーの結合が、標的タンパク質または機能 R N A をコードする m R N A を産生するために、R I C m R N A 前駆体の集団からの 2 つ以上の保持されたイントロンのスプライシングアウトを誘発する、請求項 31 に記載の方法。

40

【請求項 33】

細胞が、標的タンパク質または機能 R N A をコードする遺伝子から転写された R I C m R N A 前駆体の集団を含み、ここで R I C m R N A 前駆体の集団は、2 つ以上の保持されたイントロンを含み、アンチセンスオリゴマーは、R I C m R N A 前駆体の集団において 2 番目に豊富な保持されたイントロンに結合する、請求項 1 乃至 30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

2 番目に豊富な保持されたイントロンへのアンチセンスオリゴマーの結合が、標的タンパク質または機能 R N A をコードする m R N A を産生するために、R I C m R N A 前駆

50

体の集団からの 2 つ以上の保持されたイントロンのスプライシングアウトを誘発する、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

疾病が、疾患または障害である、請求項 5 乃至 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 6】

疾患または障害が、アラジール症候群または筋ジストロフィーである、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

標的タンパク質および R I C m R N A 前駆体が、 J A G 1 遺伝子によってコードされる、請求項 3 6 に記載の方法。

10

【請求項 3 8】

J A G 1 タンパク質発現を評価する工程をさらに含む、請求項 1 乃至 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

アンチセンスオリゴマーが、 J A G 1 R I C m R N A 前駆体の標的部分に結合し、ここで標的部分は、 S E Q I D N O : 4 9 、 5 0 、 5 1 、 5 2 、 5 3 、 5 4 、 5 5 、 5 6 、および 5 7 から選択される配列内にある、請求項 1 乃至 3 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 0】

被験体がヒトである、請求項 1 乃至 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 4 1】

被験体がヒト以外の動物である、請求項 1 乃至 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 2】

被験体が、胎児、胚、または小児である、請求項 1 乃至 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

細胞がエクスピボにある、請求項 1 乃至 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】

アンチセンスオリゴマーが、被験体の腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または静脈内注射によって投与される、請求項 1 乃至 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 4 5】

5 ' スプライス部位に隣接しているエクソンの - 3 e から - 1 e および保持されたイントロンの + 1 から + 6 での 9 つのヌクレオチドが、対応する野生型配列と同一である、請求項 1 乃至 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

保持されたイントロンの - 1 5 から - 1 および 3 ' スプライス部位に隣接しているエクソンの + 1 e での 1 6 のヌクレオチドは、対応する野生型配列と同一である、請求項 1 乃至 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

請求項 1 乃至 3 9 のいずれか 1 項の方法で使用される、アンチセンスオリゴマー。

40

【請求項 4 8】

S E Q I D N O : 3 - 4 3 6 のいずれか 1 つに対して、少なくとも約 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 7 % 、または 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む、アンチセンスオリゴマー。

【請求項 4 9】

請求項 4 7 または 4 8 のアンチセンスオリゴマーおよび賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 5 0】

腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または静脈内注射により医薬組成物を投与することによって必要としている被験体を処置する方法。

【請求項 5 1】

50

タンパク質不足または機能 RNA 不足に関係する必要としている被験体のアラジール症候群を処置するために細胞によって標的タンパク質または機能 RNA の発現を増加させる方法に使用するためのアンチセンスオリゴマーを含む組成物であって、ここでタンパク質不足または機能 RNA 不足は、被験体における量または活性の不足であり、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能 RNA をコードする保持されたイントロン含有 mRNA 前駆体 (RIC mRNA 前駆体) の構成的スプライシングを増強し、ここで標的タンパク質は、

(a) 不足したタンパク質；または

(b) 被験体において不足したタンパク質を機能的に増強または交換する、補償するタンパク質であり、

および機能 RNA は、

(a) 不足した RNA；または

(b) 被験体において不足した機能 RNA を機能的に増強または交換する、補償する機能 RNA であり、

ここで RIC mRNA 前駆体は、保持されたイントロン、5' スプライス部位に隣接しているエクソン、および 3' スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能 RNA をコードする RIC mRNA 前駆体からスプライシングされ、それによって、被験体において標的タンパク質または機能 RNA の產生または活性を増加させる、組成物。

【請求項 5 2】

必要としている被験体において JAG1 タンパク質に関係する疾病を処置する方法に使用するためのアンチセンスオリゴマーを含む組成物であって、該方法は、被験体の細胞によって JAG1 タンパク質の発現を増加させる工程を含み、ここで細胞は、保持されたイントロン、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に隣接しているエクソン、および保持されたイントロンの 3' スプライス部位に隣接しているエクソンを含む、保持されたイントロン含有 mRNA 前駆体 (RIC mRNA 前駆体) を有し、RIC mRNA 前駆体は、JAG1 タンパク質をコードし、該方法はまた、細胞をアンチセンスオリゴマーと接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、JAG1 タンパク質をコードする RIC mRNA 前駆体の転写産物から構成的にスプライシングされ、それにより、被験体の細胞内で、JAG1 タンパク質をコードする mRNA のレベルを増加させ、標的タンパク質または機能 RNA の発現を増加させる、組成物。

【請求項 5 3】

疾病が、疾患または障害である、請求項 5 2 に記載の組成物。

【請求項 5 4】

疾患または障害が、アラジール症候群または筋ジストロフィーである、請求項 5 3 に記載の組成物。

【請求項 5 5】

標的タンパク質および RIC mRNA 前駆体が、JAG1 遺伝子によってコードされる、請求項 5 4 に記載の組成物。

【請求項 5 6】

アンチセンスオリゴマーが、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する + 6 の領域から、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対する - 1 6 の領域内にある、RIC mRNA 前駆体の一部を標的とする、請求項 5 1 乃至 5 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5 7】

アンチセンスオリゴマーが、保持されたイントロンにおいて、

(a) 保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する + 6 から + 1 0 0 の領域内；または

(b) 保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対する - 1 6 から - 1 0 0 の領域内にある、RIC mRNA 前駆体の一部を標的とする、請求項 5 1 乃至 5 6 のいずれか

10

20

30

40

50

1 項に記載の組成物。

【請求項 5 8】

アンチセンスオリゴマーが、少なくとも 1 つの保持されたイントロンの 5' スプライス部位の約 100 のヌクレオチド下流から、少なくとも 1 つの保持されたイントロンの 3' スプライス部位の約 100 のヌクレオチド上流までの領域内にある、R I C m R N A 前駆体の一部を標的とする、請求項 5 1 乃至 5 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5 9】

R I C m R N A 前駆体の標的部分が、
(a) 保持されたイントロンの 5' スプライス部位に隣接しているエクソンにおける + 10
2 e から - 4 e の領域内；または

(b) 保持されたイントロンの 3' スプライス部位に隣接しているエクソンにおける + 2 e から - 4 e の領域内にある、請求項 5 1 乃至 5 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6 0】

R I C m R N A 前駆体が、SEQ ID NO : 1 に対して、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる、請求項 5 1 乃至 5 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6 1】

R I C m R N A 前駆体が、SEQ ID NO : 2 に対して、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 5 1 乃至 6 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6 2】

アンチセンスオリゴマーが、標的タンパク質または機能 R N A をコードする遺伝子から転写された m R N A 前駆体の選択的スプライシングを調節することにより標的タンパク質または機能 R N A の量を増加させない、請求項 5 1 乃至 6 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6 3】

アンチセンスオリゴマーが、標的タンパク質または機能 R N A をコードする遺伝子の突然変異から結果として生じる異常スプライシングを調節することにより機能 R N A または機能タンパク質の量を増加させない、請求項 5 1 乃至 6 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6 4】

R I C m R N A 前駆体が、全長 m R N A 前駆体または野生型 m R N A 前駆体から部分的スプライシングによって產生される、請求項 5 1 乃至 6 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6 5】

標的タンパク質または機能 R N A をコードする m R N A が、全長成熟 m R N A または野生型成熟 m R N A である、請求項 5 1 乃至 6 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6 6】

產生される標的タンパク質が、全長タンパク質または野生型タンパク質である、請求項 5 1 乃至 6 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6 7】

保持されたイントロンが、律速のイントロンである、請求項 5 1 乃至 6 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6 8】

保持されたイントロンが、R I C m R N A 前駆体において最も豊富な保持されたイントロンである、請求項 5 1 乃至 6 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6 9】

保持されたイントロンが、R I C m R N A 前駆体において 2 番目に豊富な保持されたイントロンである、請求項 5 1 乃至 6 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 0】

アンチセンスオリゴマーが、ホスホロチオエート結合またはホスホジアミデート結合を含む骨格修飾を含む、請求項 5 1 乃至 6 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 1】

アンチセンスオリゴマーが、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 5 1 乃至 7 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 2】

アンチセンスオリゴマーが、ホスホジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2' - O - メチル、2' - フルオロ、または 2' - O - メトキシエチル部分を含む、請求項 5 1 乃至 7 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。 10

【請求項 7 3】

アンチセンスオリゴマーが、少なくとも 1 つの修飾された糖部を含む、請求項 5 1 乃至 7 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 4】

各糖部が、修飾された糖部である、請求項 7 3 に記載の組成物。

【請求項 7 5】

アンチセンスオリゴマーが、8 ~ 5 0 の核酸塩基、8 ~ 4 0 の核酸塩基、8 ~ 3 5 の核酸塩基、8 ~ 3 0 の核酸塩基、8 ~ 2 5 の核酸塩基、8 ~ 2 0 の核酸塩基、8 ~ 1 5 の核酸塩基、9 ~ 5 0 の核酸塩基、9 ~ 4 0 の核酸塩基、9 ~ 3 5 の核酸塩基、9 ~ 3 0 の核酸塩基、9 ~ 2 5 の核酸塩基、9 ~ 2 0 の核酸塩基、9 ~ 1 5 の核酸塩基、1 0 ~ 5 0 の核酸塩基、1 0 ~ 4 0 の核酸塩基、1 0 ~ 3 5 の核酸塩基、1 0 ~ 3 0 の核酸塩基、1 0 ~ 2 5 の核酸塩基、1 0 ~ 2 0 の核酸塩基、1 0 ~ 1 5 の核酸塩基、1 1 ~ 5 0 の核酸塩基、1 1 ~ 4 0 の核酸塩基、1 1 ~ 3 5 の核酸塩基、1 1 ~ 3 0 の核酸塩基、1 1 ~ 2 5 の核酸塩基、1 1 ~ 2 0 の核酸塩基、1 1 ~ 1 5 の核酸塩基、1 2 ~ 5 0 の核酸塩基、1 2 ~ 4 0 の核酸塩基、1 2 ~ 3 5 の核酸塩基、1 2 ~ 3 0 の核酸塩基、1 2 ~ 2 5 の核酸塩基、1 2 ~ 2 0 の核酸塩基、または 1 2 ~ 1 5 の核酸塩基から成る、請求項 5 1 乃至 7 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。 20

【請求項 7 6】

アンチセンスオリゴマーが、タンパク質をコードする R I C m R N A 前駆体の標的部分に、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 相補的である、請求項 5 1 乃至 7 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。 30

【請求項 7 7】

アンチセンスオリゴマーが、J A G 1 R I C m R N A 前駆体の標的部分に結合し、ここで標的部分は、S E Q I D N O : 4 3 7 - 4 3 9 から選択される配列内にある、請求項 5 1 乃至 7 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7 8】

アンチセンスオリゴマーが、S E Q I D N O : 3 - 4 3 6 のいずれか 1 つに対して、少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 配列同一性であるヌクレオチド配列を含む、請求項 5 1 乃至 7 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。 40

【請求項 7 9】

アンチセンスオリゴマーが、S E Q I D N O : 3 - 4 3 6 から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 5 1 乃至 7 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8 0】

請求項 5 1 乃至 7 9 の組成物のいずれかのアンチセンスオリゴマー、および賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 8 1】

腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または静脈内注射により請求項 8 0 の医薬組成物を投与することによって必要としている被験体を処置する方法。 50

【請求項 8 2】

不足した J A G 1 m R N A の転写産物の標的配列にハイブリダイズするアンチセンスオリゴマー、および薬学的に許容可能な賦形剤を含む、医薬組成物であって、ここで不足した J A G 1 m R N A の転写産物は保持されたイントロンを含み、アンチセンスオリゴマーは、不足した J A G 1 m R N A の転写産物からの保持されたイントロンのスプライシングアウトを誘発する、医薬組成物。

【請求項 8 3】

不足した J A G 1 m R N A の転写産物が、 J A G 1 R I C m R N A 前駆体の転写産物である、請求項 8 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 4】

J A G 1 R I C m R N A 前駆体の転写産物の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する + 6 の領域から、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対する - 1 6 の領域内にある、請求項 8 2 または 8 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 5】

J A G 1 R I C m R N A 前駆体の転写産物が、 S E Q I D N O : 1 に対して、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる、請求項 8 2 乃至 8 4 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 8 6】

J A G 1 R I C m R N A 前駆体の転写産物が、 S E Q I D N O : 2 に対して、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 8 2 乃至 8 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 8 7】

アンチセンスオリゴマーが、ホスホロチオエート結合またはホスホジアミデート結合を含む骨格修飾を含む、請求項 8 2 乃至 8 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 8 8】

アンチセンスオリゴマーが、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 8 2 乃至 8 7 のいずれか 1 項に記載の医薬化合物。

【請求項 8 9】

アンチセンスオリゴマーが、ホスホジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2' - O - メチル、2' - フルオロ、または 2' - O - メトキシエチル部分を含む、請求項 8 2 乃至 8 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 9 0】

アンチセンスオリゴマーが、少なくとも 1 つの修飾された糖部を含む、請求項 8 2 乃至 8 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 9 1】

アンチセンスオリゴマーが、8 ~ 50 の核酸塩基、8 ~ 40 の核酸塩基、8 ~ 35 の核酸塩基、8 ~ 30 の核酸塩基、8 ~ 25 の核酸塩基、8 ~ 20 の核酸塩基、8 ~ 15 の核酸塩基、9 ~ 50 の核酸塩基、9 ~ 40 の核酸塩基、9 ~ 35 の核酸塩基、9 ~ 30 の核酸塩基、9 ~ 25 の核酸塩基、9 ~ 20 の核酸塩基、9 ~ 15 の核酸塩基、10 ~ 50 の核酸塩基、10 ~ 40 の核酸塩基、10 ~ 35 の核酸塩基、10 ~ 30 の核酸塩基、10 ~ 25 の核酸塩基、10 ~ 20 の核酸塩基、10 ~ 15 の核酸塩基、11 ~ 50 の核酸塩基、11 ~ 40 の核酸塩基、11 ~ 35 の核酸塩基、11 ~ 30 の核酸塩基、11 ~ 25 の核酸塩基、11 ~ 20 の核酸塩基、11 ~ 15 の核酸塩基、12 ~ 50 の核酸塩基、12 ~ 40 の核酸塩基、12 ~ 35 の核酸塩基、12 ~ 30 の核酸塩基、12 ~ 25 の核酸塩基、12 ~ 20 の核酸塩基、または 12 ~ 15 の核酸塩基を含む、請求項 8 2 乃至 9 0 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 9 2】

10

20

30

40

50

アンチセンスオリゴマーが、JAG1 RIC mRNA前駆体の転写産物の標的部分に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相補的である、請求項82乃至91のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項93】

JAG1 RIC mRNA前駆体の転写産物の標的部分は、SEQ ID NO:437-439から選択される配列内にある、請求項82乃至92のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項94】

アンチセンスオリゴマーが、SEQ ID NO:3-436のいずれか1つに対して、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%配列同一性であるヌクレオチド配列を含む、請求項82乃至93のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項95】

アンチセンスオリゴマーが、SEQ ID NO:3-436から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項82乃至93のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項96】

医薬組成物が、髄腔内注射、脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または静脈内注射のために製剤される、請求項82乃至95のいずれか1項に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項97】

ツベリンタンパク質の機能形態をコードする十分に処理されたJAG1 mRNAの転写産物を産生するために、保持されたイントロンの除去を促進するように不足したJAG1 mRNAの転写産物の処理を誘発する方法であって、該方法は、

(a) アンチセンスオリゴマーを被験体の標的細胞と接触させる工程；

(b) アンチセンスオリゴマーを不足したJAG1 mRNAの転写産物にハイブリダイズする工程であって、不足したJAG1 mRNAの転写産物が、ツベリンタンパク質の機能形態をコードすることができ、少なくとも1つの保持されたイントロンを含む、工程；

(c) ツベリンタンパク質の機能形態をコードする十分に処理されたJAG1 mRNAの転写産物を産生するために、不足したJAG1 mRNAの転写産物から少なくとも1つの保持されたイントロンを除去する工程；および

(d) 十分に処理されたJAG1 mRNAの転写産物からツベリンタンパク質の機能形態を翻訳する工程を含む、方法。

【請求項98】

保持されたイントロンが、保持されたイントロン全体である、請求項97に記載の方法。

【請求項99】

不足したJAG1 mRNAの転写産物が、JAG1 RIC mRNA前駆体の転写産物である、請求項97または98に記載の方法。

【請求項100】

JAG1タンパク質の量または活性の不足によって引き起こされた疾患有する被験体を処置する方法であって、該方法は、

SEQ ID NO:3-436のいずれか1つに対して、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むアンチセンスオリゴマーを被験体に投与する工程を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

<相互参照>

本出願は、2015年12月14日に出願された米国仮特許出願第62/267,210号の利益を主張し、該仮出願は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0002】

<配列表>

本出願は配列表を包含しており、これは、EFS-Webを介してASCIIフォーマットで提出され、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。2016年12月9日に作成された前記ASCIIのコピーは、47991-705_601_SL.txtのファイル名であり、201,192バイトのサイズである。前述のファイルは2016年12月9日に作成され、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

10

【背景技術】

【0003】

動脈肝異形成症としても知られているアラジール症候群(ALGS)は、珍しい、衰弱させる、常染色体優性の多系統疾患である(Turnpenny and Ellard, Eur. J. Hum. Gen. 2012, 20, 251-257)。患者は胆管内の異常によって引き起こされた肝損傷を患う。他の影響としては、心臓病、血管形成異常、骨格異常、眼科的特徴、顔面特徴、腎異常、発達遅滞、および膵機能不全が挙げられる。1:70,000の報告されたALGSの蔓延は、疾病の変動性および不完全浸透が原因で過小評価されていると考えられる。

20

【0004】

Notchシグナル伝達に関する遺伝子の突然変異はALGSを引き起こすことが報告された。JAG1の突然変異はALGS1型を引き起こし、一方でNOTCH2の突然変異はALGS2型を引き起こし、これはALGS1型ほど蔓延していない。JAG1は、Notch膜受容体に対する細胞表面リガンドである、JAG1タンパク質をコードする。Notch受容体へのJAG1タンパク質の結合は、シグナル伝達カスケード引き起こし、その結果、細胞運命の決定および分化に関する遺伝子の転写がもたらされる。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、アラジール症候群を処置するための組成物および方法を提供し、組成物は、JAG1の保持されたイントロン含有mRNA前駆体(RIC mRNA前駆体)のイントロンスプライス部位での構成的スプライシングを促進するアンチセンスオリゴマー(ASO)を含む。本発明はさらに、必要としている被験体、例えば、JAG1タンパク質の増加された産生から恩恵を得ることができる被験体の細胞において、成熟JAG1 mRNAおよび順にJAG1タンパク質の産生を増加させるための組成物および方法を提供する。上記方法は、結果としてJAG1タンパク質産生の不足につながる、ミスセンス、スプライシング、フレームシフトおよびナンセンスの突然変異を含む、JAG1遺伝子の突然変異に加えて、全遺伝子欠失によっても引き起こされるアラジール症候群を有する被験体を処置するために使用されてもよい。他の実施形態では、本発明の組成物および方法は、筋ジストロフィーを有する被験体を処置するために使用され、被験体はJAG1タンパク質の産生の増加から恩恵を得ることができる。

30

【0006】

本明細書には、特定の実施形態において、被験体の細胞により標的タンパク質または機能RNAの発現を増加させることによって必要としている被験体のアラジール症候群を処置する方法が開示され、ここで該細胞は、保持されたイントロン含有mRNA前駆体(RIC mRNA前駆体)を有し、該RIC mRNA前駆体は、保持されたイントロン、5'スプライス部位に隣接しているエクソン、および3'スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、ここでRIC mRNA前駆体は、標的タンパク質または機能RNAをコードし、該方法は、被験体の細胞を、標的タンパク質または機能RNAをコードするRIC mRNA前駆体の標的部分に相補的なアンチセンスオリゴマー(ASO)と接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能RN

40

50

AをコードするR I C m R N A前駆体から構成的にスプライシングされ、それにより、被験体の細胞内で、標的タンパク質または機能R N Aをコードするm R N Aのレベルを増加させ、標的タンパク質または機能R N Aの発現を増加させる。幾つかの実施形態において、本明細書にはまた、保持されたイントロン含有m R N A前駆体（R I C m R N A前駆体）を有している細胞によって、J A G 1である標的タンパク質の発現を増加させる方法が開示され、該R I C m R N A前駆体は、保持されたイントロン、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソン、および保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、ここでR I C m R N A前駆体はJ A G 1タンパク質をコードし、該方法は、細胞を、J A G 1タンパク質をコードするR I C m R N A前駆体の標的部分に相補的なアンチセンスオリゴマー（A S O）と接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、J A G 1タンパク質をコードするR I C m R N A前駆体から構成的にスプライシングされ、それにより、細胞内で、J A G 1タンパク質をコードするm R N Aのレベルを増加させ、J A G 1タンパク質の発現を増加させる。幾つかの実施形態では、標的タンパク質はJ A G 1である。幾つかの実施形態では、標的タンパク質または機能R N Aは、被験体において量または活性が不足している標的タンパク質または機能R N Aを機能的に増強または交換する、補償する（c o m p e n s a t i n g）タンパク質または補償する機能R N Aである。幾つかの実施形態では、細胞は、J A G 1タンパク質の量または活性の不足によって引き起こされた疾病を有する被験体内にあるか又は被験体に由来する。幾つかの実施形態では、標的タンパク質の量の不足は、標的タンパク質のハプロ不全によって引き起こされ、ここで被験体は、機能的な標的タンパク質をコードする第1の対立遺伝子、標的タンパク質が産生されない第2の対立遺伝子、または非機能性の標的タンパク質をコードする第2の対立遺伝子を有し、アンチセンスオリゴマーは、第1の対立遺伝子から転写されたR I C m R N A前駆体の標的部分に結合する。幾つかの実施形態では、被験体は、標的タンパク質の量または機能の不足に起因する障害によって引き起こされた疾病を有し、該被験体は、a) (i) 標的タンパク質が、野生型対立遺伝子からの産生と比較して、低下したレベルで産生させる、(i i) 標的タンパク質が、同等の野性型タンパク質と比較して、機能が低下した形態で産生される、または(i i i) 標的タンパク質が産生されない、第1の変異対立遺伝子、およびb) (i) 標的タンパク質が、野生型対立遺伝子からの産生と比較して、低下したレベルで産生させる、(i i) 標的タンパク質が、同等の野性型タンパク質と比較して、機能が低下した形態で産生される、または(i i i) 標的タンパク質が産生されない、第2の変異対立遺伝子を有し、ここで被験体が、a) (i i i) の第1の変異対立遺伝子を有するときに、第2の変異対立遺伝子は、b) (i) またはb) (i i) の変異対立遺伝子であり、被験体が、b) (i i i) の第2の変異対立遺伝子を有するときに、第1の変異対立遺伝子は、a) (i) またはa) (i i) の変異対立遺伝子であり、R I C m R N A前駆体は、a) (i) またはa) (i i) である第1の変異対立遺伝子及び/又はb) (i) またはb) (i i) である第2の変異対立遺伝子から転写される。幾つかの実施形態では、標的タンパク質は、同等の野生型タンパク質と比較して機能が低下した形態で産生される。幾つかの実施形態では、標的タンパク質は、同等の野生型タンパク質と比較して完全に機能的である形態で産生される。幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+6の領域から、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-16の領域内にある。幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、(a) 保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+6から+500、+6から+400、+6から300、+6から200、または+6から+100の領域内；または(b) 保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する、-16から-500、-16から-400、-16から-300、-16から-200、または-16から-100の領域内にある。幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体の標的部分は、(a) 保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける+2eから-4eの領域内；または(b) 保持されたイントロンの3'

の核酸塩基、11～15の核酸塩基、12～50の核酸塩基、12～40の核酸塩基、12～35の核酸塩基、12～30の核酸塩基、12～25の核酸塩基、12～20の核酸塩基、または12～15の核酸塩基から成る。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、タンパク質をコードするR I C m R N A前駆体の標的部位に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相補的である。幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体の標的部位は、S E Q I D N O : 4 3 7 - 4 3 9から選択される配列内にある。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、S E Q I D N O : 3 - 4 3 6のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%配列同一性であるヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、S E Q I D N O : 3 - 4 3 6から選択されるヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、細胞は、標的タンパク質または機能R N Aをコードする遺伝子から転写されたR I C m R N A前駆体の集団を含み、ここでR I C m R N A前駆体の集団は、2つ以上の保持されたイントロンを含み、アンチセンスオリゴマーは、R I C m R N A前駆体の集団における最も豊富な保持されたイントロンに結合する。幾つかの実施形態では、最も豊富な保持されたイントロンへのアンチセンスオリゴマーの結合は、R I C m R N A前駆体の集団からの2つ以上の保持されたイントロンのスプライシングアウトを誘発し、標的タンパク質または機能R N Aをコードするm R N Aを産生する。幾つかの実施形態では、細胞は、標的タンパク質または機能R N Aをコードする遺伝子から転写されたR I C m R N A前駆体の集団を含み、ここでR I C m R N A前駆体の集団は、2つ以上の保持されたイントロンを含み、アンチセンスオリゴマーは、R I C m R N A前駆体の集団において2番目に豊富な保持されたイントロンに結合する。幾つかの実施形態では、2番目に豊富な保持されたイントロンへのアンチセンスオリゴマーの結合は、R I C m R N A前駆体の集団からの2つ以上の保持されたイントロンのスプライシングアウトを誘発し、標的タンパク質または機能R N Aをコードするm R N Aを産生する。幾つかの実施形態では、疾患は、疾患または障害である。幾つかの実施形態では、疾患または疾患は、アラジール症候群または筋ジストロフィーである。幾つかの実施形態では、標的タンパク質およびR I C m R N A前駆体は、J A G 1遺伝子によってコードされる。幾つかの実施形態では、方法は、J A G 1タンパク質発現を評価する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、J A G 1 R I C m R N A前駆体の標的部位に結合し、ここで標的部位は、S E Q I D N O : 4 9、5 0、5 1、5 2、5 3、5 4、5 5、5 6、および5 7から選択される配列内にある。幾つかの実施形態では、被検体はヒトである。幾つかの実施形態では、被験体はヒト以外の動物である。幾つかの実施形態では、被験体は、胎児、胚、または小児である。幾つかの実施形態では、細胞はエクスピボにある。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、被験体の腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または静脈内注射によって投与される。幾つかの実施形態では、5'スプライス部位に隣接しているエクソンの-3eから-1eおよび保持されたイントロンの+1から+6での9つのヌクレオチドは、対応する野生型配列と同一である。幾つかの実施形態では、保持されたイントロンの-15から-1および3'スプライス部位に隣接しているエクソンの+1eでの16のヌクレオチドは、対応する野生型配列と同一である。

【0007】

本明細書には、特定の実施形態において、上記の方法に使用されるアンチセンスオリゴマーが開示される。

【0008】

本明細書には、特定の実施形態において、S E Q I D N O : 3 - 4 3 6のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、または100%の配列同一性を有する配列を含むアンチセンスオリゴマーが開示される。

【0009】

10

20

30

40

50

本明細書には、特定の実施形態において、上記のアンチセンスオリゴマーおよび賦形剤を含む医薬組成物が開示される。

【0010】

本明細書には、特定の実施形態において、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または静脈内注射により上記の医薬組成物を投与することによって必要としている被験体を処置する方法が開示される。

【0011】

本明細書には、特定の実施形態において、タンパク質不足または機能RNA不足に関係する必要としている被験体のアラジール症候群を処置するために細胞によって標的タンパク質または機能RNAの発現を増加させる方法に使用するための、アンチセンスオリゴマーを含む組成物が開示され、ここでタンパク質不足または機能RNA不足は、被験体における量または活性の不足であり、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能RNAをコードする保持されたイントロン含有mRNA前駆体(RIC mRNA前駆体)の構成的スプライシングを増強し、ここで標的タンパク質は、(a)不足したタンパク質；または(b)被験体において不足したタンパク質を機能的に増強または交換する、補償するタンパク質であり、および機能RNAは、(a)不足したRNA；または(b)被験体において不足した機能RNAを機能的に増強または交換する、補償する機能RNAであり、ここでRIC mRNA前駆体は、保持されたイントロン、5'スプライス部位に隣接しているエクソン、および3'スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能RNAをコードするRIC mRNA前駆体からスプライシングされ、それによって、被験体において標的タンパク質または機能RNAの產生または活性を増加させる。幾つかの実施形態において、本明細書にはまた、必要としている被験体においてJAG1タンパク質に関係する疾病を処置する方法に使用するための、アンチセンスオリゴマーを含む組成物が開示され、該方法は、被験体の細胞によってJAG1タンパク質の発現を増加させる工程を含み、ここで細胞は、保持されたイントロン、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソン、および保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソンを含む、保持されたイントロン含有mRNA前駆体(RIC mRNA前駆体)を有し、RIC mRNA前駆体は、JAG1タンパク質をコードし、該方法はまた、細胞をアンチセンスオリゴマーと接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、JAG1タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体の転写産物から構成的にスプライシングされ、それにより、被験体の細胞内で、JAG1タンパク質をコードするmRNAのレベルを増加させ、標的タンパク質または機能RNAの発現を増加させる。幾つかの実施形態では、疾病は、疾患または障害である。幾つかの実施形態では、疾患または疾病は、アラジール症候群または筋ジストロフィーである。幾つかの実施形態では、標的タンパク質およびRIC mRNA前駆体は、JAG1遺伝子によってコードされる。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+6の領域から、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-16の領域内にある、RIC mRNA前駆体の一部を標的とする。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、保持されたイントロンにおいて、(a)保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+6から+100の領域内；または(b)保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-16から-100の領域内にある。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、少なくとも1つの保持されたイントロンの5'スプライス部位の約100のヌクレオチド下流から、少なくとも1つの保持されたイントロンの3'スプライス部位の約100のヌクレオチド上流までの領域内にある、RIC mRNA前駆体の一部を標的とする。幾つかの実施形態では、RIC mRNA前駆体の標的部位は、(a)保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける+2eから-4eの領域内；または(b)保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける+2eから-4eの領域内にある。幾つかの実施形態では、RIC mRNA前駆体は、SEQ ID NO:1に対して少なくと

10

20

30

40

50

も約 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %または 1 0 0 %の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる。幾つかの実施形態では、 R I C m R N A 前駆体は、 S E Q I D N O : 2 に対して少なくとも約 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %または 1 0 0 %の配列同一性を有する配列を含む。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能 R N A をコードする遺伝子から転写された m R N A 前駆体の選択的スプライシングを調節することにより標的タンパク質または機能 R N A の量を増加させない。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能 R N A をコードする遺伝子の突然変異から結果として生じる異常スプライシングを調節することにより標的タンパク質または機能 R N A の量を増加させない。幾つかの実施形態では、 R I C m R N A 前駆体は、全長 m R N A 前駆体または野生型 m R N A 前駆体から部分的スプライシングによって產生された。幾つかの実施形態では、標的タンパク質または機能 R N A をコードする m R N A は、全長成熟 m R N A または野生型成熟 m R N A である。幾つかの実施形態では、產生される標的タンパク質は、全長タンパク質または野生型タンパク質である。幾つかの実施形態では、保持されたイントロンは、律速の(r a t e - l i m i t i n g)イントロンである。幾つかの実施形態では、保持されたイントロンは、 R I C m R N A 前駆体において最も豊富な保持されたイントロンである。幾つかの実施形態では、保持されたイントロンは、 R I C m R N A 前駆体において 2 番目に豊富な保持されたイントロンである。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホロチオエート結合またはホスホジアミデート結合を含む骨格修飾を含む。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホロジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2' - O - メチル、2' - フルオロ、または 2' - O - メトキシエチル部分を含む。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、少なくとも 1 つの修飾された糖部を含む。幾つかの実施形態では、各糖部は、修飾された糖部である。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、8 ~ 5 0 の核酸塩基、8 ~ 4 0 の核酸塩基、8 ~ 3 5 の核酸塩基、8 ~ 3 0 の核酸塩基、8 ~ 2 5 の核酸塩基、8 ~ 2 0 の核酸塩基、8 ~ 1 5 の核酸塩基、9 ~ 5 0 の核酸塩基、9 ~ 4 0 の核酸塩基、9 ~ 3 5 の核酸塩基、9 ~ 3 0 の核酸塩基、9 ~ 2 5 の核酸塩基、9 ~ 2 0 の核酸塩基、9 ~ 1 5 の核酸塩基、1 0 ~ 5 0 の核酸塩基、1 0 ~ 4 0 の核酸塩基、1 0 ~ 3 5 の核酸塩基、1 0 ~ 3 0 の核酸塩基、1 0 ~ 2 5 の核酸塩基、1 0 ~ 2 0 の核酸塩基、1 0 ~ 1 5 の核酸塩基、1 1 ~ 5 0 の核酸塩基、1 1 ~ 4 0 の核酸塩基、1 1 ~ 3 5 の核酸塩基、1 1 ~ 3 0 の核酸塩基、1 1 ~ 2 5 の核酸塩基、1 1 ~ 2 0 の核酸塩基、1 1 ~ 1 5 の核酸塩基、1 2 ~ 5 0 の核酸塩基、1 2 ~ 4 0 の核酸塩基、1 2 ~ 3 5 の核酸塩基、1 2 ~ 3 0 の核酸塩基、1 2 ~ 2 5 の核酸塩基、1 2 ~ 2 0 の核酸塩基、または 1 2 ~ 1 5 の核酸塩基から成る。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、タンパク質をコードする R I C m R N A 前駆体の標的部分に、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 %相補的である。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、 J A G 1 R I C m R N A 前駆体の標的部分に結合し、ここで標的部分は、 S E Q I D N O : 4 3 7 - 4 3 9 から選択される配列内にある。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、 S E Q I D N O : 3 - 4 3 6 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、または 9 9 %配列同一性であるヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、 S E Q I D N O : 3 - 4 3 6 から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 1 2 】

本明細書には、特定の実施形態において、上記の組成物のいずれかのアンチセンスオリゴマー、および賦形剤を含む医薬組成物が開示される。幾つかの実施形態において、本明細書にはまた、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または静脈内注射により医薬組成物を投与することによって、必要としている被験体を処置する方法が記載される。

10

20

30

40

50

【0013】

本明細書には、特定の実施形態において、不足した JAG1 mRNA の転写産物の標的配列にハイブリダイズするアンチセンスオリゴマー、および薬学的に許容可能な賦形剤を含む、医薬組成物が開示され、ここで不足した JAG1 mRNA の転写産物は保持されたイントロンを含み、アンチセンスオリゴマーは、不足した JAG1 mRNA の転写産物からの保持されたイントロンのスプライシングアウトを誘発する。幾つかの実施形態では、不足した JAG1 mRNA の転写産物は、JAG1 RIC mRNA 前駆体の転写産物である。幾つかの実施形態では、JAG1 RIC mRNA 前駆体の転写産物の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する + 6 の領域から、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対する - 16 の領域内にある。幾つかの実施形態では、JAG1 RIC mRNA 前駆体の転写産物は、SEQ ID NO : 1 に対して、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる。幾つかの実施形態では、JAG1 RIC mRNA 前駆体の転写産物は、SEQ ID NO : 2 に対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する配列を含む。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホロチオエート結合またはホスホジアミデート結合を含む骨格修飾を含む。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2' - O - メチル、2' - フルオロ、または 2' - O - メトキシエチル部分を含む。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、少なくとも 1 つの修飾された糖部を含む。アンチセンスオリゴマーは、8 ~ 50 の核酸塩基、8 ~ 40 の核酸塩基、8 ~ 35 の核酸塩基、8 ~ 30 の核酸塩基、8 ~ 25 の核酸塩基、8 ~ 20 の核酸塩基、8 ~ 15 の核酸塩基、9 ~ 50 の核酸塩基、9 ~ 40 の核酸塩基、9 ~ 35 の核酸塩基、9 ~ 30 の核酸塩基、9 ~ 25 の核酸塩基、9 ~ 20 の核酸塩基、9 ~ 15 の核酸塩基、10 ~ 50 の核酸塩基、10 ~ 40 の核酸塩基、10 ~ 35 の核酸塩基、10 ~ 30 の核酸塩基、10 ~ 25 の核酸塩基、10 ~ 20 の核酸塩基、10 ~ 15 の核酸塩基、11 ~ 50 の核酸塩基、11 ~ 40 の核酸塩基、11 ~ 35 の核酸塩基、11 ~ 30 の核酸塩基、11 ~ 25 の核酸塩基、11 ~ 20 の核酸塩基、11 ~ 15 の核酸塩基、12 ~ 50 の核酸塩基、12 ~ 40 の核酸塩基、12 ~ 35 の核酸塩基、12 ~ 30 の核酸塩基、12 ~ 25 の核酸塩基、12 ~ 20 の核酸塩基、または 12 ~ 15 の核酸塩基を含む。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、JAG1 RIC mRNA 前駆体の転写産物の標的部分に、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 相補的である。幾つかの実施形態では、JAG1 RIC mRNA 前駆体の転写産物の標的部分は、SEQ ID NO : 437 - 439 から選択される配列内にある。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、SEQ ID NO : 3 - 436 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 配列同一性であるヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、SEQ ID NO : 3 - 436 から選択されるヌクレオチド配列を含む。幾つかの実施形態では、医薬組成物は、髄腔内注射、脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射または静脈内注射のために製剤される。

【0014】

本明細書には、特定の実施形態において、ツベリンタンパク質の機能形態をコードする十分に処理された JAG1 mRNA の転写産物を产生するために、保持されたイントロンの除去を促進するように不足した JAG1 mRNA の転写産物の処理を誘発する方法が開示され、該方法は、(a) アンチセンスオリゴマーを被験体の標的細胞と接触させる工程；(b) アンチセンスオリゴマーを不足した JAG1 mRNA の転写産物にハイブリダイズする工程であって、不足した JAG1 mRNA の転写産物が、ツベリンタンパ

10

20

30

40

50

ク質の機能形態をコードすることができ、少なくとも 1 つの保持されたイントロンを含む、工程；(c) ツベリンタンパク質の機能形態をコードする十分に処理された JAG1 mRNA の転写産物を產生するために、不足した JAG1 mRNA の転写産物から少なくとも 1 つの保持されたイントロンを除去する工程；および(d) 十分に処理された JAG1 mRNA の転写産物からツベリンタンパク質の機能形態を翻訳する工程を含む。幾つかの実施形態では、保持されたイントロンは、保持されたイントロン全体である。幾つかの実施形態では、不足した JAG1 mRNA の転写産物は、JAG1 RIC mRNA 前駆体の転写産物である。

【0015】

本明細書には、特定の実施形態において、JAG1 タンパク質の量または活性の不足によって引き起こされた疾病を有する被験体を処置する方法が開示され、該方法は、SEQ ID NO: 3-436 のいずれか 1 つに対して、少なくとも約 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むアンチセンスオリゴマーを被験体に投与する工程を含む。

10

【0016】

< 参照による組み込み >

本明細書で言及されるすべての出版物、特許、および特許出願は、あたかも個々の出版物、特許、または特許出願が参照により組み込まれるように具体的かつ個々に指示される程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【図面の簡単な説明】

【0017】

本発明の新規な特徴は、特に、添付の特許請求の範囲内に明記される。本発明の諸原則が利用される例示の実施形態について説明する以下の詳細な記載と、添付の図面を参照することで、本発明の特徴および利点についてのよりよい理解が得られるであろう。

【図 1】図 1 は、例示的な保持されたイントロン含有 (RIC) mRNA 前駆体の転写産物の概略図を示す。5' スプライス部位コンセンサス配列は、-3e から -1e および +1 から +6 (「e」のついた数字はエクソンであり、付いていない数字はイントロンである) の、下線部の文字 (文字はヌクレオチド、大文字はエクソン部分、小文字はイントロン部分) で示される。3' スプライス部位コンセンサス配列は、-15 から -1 および +1e (「e」のついた数字はエクソンであり、付いていない数字はイントロンである) の、下線部の文字 (文字はヌクレオチド、大文字はエクソン部分、小文字はイントロン部分) で示される。ASO スクリーニングのイントロンの標的部位は、保持されたイントロンの 5' スプライス部位 (左の矢印) に対応するヌクレオチド +6 から、保持されたイントロンの 3' スプライス部位 (右の矢印) に対応するヌクレオチド -16 までを含む。実施形態では、ASO スクリーニングのイントロンの標的部位は、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対応するヌクレオチド +6 から +100、および保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対応するヌクレオチド -16 から -100 を含む。エクソンの標的部位は、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に隣接するエクソンの +2e から -4e、および保持されたイントロンの 3' スプライス部位に隣接する +2e から -4e のヌクレオチドを含む。「n」または「N」はヌクレオチドを表し、「y」はピリミジンを表す。図示された配列は、哺乳動物のスプライス部位のコンセンサス配列を表し、個々のイントロンおよびエクソンはすべての位置でコンセンサス配列をマッチングする必要があるとは限らない。

30

【図 2A】図 2A は、核内遺伝子出力の標的化増大 (Targeted Augmentation of Nuclear Gene Output) (TANGO) の概略図を示す。図 2A は、核と細胞質区画に分割された細胞を示す。核では、エクソン (長方形) およびイントロン (接続線) からなる標的遺伝子の mRNA 前駆体の転写産物は、mRNA を生成するためにスプライシングを受け、この mRNA は細胞質に輸送され、標的タンパク質に翻訳される。この標的遺伝子については、イントロン 1 のスプライシングは非

40

50

効率的であり、保持されたイントロン含有 (R I C) mRNA 前駆体は、主として核に蓄積し、細胞質に輸送された場合は標的タンパク質產生に至ることなく劣化する。図 2 B は、核と細胞質区画に分割された同様の細胞の例を示す。アンチセンスオリゴマー (ASO) での処置は、イントロン 1 のスプライシングを促進し、かつ mRNA の増加をもたらし、これは順に、高位レベルの標的タンパク質に翻訳される。

【図 2 B】図 2 B は、核内遺伝子出力の標的化増大 (Targeted Augmentation of Nuclear Gene Output) (TANGO) の概略図を示す。図 2 A は、核と細胞質区画に分割された細胞を示す。核では、エクソン (長方形) およびイントロン (接続線) からなる標的遺伝子の mRNA 前駆体の転写産物は、mRNA を生成するためにスプライシングを受け、この mRNA は細胞質に輸送され、標的タンパク質に翻訳される。この標的遺伝子については、イントロン 1 のスプライシングは非効率的であり、保持されたイントロン含有 (R I C) mRNA 前駆体は、主として核に蓄積し、細胞質に輸送された場合は標的タンパク質產生に至ることなく劣化する。図 2 B は、核と細胞質区画に分割された同様の細胞の例を示す。アンチセンスオリゴマー (ASO) での処置は、イントロン 1 のスプライシングを促進し、かつ mRNA の増加をもたらし、これは順に、高位レベルの標的タンパク質に翻訳される。

【図 3】図 3 は、イントロン 13 をもつ JAG1 遺伝子中のイントロン保持を詳細に示す。RNA 配列決定 (RNA seq) を用いた、JAG1 遺伝子中のイントロン保持事象の特定は、UCSC ゲノムプラウザで視覚化され示される。上部パネルは、THLE-3 (ヒト肝上皮) 細胞中に発現し、細胞質 (上部) または核分画 (底部) のいずれかに局在する JAG1 転写産物に対応する読取密度を示す。このパネルの底部には、JAG1 遺伝子のグラフ表現が、目盛に合わせて示される。読取密度は、ピークとして示される。最も高い読取密度は、エクソン (ブラックボックス) に相当し、一方、いずれの細胞分画においてもイントロンの大半 (矢印頭部を有する線) については、読取は観察されない。細胞質分画と比較してより高い読取密度は、核分画のイントロン 13、18、および 23 (矢印が示す部分) で検出され、これはイントロン 13、18、および 23 のスプライシング効率が低く、結果としてイントロン保持をもたらすことを示している。保持されたイントロン含有 mRNA 前駆体の転写産物は、主として核に蓄積し、JAG1 タンパク質に翻訳されない。THLE-3 細胞のイントロン 13 についての読取密度は、生物情報学的な分析によって計算されるとおり 12 % のイントロン保持を示す下部パネルに詳細に示される。

【図 4】図 4 は JAG1 遺伝子 IVS 13 ASO ウォークを示す。2'-OMe ASO、PS 骨格を使用して、5' スプライス部位のすぐ下流、または 3' スプライス部位の上流の配列を標的とする、JAG1 IVS 13 に対して行われた ASO ウォークのグラフ表現が示される。ASO は、一度に 5 つのヌクレオチドの位置を変えることにより、これらの領域をカバーするように設計された。JAG1 エクソン - イントロン構造は目盛に合わせて示される。

【図 5】図 5 は、放射性 RT-PCR によって評価される JAG1 イントロン 13 ASO ウォークを示す。上部では、エクソン 13 - イントロン 13 - エクソン 14 の概略図 (縮尺通りではない) は、RT-PCR アッセイに使用したプライマー Forward 1 (F1) および Reverse 1 (R1) を示す。中央のパネルでは、代表的なゲルが、ARPE-19 細胞中 60 nM の濃度で、JAG1 偽処理 (neg、RNAi MAX のみ)、ASO 処理された SMN - 対照、または、イントロン 13 を標的とする 2'-OMe ASO で処理された SMN - 対照、の放射性 RT-PCR 産物を示す。下部パネルでは、2 つの独立した実験から得られたベータアクチンに正規化された JAG1 放射性 RT-PCR 産物に対応するバンドの定量化を、偽処理した産物に対する倍数変化として棒グラフにプロットする。Y 軸上で 1 と標識された黒線は、1 の比率 (変化なし) を示す。

【図 6】図 6 は、RT-qPCR によって評価された JAG1 イントロン 13 ASO ウォークを示す。左上では、RT-qPCR アッセイの概略図はプライマー認識部位を示す。図 3 に示すような放射性 RT-PCR によって評価された同じ ASO トランスフェクション実験を用いて得られた RT-qPCR 増幅結果を、アクチン (上の棒グラフ) また

10

20

30

40

50

は R P L 3 2 (下の棒グラフ) に正規化した偽処理した産物に対してプロットし、放射性 R T - P C R の結果を確認する。 Y 軸上で 1 と標識された黒線は、 1 の比率 (变化なし) を示す。

【図 7】図 7 は、 イントロン 1 8 をもつ J A G 1 遺伝子中のイントロン保持を詳細に示す。 J A G 1 遺伝子中のイントロン保持は、 実施例中に本明細書に述べられているように、 R N A 配列決定 (R N A s e q) によって特定され、 U C S C ゲノムプラウザ中で視覚化された。 T H L E - 3 細胞のイントロン 1 8 についての読み取り密度が下のパネルに詳細に示され、 生物情報学的な分析によって計算されるとおり 1 4 % のイントロン保持を示す。

【図 8】図 8 は J A G 1 遺伝子 I V S 1 8 A S O ウォークを示す。 2 ' - O M e A S O 、 P S 骨格を使用して、 5 ' スプライス部位のすぐ下流、 または 3 ' スプライス部位の上流の配列を標的とする J A G 1 I V S 1 8 に対して行われた A S O ウォークが図示される。 A S O は、 一度に 5 つのヌクレオチドの位置を変えることにより、 これらの領域をカバーするように設計された。 J A G 1 エクソン - イントロン構造は目盛に合わせて示される。

【図 9】図 9 は、 放射性 R T - P C R によって評価される J A G 1 イントロン 1 8 A S O ウォークを示す。 上部では、 エクソン 1 8 からエクソン 2 0 の概略図 (縮尺通りではない) が、 R T - P C R アッセイに使用したプライマー F o r w a r d 1 (F 1) および R e v e r s e 1 (R 1) を示す。 中央のパネルでは、 代表的なゲルが、 A R P E - 1 9 細胞中 6 0 n M の濃度で、 実施例および図 6 の記載で本明細書中に述べられたように、 J A G 1 偽処理 (n e g 、 R N A i M A X のみ) 、 A S O 処理された S M N - 対照、 または、 イントロン 1 8 を標的とする 2 ' - O - M e A S O で処理された S M N - 対照、 の放射性 R T - P C R 産物を示す。 2 つの独立した実験から得られたベータアクチンに正規化された J A G 1 放射性 R T - P C R 産物に対応するバンドの定量化を、 偽処理した産物に対する倍数変化として下の棒グラフにプロットする。 Y 軸上で 1 と標識された黒線は、 1 の比率 (变化なし) を示す。

【図 10】図 10 は、 R T - q P C R によって評価された J A G 1 イントロン 1 8 A S O ウォークを示す。 左上では、 R T - q P C R アッセイの概略図がプライマー認識部位を示す。 図 7 に示すような放射性 R T - P C R によって評価された同じ A S O トランスフェクション実験を用いて得られた R T - q P C R 増幅結果を、 アクチン (上の棒グラフ) または R P L 3 2 (下の棒グラフ) に正規化した偽処理した産物に対してプロットし、 放射性 R T - P C R の結果を確認する。 Y 軸上で 1 と標識された黒線は、 1 の比率 (变化なし) を示す。

【図 11】図 11 は、 イントロン 2 3 をもつ J A G 1 遺伝子中のイントロン保持を詳細に示す。 J A G 1 遺伝子中のイントロン保持は、 実施例中および図 1 の記載で本明細書に述べられているように、 R N A 配列決定 (R N A s e q) によって特定され、 U C S C ゲノムプラウザ中で視覚化された。 T H L E - 3 細胞のイントロン 2 3 についての読み取り密度が下のパネルに詳細に示され、 生物情報学的な分析によって計算されるとおり 1 7 % のイントロン保持を示す。

【図 12】図 12 は J A G 1 遺伝子 I V S 2 3 A S O ウォークを示す。 2 ' - O M e A S O 、 P S 骨格を使用して、 5 ' スプライス部位のすぐ下流、 または 3 ' スプライス部位の上流の配列を標的とする J A G 1 I V S 2 3 に対して行われた A S O ウォークが図示される。 A S O は、 一度に 5 つのヌクレオチドの位置を変えることにより、 これらの領域をカバーするように設計された。 J A G 1 エクソン - イントロン構造は目盛に合わせて示される。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 8 】

2 つ以上のイントロンを有するタンパク質コード遺伝子の一次転写産物中の個々のイントロンは、 異なる効率性をもつ一次転写産物からスプライシングされる。 ほとんどの場合、 完全にスプライシングされた m R N A だけが、 続く細胞質での翻訳のために核膜孔を通じて輸送される。 スプライシングされていない、 または部分的にスプライシングされた転

10

20

30

40

50

写産物は、核内で検出可能である。完全にスプライシングされていない転写産物の核内蓄積は、タンパク質に翻訳されうる細胞質中の有害な恐れのあるmRNAの蓄積を防止するメカニズムであると一般的に考えられる。いくつかの遺伝子については、最も効率性の低いイントロンのスプライシングは、細胞質中の翻訳に先立つ、遺伝子発現における律速的な転写後工程である。

【0019】

かなりのレベルの部分的にスプライシングされたJAG1遺伝子の転写産物、これは衰弱性の遺伝性疾患であるアラジール症候群において不足しているJAG1-タンパク質をコードするものであるが、これがヒト細胞の核で発見されてきた。これらのJAG1mRNA前駆体の種は少なくとも1つの保持されたイントロンを含む。本発明は、完全にスプライシングされた成熟mRNAの定常状態での産生を増大させ、従って翻訳されたJAG1-タンパク質レベルを増大させるために、遺伝子発現の核段階において律速的である、1つ以上の保持されたJAG1イントロンのスプライシングをアップレギュレートするための組成物と方法を提供する。これらの組成物および方法は、核に蓄積する保持されたイントロン含有JAG1mRNA前駆体のイントロンスプライス部位において構成的スプライシングを促進するアンチセンスオリゴマー(ASO)を活用する。したがって、実施形態では、JAG1の不足に起因する疾患を治療するために、本発明の方法を用いて、JAG1-タンパク質を増加させる。

10

【0020】

他の実施形態では、本発明の方法は、それを必要とする被験体の症状を治療するために、JAG1-産生を増大させるために使用される。複数の実施形態では、被験体は、JAG1が野性型に対して必ずしも不足していないが、それにも関わらずJAG1の増加が疾患を緩和する症状を有している。複数の実施形態では、被験体は筋ジストロフィーを患っている。複数の実施形態では、被験体はジストロフィン不足(dystrophin deficiency)を患っている。例えば、Vieira et al.、2015、"Jagged 1 Rescues the Duchenne Muscular Dystrophy Phenotype"、Cell 163:1204-1213は、筋肉におけるJAG1発現の増加がジストロフィン不足表現型をこの疾患の2つの異なる動物モデルにおいて救済できることを示唆する所見を記載している。

20

【0021】

30

<アラジール症候群>

動脈肝異形成症とも呼ばれるアラジール症候群(ALGS)は、常染色体優性の多系統障害である(Turnpenny and Elладd、2012)。主な臨床的および病理学的な所見は、肝内胆管の不足による肝臓病、心臓病、血管異常、骨格異常、眼の特徴、顔の特徴、腎臓の異常、成長遅延、および膵臓機能不全である。ALGSの臨床的所見は、肝臓、心臓、脊椎、眼、または顔の異常を含む5つの臨床的特徴のうち3つの存在が胆管の不足とともに存在することに基づく、「古典的な」ALGSの臨床的診断を伴って変動し得る(Lu et al.、2003、72、1065~1070；Penton et al.、Seminars Cell & Dev. Biol. 2012、23、450-457)。報告されている1:70,000のALGSの罹患率は、その状態のばらつきおよび浸透率の低下のために過小評価されていると考えられる。

40

【0022】

50

Notchシグナルに関する遺伝子の突然変異はALGSを引き起こすと報告されてきた。JAG1はJAG1タンパク質、Notch膜貫通型受容体のための細胞表面リガンドをコードする。JAG1遺伝子のヒトのゲノムの配列は、例えば、Jurkiewicz, D., et al.、2014、"Spectrum of JAG1 gene mutations in Polish patients with Alagille syndrome," J. Appl. Genetics 55:329-336、およびthe amino acid sequence at UniProtKB: P78504-1, Oda, T., et al.、1997，

"Identification and cloning of the human homolog (JAG1) of the rat Jagged1 gene from the Alagille syndrome critical region at 20p12," *Genomics* 43 (3): 376-379により記載されたNCBI Gene ID 182に開示され、その全てが参照によって本明細書に組込まれる。JAG1の正準のmRNA配列はNCBI参照配列: Duryagina R, et al., 2013, "Overexpression of Jagged-1 and its intracellular domain in human mesenchymal stromal cells differentially affect the interaction with hematopoietic stem and progenitor cells," *Stem Cells Dev.* 22 (20), 2736-2750に記載されたNM_000214.2で開示されており、この両方が参照によって本明細書に組込まれた。NotchへのJAG1リガンドの結合は、細胞運命の決定および分化に関する遺伝子の転写をもたらすシグナルカスケードを誘発する。JAG1中の突然変異はALGS1型、すなわち最も蔓延している疾患型を引き起こし、その一方でNOTCH2中の突然変異はALGS2型を引き起こす。

【0023】

JAG1遺伝子は、26のエクソンから成り、染色体20p11.2-20p12に位置する。ALGSの中のJAG1突然変異は全タンパク質に広げられ、かつ、およそ60%という高いデノボ突然変異率である。突然変異の80%はフレームシフト変異、ナンセンス変異、およびスプライス部位の変異を含み；全体の遺伝子欠失が、突然変異の7%を占め、かつ、ミスセンス変異は12%に相当する(Lu et al., 2003)。全体の遺伝子欠失は、短縮型変異(truncating mutations)およびミスセンス変異で見られる表現型に類似した表現型をもたらすので、大多数の場合、ハプロ不全は疾患の原因である可能性の高いメカニズムである(Lu et al., 2003; Turnpenny and Ellard, 2012)。

【0024】

肝臓病を含む古典的なALGS表現型に関連した突然変異は機能的なハプロ不全を表し、その結果、JAG1の細胞表面濃度は野生型レベルの50%であった(Lu et al., 2003)。対照的に、JAG1-G274Dタンパク質の発現を結果としてもたらすJAG1ミスセンス変異が、2つのタンパク質集団を產生し、1つの集団がグリコシル化欠損を示し、したがって細胞表面への輸送を妨げると報告してきた。JAG1-G274D突然変異は、肝臓疾患の非存在下での心臓特異的表現型と関連し、突然変異のキャリアは、細胞表面上のJAG1の正常濃度の50%超だが100%未満であった。したがって、発達中の肝臓は、発達中の心臓より少ないJAG1を必要とし得る(Lu et al., 2003)。

【0025】

<筋肉修復>

上記のように、JAG1がジストロフィン不足表現型を2つの動物モデルにおいて救済する可能性が記載されている(Vieira, et al., 2015)。デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)およびベッカー筋ジストロフィー(BMD)を含む筋ジストロフィー中の筋肉ジストロフィンの不足は、進行性の筋肉変性および萎縮を引き起こす。DMDでは、呼吸不全または心不全により最終的に死亡する。これらの疾患ではJAG1は不足していないが、JAG1のレベルが増大すると、筋細胞増殖および修復を刺激しうる。複数の実施形態では、本発明の方法および組成物は、その必要のある被験体の筋肉修復を刺激するようJAG1産生を増加させるために使用される。複数の実施形態では、被験体は筋ジストロフィーを患っている。複数の実施形態では、筋ジストロフィーはDMD、BMD、または、肢帶、先天性、顔面肩甲上腕型、筋緊張性、眼咽頭筋、遠位、またはエメリー・ドレイフス型の筋ジストロフィーである。複数の実施形態では、被験体

はジストロフィン不足を患っている。実施形態では、ジストロフィン不足は DMD または BMD である。複数の実施形態では、被験体は、(DYSF 遺伝子によってコードされた)ジスフェリン、(EMD 遺伝子によってコードされた)エメリン、DUX4、(DMPK 遺伝子によってコードされた)筋緊張性ジストロフィープロテインキナーゼ (MDPK) またはジストロフィアミオトニカプロテインキナーゼ (DMK) とも呼ばれるミオトニンプロテインキナーゼ (MT-PK)、(CNBP 遺伝子によってコードされた)細胞核酸結合タンパク質、または、(PABPN1 遺伝子によってコードされた)ポリアデニル化結合核タンパク質 1 (PABPN1) とも呼ばれるポリアデニル化結合タンパク質 2 (PANP-2)、における不足によって引き起こされる筋ジストロフィーを有している。

【0026】

10

<保持されたイントロン含有mRNA前駆体 (RIC mRNA前駆体)>

複数の実施形態では、本明細書において示された方法は、細胞核中で、JAG1 遺伝子から転写され、JAG1-タンパク質をコードする、保持されたイントロン含有mRNA前駆体 (RIC mRNA前駆体) の存在を活用する。成熟し、完全にスプライシングされた JAG1 mRNA を産出するための、特定の JAG1 RIC mRNA 前駆体の種のスプライシングは、保持されたイントロンのスプライシングアウトを刺激する ASO を用いて誘導される。結果としてもたらされる成熟 JAG1 mRNA は、細胞質に輸送され翻訳され、それによって被験体の細胞中の JAG1-タンパク質量を増加させ、アラジール症候群の症状を緩和する。この方法は以下でさらに詳述されるが、核内遺伝子出力の標的化増大 (TANGO) として知られる。

20

【0027】

20

JAG1核の転写産物

本明細書の実施例に記載されるように、JAG1 遺伝子はイントロン保持事象について分析され、イントロン 13、18 および 23 の保持が観察された。UCSC ゲノムブラウザによって視覚化された RNA 配列決定 (RNAseq) は、THLE-3 (ヒト肝上皮) 細胞に発現した JAG1 転写産物を示し、細胞質または核分画のいずれかに局在した。どちらの分画においても、読み取りは大多数のイントロンにおいて観察されなかった。しかしながら、細胞質分画と比較してより高い読取密度が、核分画のイントロン 13、18 および 23 において検出され、これはイントロン 13、18 および 23 のスプライシング効率が低く、結果としてイントロン保持をもたらすことを示している。保持されたイントロン含有mRNA前駆体の転写産物は、主として核に蓄積し、JAG1タンパク質に翻訳されない。イントロン 13、18 および 23 についての読取密度は、それぞれ、12%、14% および 17% のイントロン保持を示した。

30

【0028】

表 1 は、JAG1 RIC mRNA 前駆体の領域を標的化することによって JAG1 タンパク質の産生を増加させるのに有用な、配列 ID ごとの JAG1 RIC mRNA 前駆体転写産物の標的配列、および、配列 ID ごとの ASO の、非限定的なリストを提供する。複数の実施形態では、この目的に有用な他の ASO は、例えば、本明細書に記載の方法を用いて特定される。

40

【0029】

【表1】

表1. 標的およびJAG1遺伝子を標的とするASOのリスト

遺伝子 SEQ ID NO:	mRNA前駆体 SEQ ID NO:	ASO	保持された イントロン	標的配列 SEQ ID NO:
JAG1 SEQ ID NO: 1	JAG1:NM_000214 SEQ ID NO: 2	SEQ ID NOs: 3-111	18	439
		SEQ ID NOs: 112- 331	13	438
		SEQ ID NOs: 332- 436	23	437

10

【0030】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるASOは、JAG1ゲノム配列から転写されたRIC mRNA前駆体を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンを含むJAG1ゲノム配列からのRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ ID NO: 1のRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンを含むSEQ ID NO: 1のRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるASOは、JAG1のRIC mRNA前駆体の配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、13、18、23またはその組み合わせで保持されたイントロンを含むJAG1のRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とし、ここにおいて、イントロンの番号付けは、NM_000214におけるmRNA配列に一致する。

20

【0031】

いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ ID NO: 2で示されるJAG1のRIC mRNA前駆体の配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン13、保持されたイントロン18、保持されたイントロン23、またはそれらの組み合わせを含む、SEQ ID NO: 2に係るJAG1のRIC mRNA前駆体の配列を標的とする。いくつかの実施形態では、本明細書中に開示されるASOは、SEQ ID NOs: 437-439を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ ID NO: 3-436のいずれか1つにかかる配列を有する。

30

【0032】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン18を含むJAG1のRIC mRNA前駆体のエクソン18またはエクソン19を標的とし、ここにおいて、イントロンの番号付けは、NM_000214におけるmRNA配列に一致する。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン18を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも上流（または5'）のエクソン18配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン18を含むJAG1のRIC

40

mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも、約4から約99ヌクレオチド上流（または5'）の、エクソン18配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン18を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも下流（または3'）のエクソン19配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン18を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも約2から約7ヌクレオチド下流（または3'）の、エクソン19配列を標的とする。

【0033】

50

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン18を含むJAG1のRIC mRNA前駆体中のイントロン18を標的とし、ここにおいてイントロンの番号付けはNM_000214におけるmRNA配列に相当する。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン18を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも下流（または3'）のイントロン18配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン18を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも約16から約239ヌクレオチド下流（または3'）の、イントロン18配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン18を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも上流（または5'）のイントロン18配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン18を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも約16から約253ヌクレオチド上流（または5'）の、イントロン18配列を標的とする。

【0034】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン13を含むJAG1のRIC mRNA前駆体のエクソン13またはエクソン14を標的とし、ここにおいて、イントロンの番号付けは、NM_000214におけるmRNA配列に一致する。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン13を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも上流（または5'）のエクソン13配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン13を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも約14から約131ヌクレオチド上流（または5'）の、エクソン13配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン13を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも下流（または3'）のエクソン14配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン13を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも約2から約147ヌクレオチド下流（または3'）の、エクソン14配列を標的とする。

【0035】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン13を含むJAG1のRIC mRNA前駆体中のイントロン13を標的とし、ここにおいてイントロンの番号付けはNM_000214におけるmRNA配列に相当する。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン13を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも下流（または3'）のイントロン13配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン13を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも約16から約440ヌクレオチド下流（または3'）の、イントロン13配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン13を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも上流（または5'）のイントロン13配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン13を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも約16から約441ヌクレオチド上流（または5'）の、イントロン13配列を標的とする。

【0036】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン23を含むJAG1のRIC mRNA前駆体のエクソン23またはエクソン24を標的とし、ここにおいて、イントロンの番号付けは、NM_000214におけるmRNA配列に一致する。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン23を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも上流（または5'）のエクソン23配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン23を含むJAG1のRIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも、約4から約216ヌクレオチド上流（または5'）の、エクソン23配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保

10

20

30

40

50

持されたイントロン 2 3 を含む J A G 1 の R I C m R N A 前駆体の 3' スプライス部位よりも下流（または 3'）のエクソン 2 4 配列を標的とする。いくつかの実施形態では、A S O は、保持されたイントロン 2 3 を含む J A G 1 の R I C m R N A 前駆体の 3' スプライス部位よりも約 2 から約 1 1 4 ヌクレオチド下流（または 3'）の、エクソン 2 4 配列を標的とする。

【 0 0 3 7 】

いくつかの実施形態では、A S O は、保持されたイントロン 2 3 を含む J A G 1 の R I C m R N A 前駆体中のイントロン 2 3 を標的とし、ここにおいてイントロンの番号付けは N M _ 0 0 0 2 1 4 における m R N A 配列に相当する。いくつかの実施形態では、A S O は、保持されたイントロン 2 3 を含む J A G 1 の R I C m R N A 前駆体の 5' スプライス部位よりも下流（または 3'）のイントロン 2 3 配列を標的とする。いくつかの実施形態では、A S O は、保持されたイントロン 2 3 を含む J A G 1 の R I C m R N A 前駆体の 5' スプライス部位よりも約 6 から約 1 2 1 ヌクレオチド下流（または 3'）の、イントロン 2 3 配列を標的とする。いくつかの実施形態では、A S O は、保持されたイントロン 2 3 を含む J A G 1 の R I C m R N A 前駆体の 3' スプライス部位よりも上流（または 5'）のイントロン 2 3 配列を標的とする。いくつかの実施形態では、A S O は、保持されたイントロン 2 3 を含む J A G 1 の R I C m R N A 前駆体の 3' スプライス部位よりも約 1 6 から約 1 2 1 ヌクレオチド上流（または 5'）の、イントロン 2 3 配列を標的とする。

10

【 0 0 3 8 】

イントロンの番号付けは異なる J A G 1 アイソフォーム配列に関して変化しうると解される。当業者であれば、本明細書で提供されるイントロン配列に基づき、または N M _ 0 0 0 2 1 4 . 2 における m R N A 配列に関して得られるイントロン番号を使用することで、任意の J A G 1 アイソフォームにおける対応するイントロンの番号を判定することができる。当業者はさらに、本明細書で提供されるイントロン配列に基づき、または N M _ 0 0 0 2 1 4 . 2 における m R N A 配列に関して得られるイントロン番号を使用することで、本発明の方法を使用して標的化のための任意の J A G 1 アイソフォームにおける隣接するエクソンの配列を判定することができる。複数の実施形態では、本発明の組成物および方法が、任意の既知の J A G 1 アイソフォームの発現を増加させるために使用される。

20

【 0 0 3 9 】

30

J A G 1 タンパク質発現

上述されるように、A L G S における J A G 1 突然変異は全タンパク質に拡大し、かつ、およそ 6 0 % の高いデノボ突然変異率がある。特徴となる突然変異のうち、8 0 % はフレームシフト変異、ナンセンス変異、およびスプライス部位の変異を含み；全体の遺伝子欠失は、突然変異の 7 % を占め、かつ、ミスセンス変異は 1 2 % に相当する (L u e t a l . , 2 0 0 3) 。

40

【 0 0 4 0 】

40

複数の実施形態では、本明細書において記載される方法が、機能的 J A G 1 タンパク質の產生を増大させるために使用される。本明細書において使用されるように、「機能的」という用語は、例えばアラジール症候群または筋ジストロフィーなどの、処置される疾病的 1 つ以上の症状を除去するのに必要な J A G 1 タンパク質の活性または機能の量を指す。実施形態では、部分的機能的 J A G 1 タンパク質の產生を増大させるために、前記方法が使用される。本明細書において使用されるように、「部分的機能的」という用語は、疾患または疾病的 1 つ以上の症状を除去または予防するために必要な J A G 1 タンパク質の活性または機能の任意の量を指す。いくつかの実施形態では、部分的機能的タンパク質または R N A は、少なくとも 1 0 % 、少なくとも 2 0 % 、少なくとも 3 0 % 、少なくとも 4 0 % 、少なくとも 5 0 % 、少なくとも 6 0 % 、少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、または少なくとも 9 5 % の、完全な機能的タンパク質または R N A に比してより小さな活性を持つだろう。

【 0 0 4 1 】

50

複数の実施形態では、該方法は、JAG1-タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体を有する被験体の細胞によって、JAG1-タンパク質の発現を増大させる方法であり、ここで、被験体は、JAG1タンパク質の活性量の不足に起因するアラジール症候群を有し、そのJAG1タンパク質の量の不足は、JAG1-タンパク質のハプロ不全によって引き起こされる。そのような実施形態では、被験体は、機能的JAG1タンパク質をコードする第1の対立遺伝子と、JAG1タンパク質を産生しない第2の対立遺伝子とを有する。別のそのような実施形態では、被験体は、機能的JAG1タンパク質をコードする第1の対立遺伝子と、非機能的JAG1タンパク質をコードする第2の対立遺伝子とを有する。別のそのような実施形態では、被験体は、機能的JAG1タンパク質をコードする第1の対立遺伝子と、部分的機能的JAG1タンパク質をコードする第2の対立遺伝子とを有する。これらの実施形態のいずれの場合でも、アンチセンスオリゴマーは、第1の対立遺伝子（機能的JAG1タンパク質をコードする）から転写されたRIC mRNA前駆体の標的部位に結合し、それによって、RIC mRNA前駆体からの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘導し、かつ、機能的JAG1タンパク質をコードする成熟mRNA量の増加と、被験体の細胞中のJAG1タンパク質発現の増大をもたらす。

【0042】

実施形態では、被験体は、機能的JAG1タンパク質をコードする第1の対立遺伝子と、部分的機能的JAG1タンパク質をコードする第2の対立遺伝子を有し、第1の対立遺伝子（機能的JAG1タンパク質をコードする）から転写されたRIC mRNA前駆体の標的部位、あるいは第2の対立遺伝子（部分的機能的JAG1タンパク質をコードする）から転写されたRIC mRNA前駆体の標的部位に、アンチセンスオリゴマーが結合し、それによって、RIC mRNA前駆体からの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘導し、JAG1タンパク質をコードする成熟mRNAレベルの増加と、被験体の細胞中の機能的あるいは部分的機能的JAG1タンパク質発現の増加をもたらす。

【0043】

関連する実施形態では、該方法は、タンパク質または機能的RNAの発現を増加するためにASOを用いる方法である。実施形態では、ASOは、JAG1タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体を有する被験体の細胞中のJAG1タンパク質発現を増加させるために使用され、該被験体は、JAG1タンパク質の量または機能の不足、例えばアラジール症候群を有する。

【0044】

実施形態では、疾患または疾病の原因となる、タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体の転写産物は、本明細書に記載されるASOによって標的化される。いくつかの実施形態では、疾患の原因ではない、タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体の転写産物は、ASOによって標的化される。例えば、特定の経路における第1のタンパク質の突然変異または不足の結果として生じる疾患は、第2のタンパク質をコードするRIC mRNA前駆体を標的とすることによって改善され得、それによって第2のタンパク質産生は増加する。いくつかの実施形態では、第2のタンパク質の活性は、第1のタンパク質の突然変異または不足（それは疾患または疾病の原因である）を補うことができる。実施形態では、第1のタンパク質は筋ジストロフィーにおいて不足しているタンパク質であり、第2のタンパク質はJAG1である。実施形態では、第1のタンパク質はジストロフィンであり、第2のタンパク質はJAG1である。

【0045】

実施形態では、被験体は、

【0046】

a.

i) JAG1タンパク質が、野生型対立遺伝子からの産生と比較して、減少したレベルで産生され、

ii) JAG1タンパク質が、同等の野生型タンパク質と比較して機能が低下した形態で産生され、あるいは

10

20

30

40

50

i i i) J A G 1 タンパク質あるいは機能的 R N A が產生されない、第 1 の変異対立遺伝子；および

b .

i) J A G 1 タンパク質が、野生型対立遺伝子からの產生と比較して、減少したレベルで產生され、

i i) J A G 1 タンパク質が、同等の野生型タンパク質と比較して機能が低下した形態で產生され、あるいは

i i i) J A G 1 タンパク質が產生されない、第 2 の変異対立遺伝子、を有し、

ここで、R I C m R N A 前駆体は、第 1 の対立遺伝子および / または第 2 の対立遺伝子から転写される。これらの実施形態では、A S O は、第 1 の対立遺伝子または第 2 の対立遺伝子から転写されたR I C m R N A 前駆体の標的部分に結合することで、R I C m R N A 前駆体からの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘発し、J A G 1 タンパク質をコードするm R N A レベルの増加と、被験体の細胞中の標的タンパク質または機能的 R N A の発現の増加を引き起こす。これらの実施形態では、R I C m R N A 前駆体からの保持されたイントロンの構成的スプライシングの結果として生じる、発現レベルの増加を有する標的タンパク質あるいは機能的 R N A は、同等の野性型タンパク質と比較して機能性の低い形態（部分的機能的）、あるいは同等の野性型タンパク質と比較して完全な機能性を有する形態（完全機能的）、のいずれかであり得る。

10

【 0 0 4 7 】

実施形態では、J A G 1 タンパク質をコードするm R N A のレベルは、例えば、アンチセンスオリゴマーで処置されない、あるいはJ A G 1 R I C m R N A 前駆体の標的部分と結合しないアンチセンスオリゴマーで処置された、対照細胞内で產生されたJ A G 1 をコードするm R N A の量と比較した場合、1 . 1 から 1 0 倍に増加する。

20

【 0 0 4 8 】

実施形態では、J A G 1 タンパク質の量あるいは活性の不足に起因する疾病は、A S O が標的とされる保持されたイントロンの選択的スプライシングあるいは異常スプライシングに起因する疾病ではない。実施形態では、J A G 1 タンパク質の量あるいは活性の不足に起因する疾病は、J A G 1 タンパク質をコードするR I C m R N A 前駆体内の保持されたイントロンの選択的スプライシングあるいは異常スプライシングに起因する疾病ではない。実施形態では、選択的スプライシングあるいは異常スプライシングが、遺伝子から転写されたm R N A 前駆体に生じうる。しかしながら、本発明の組成物および方法は、この選択的スプライシングあるいは異常スプライシングを予防しないし、修正しない。

30

【 0 0 4 9 】

実施形態では、本発明の方法を使用して処置された被験体は、1 つの対立遺伝子から部分的機能的 J A G 1 タンパク質を発現し、該部分的機能的 J A G 1 タンパク質は、フレームシフト変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異、あるいは部分的な遺伝子欠失に起因する。実施形態では、本発明の方法を使用して処置された被験体は、1 つの対立遺伝子から非機能的 J A G 1 タンパク質を発現し、該非機能的 J A G 1 タンパク質は、1 つの対立遺伝子におけるフレームシフト変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異、あるいは部分的な遺伝子欠失に起因する。実施形態では、本発明の方法を使用して処置された被験体は、1 つの対立遺伝子に J A G 1 全遺伝子欠失を有する。

40

【 0 0 5 0 】

実施形態では、被験体は、G 2 7 4 D、L 3 7 S、R 1 8 4 H、P 1 6 3 L、P 8 7 1 R、C 2 3 4 Y、C 6 6 4 S、P 8 1 0 L、またはR 9 3 7 Q から選択されたJ A G 1 ミスセンス変異を有する。実施形態では、被験体はJ A G 1 欠失突然変異 1 4 8 5 - 1 4 8 6 d e l C T を有する。実施形態では、被験体はJ A G 1 重複突然変異 4 1 4 - 4 1 5 d u p G T を有する。実施形態では、当技術分野において既知の、および、例えば先に参照したL u , e t a l . , 2 0 0 3 , P e n t o n , e t a l . , 2 0 1 2 の文献に記載された任意のJ A G 1 突然変異を有する被験体が、本発明の方法および組成物を用いて処置される。

50

【0051】

JAG1タンパク質発現を増加させるためのTANGOの使用

前述したように、実施形態では、核内遺伝子出力の標的とされた増強(TANGO)は、JAG1タンパク質の発現を増加させるために、本発明の方法において使用される。これらの実施形態では、JAG1タンパク質をコードする保持されたイントロン含有mRNA前駆体(RIC mRNA前駆体)は、細胞の核内にある。PC-2タンパク質をコードする、保持されたイントロン、5'スプライス部位に隣接するエクソン、および3'スプライス部位に隣接するエクソンを含むJAG1 RIC mRNA前駆体を有する細胞を、RIC mRNA前駆体の標的部位に対して相補的なアンチセンスオリゴマー(ASO)と接触させる。RIC mRNA前駆体の標的部位へのASOのハイブリダイゼーションは、保持されたイントロンのスプライス部位(5'スプライス部位あるいは3'スプライス部位)のスプライシングを増強し、その後の標的タンパク質産生を増加させる。

10

【0052】

用語「mRNA前駆体」および「mRNA前駆体の転写産物」は、交換可能に使用され、少なくとも1つのイントロンを含むmRNA前駆体種を指すこともある。実施形態では、mRNA前駆体またはmRNA前駆体の転写産物は、5' - 7 - メチルグアノシンキップ、および/またはポリA末端を含む。実施形態では、mRNA前駆体またはmRNA前駆体の転写産物は、5' - 7 - メチルグアノシンキップおよびポリA末端の両方を含む。いくつかの実施形態では、mRNA前駆体の転写産物は、5' - 7 - メチルグアノシンキップ、および/またはポリA末端を含まない。タンパク質に翻訳されない場合(あるいは核から細胞質へと輸送された場合)、mRNA前駆体の転写産物は非生産的メッセージRNA(mRNA)分子である。

20

【0053】

本明細書において使用されるように、「保持されたイントロン含有mRNA前駆体」(「RIC mRNA前駆体」)は、少なくとも1つの保持されたイントロンを含むmRNA前駆体の転写産物である。RIC mRNA前駆体は、保持されたイントロン、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接するエクソン、保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接するエクソンを含み、標的タンパク質をコードする。「標的タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体」は、完全にスプライシングされた場合に、標的タンパク質をコードすると解される。「保持されたイントロン」は、同じ遺伝子によってコードされた、隣接するイントロン等の1つ以上の他のイントロンが、同じmRNA前駆体の転写産物からスプライシングアウトされた場合に、mRNA前駆体の転写産物に存在するイントロンである。いくつかの実施形態では、保持されたイントロンは、標的タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体において最も豊富なイントロンである。実施形態では、保持されたイントロンは、細胞内の標的タンパク質をコードする遺伝子から転写されたRIC mRNA前駆体の集団において最も豊富なイントロンであり、該RIC

30

mRNA前駆体の集団は2つ以上の保持されたイントロンを含む。実施形態では、標的タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体の集団において最も豊富なイントロンに標的とされたアンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴマーが標的とされた、あるいは結合する保持されたイントロンを含む集団内の、2つ以上の保持されたイントロンのスプライシングアウトを誘発する。実施形態では、標的タンパク質をコードする成熟mRNAは、それによって産生される。「成熟mRNA」および「完全にスプライシングされたmRNA」の用語は、標的タンパク質をコードする完全に処理されたmRNA(例えば、核から細胞質へと輸送され、標的タンパク質に翻訳されたmRNA)、あるいは完全に処理された機能的RNAを記載するように、本明細書において交換可能に使用される。用語「生産的mRNA」もまた、標的タンパク質をコードする完全に処理されたmRNAについて記載するように使用することができる。実施形態では、標的領域は、JAG1タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体の集団において最も豊富なイントロンである保持されたイントロンにある。実施形態では、JAG1タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体の集団において最も保持されたイントロンは、イントロン23である。

40

50

【0054】

実施形態では、保持されたイントロンは、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、あるいは少なくとも約50%の、保定の保持率に基づき、保持されたイントロンとして特定されたイントロンである。実施形態では、保持されたイントロンは、約5%から約100%、約5%から約95%、約5%から約90%、約5%から約85%、約5%から約80%、約5%から約75%、約5%から約70%、約5%から約65%、約5%から約60%、約5%から約65%、約5%から約60%、約5%から約55%、約5%から約50%、約5%から約45%、約5%から約40%、約5%から約35%、約5%から約30%、約5%から約25%、約5%から約20%、約5%から約15%、約10%から約100%、約10%から約95%、約10%から約90%、約10%から約85%、約10%から約80%、約10%から約75%、約10%から約70%、約10%から約65%、約10%から約60%、約10%から約55%、約10%から約50%、約10%から約45%、約10%から約40%、約10%から約35%、約10%から約30%、約10%から約25%、約10%から約20%、約10%から約15%、約10%から約10%、約10%から約95%、約10%から約90%、約10%から約85%、約10%から約80%、約10%から約75%、約10%から約70%、約10%から約65%、約10%から約60%、約10%から約55%、約10%から約50%、約10%から約45%、約10%から約40%、あるいは約25%から約35%の、保定の保持率に基づき、保持されたイントロンとして特定されたイントロンである。保持されたイントロンを特定する手助けとして、ENCODEデータ（例えば、Tilgner, et al., 2012, 「Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs」 Genome Research 22(9): 1616-25に記載）を用いることができる。
10
20
30
30

【0055】

本明細書において使用されるように、用語「含む（comprise）」、あるいは「含む（comprises）」または「含む（comprising）」等の変化形は、列挙された特徴（例えば、アンチセンスオリゴマーの場合、定義された核酸塩基配列）を含むが、他のいかなる特徴をも除外しないことを示すと解されるべきである。したがって、本明細書において使用されるように、用語「含む（comprising）」は包含的で、追加の列挙されていない特徴（例えば、アンチセンスオリゴマーの場合、追加の列挙されていない核酸塩基の存在）を除外しない。
40

【0056】

本明細書において提供される組成物および方法のいずれかの実施形態において、「含む（comprising）」は「から本質的に成る（consisting essentially）」または「から成る（consisting of）」と置換可能である
50

。 「から本質的に成る (consisting essentially) 」という句は、特定された特徴 (例えば核酸塩基配列) と共に、請求される本発明の性質または機能に実質的に影響しない特徴も必要とするために本明細書で使用される。本明細書で使用されるように、用語「成る (consisting) 」は、列挙された特徴 (例えば核酸塩基配列) 単独の存在を示すために使用される (その結果、特定された核酸塩基配列から成るアンチセンスオリゴマーの場合には、追加の列挙されていない核酸塩基の存在は除外される)。

【0057】

実施形態では、標的領域は、JAG1タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体の集団において2番目に豊富に存在するイントロンである保持されたイントロンにある。例えば、2番目に豊富な保持されたイントロンは、最も豊富な保持されたイントロンよりもむしろ標的とされ得る。その要因は、2番目に豊富な保持されたイントロンのヌクレオチド配列の独自性、特定のヌクレオチド配列を標的とするASO設計の容易さ、および/またはASOによりイントロンを標的とすることから生じるタンパク質産生量の増加である。実施形態では、保持されたイントロンは、細胞内の標的タンパク質をコードする遺伝子から転写されたRIC mRNA前駆体集団において2番目に豊富なイントロンであり、そのRIC mRNA前駆体集団は、2つ以上の保持されたイントロンを含む。実施形態では、標的タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体集団における2番目に豊富なイントロンを標的とするアンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴマーが標的とする、または結合する保持されたイントロンを含む集団において、2つ以上の保持されたイントロンのスプライシングアウトを誘発する。それによって、実施形態では、標的タンパク質をコードする完全にスプライシングされた (成熟) RNAが産生される。実施形態では、JAG1タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体集団に2番目に豊富に保持されたイントロンは、イントロン18である。実施形態では、JAG1タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体集団に2番目に豊富に保持されたイントロンは、イントロン13である。

【0058】

実施形態では、ASOは、RIC mRNA前駆体の保持されていないイントロン内にある標的領域に相補的である。実施形態では、RIC mRNA前駆体の標的部分は：保持されていないイントロンの5'スプライス部位に対する+6から+100の領域；または保持されていないイントロンの3'スプライス部位に対する-16から-100の領域内にある。実施形態では、RIC mRNA前駆体の標的部位は、保持されていないイントロンの5'スプライス部位に対する+100の領域から、保持されていないイントロンの3'スプライス部位に対する-100の領域内にある。領域または配列の場所を特定するために使用されるように、「内 (within)」は、列挙される位置で残基を含むように理解される。例えば、+6から+100の領域は、+6および+100の位置で残基を含む。それによって、実施形態では、標的タンパク質をコードする完全にスプライシングされた (成熟) RNAが産生される。

【0059】

実施形態では、RIC mRNA前駆体の保持されたイントロンは、非効率的にスプライシングされたイントロンである。本明細書で使用されるように、「非効率的にスプライシングされた」は、RIC mRNA前駆体における別のスプライス部位でのスプライシングの頻度と比較して、保持されたイントロンに隣接するスプライス部位 (5'スプライス部位または3'スプライス部位) でのスプライシングの頻度が比較的低いことを指し得る。用語「非効率的にスプライシングされた」はまた、スプライス部位でのスプライシングの相対速度または動態 (kinetics) を指し得る。この「非効率的にスプライシングされた」イントロンは、RIC mRNA前駆体における別のイントロンと比較して、より遅い速度でスプライシングあるいは除去され得る。

【0060】

実施形態では、5'スプライス部位に隣接するエクソンの-3eから-1e、および保

10

20

30

40

50

持されたイントロンの + 1 から + 6 の 9 - ヌクレオチド配列は、対応する野生型配列と同一である。実施形態では、保持されたイントロンの - 1 5 から - 1 および 3 ' スプライス部位に隣接するエクソンの + 1 e の 1 6 ヌクレオチド配列は、対応する野生型配列と同一である。本明細書に使用されるように、「野生型配列」は、生体および科学の情報の N C B I リポジトリ (National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD USA 20894 によって運営される) に寄託された公開された参照ゲノムにおける J A G 1 遺伝子に対するヌクレオチド配列を指す。本明細書で使用されるように、「野生型配列」は、N C B I Gene ID 182 で得られる標準配列を指す。さらに本明細書で使用されるように、「e」で示されたヌクレオチド位置は、ヌクレオチドがエクソン (例えば、5 ' スプライス部位に隣接するエクソン、または 3 ' スプライス部位に隣接するエクソン) の配列中に存在することを示す。

【 0 0 6 1 】

該方法は、細胞を、J A G 1 タンパク質をコードする m R N A 前駆体の一部に相補的である A S O と接触させる工程であって、結果として J A G 1 の発現が増加する工程を含む。本明細書で使用されるように、細胞に「接触させる」または投与することは、A S O と細胞が相互作用するように、A S O を細胞に即座に近接させる方法を指す。A S O と接触させられる細胞は、A S O を細胞へと取り込む又は輸送する。該方法は、疾患または疾患に関係する又は疾患または疾患に関連する細胞を、本明細書に記載される A S O のいずれかと接触させる工程を含む。いくつかの実施形態では、A S O は、A S O を細胞型に対して標的とする、A S O と疾患または疾患に関係する又は疾患または疾患に関連する細胞との間の接触を増強する、または A S O の取り込みを増強するために、さらに修飾され得るかまたは別の分子に結合され得る (例えば、共有結合される)。

【 0 0 6 2 】

本明細書で使用されるように、用語「タンパク質産生を増加させる」または「標的タンパク質の発現を増加させる」は、細胞中の m R N A から翻訳されるタンパク質の量を増加させることを意味する。「標的タンパク質」は、発現 / 産生の増加が望まれるタンパク質で有り得る。

【 0 0 6 3 】

実施形態では、J A G 1 R I C m R N A 前駆体を発現する細胞を J A G 1 R I C m R N A 前駆体の転写産物の標的部分に相補的である A S O に接触させる工程は、結果として、m R N A 前駆体によってコードされた J A G 1 タンパク質 (例えば標的タンパク質) の量の測定可能な増加をもたらす。タンパク質の産生を測定または検出する方法は、当業者に明白となり、あらゆる既知の方法、例えば、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡検査法、および E L I S A を含む。

【 0 0 6 4 】

実施形態では、細胞を J A G 1 R I C m R N A 前駆体の転写産物の標的部分に相補的である A S O と接触させる工程は、結果として、A S O の欠如 / 処置の欠如における細胞によって産生されたタンパク質の量と比較して、少なくとも 1 0 、 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 8 0 、 1 0 0 、 1 5 0 、 2 0 0 、 2 5 0 、 3 0 0 、 3 5 0 、 4 0 0 、 4 5 0 、 5 0 0 、または 1 0 0 0 % の、産生された J A G 1 タンパク質の量の増加をもたらす。実施形態では、アンチセンスオリゴマーが接触させられた細胞によって産生された J A G 1 タンパク質の合計量は、対照化合物によって産生された標的タンパク質の量と比較して、約 1 . 1 倍から約 1 0 倍、約 1 . 5 倍から約 1 0 倍、約 2 倍から約 1 0 倍、約 3 倍から約 1 0 倍、約 4 倍から約 1 0 倍、約 1 . 1 倍から約 5 倍、約 1 . 1 倍から約 6 倍、約 1 . 1 倍から約 7 倍、約 1 . 1 倍から約 8 倍、約 1 . 1 倍から約 9 倍、約 2 倍から約 5 倍、約 2 倍から約 6 倍、約 2 倍から約 7 倍、約 2 倍から約 8 倍、約 2 倍から約 9 倍、約 3 倍から約 6 倍、約 3 倍から約 7 倍、約 3 倍から約 8 倍、約 3 倍から約 9 倍、約 4 倍から約 7 倍、約 4 倍から約 8 倍、約 4 倍から約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、

10

20

30

40

50

少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍に増加する。対照化合物は、例えば、R I C m R N A 前駆体の標的部分に相補的でないオリゴヌクレオチドで有り得る。

【0065】

幾つかの実施形態では、細胞をJ A G 1 R I C m R N A 前駆体の転写産物の標的部分に相補的であるA S Oと接触させる工程は、結果として、標的タンパク質をコードする成熟m R N Aを含む、J A G 1をコードするm R N A量の増加をもたらす。幾つかの実施形態では、J A G 1タンパク質をコードするm R N A、またはJ A G 1タンパク質をコードする成熟m R N Aの量は、A S Oの欠如/処置の欠如下における細胞によって產生されたタンパク質の量と比較して、少なくとも10、20、30、40、50、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、500、または1000%増加する。実施形態では、アンチセンスオリゴマーが接触させられた細胞において產生されたJ A G 1タンパク質をコードするm R N A、またはJ A G 1タンパク質をコードする成熟m R N Aの合計量は、処置されていない細胞、例えば処置されていない細胞あるいは対照化合物で処置された細胞内で產生された成熟R N Aの量と比較して、約1.1倍から約10倍、約1.5倍から約10倍、約2倍から約10倍、約3倍から約10倍、約4倍から約10倍、約1.1倍から約5倍、約1.1倍から約6倍、約1.1倍から約7倍、約1.1倍から約8倍、約1.1倍から約9倍、約2倍から約5倍、約2倍から約6倍、約2倍から約7倍、約2倍から約8倍、約2倍から約9倍、約3倍から約6倍、約3倍から約7倍、約3倍から約8倍、約3倍から約9倍、約4倍から約7倍、約4倍から約8倍、約4倍から約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、あるいは少なくとも約10倍に増加する。対照化合物は、例えば、J A G 1 R I C m R N A 前駆体の標的部分に相補的でないオリゴヌクレオチドで有り得る。

10

20

30

【0066】

R I C m R N A 前駆体からの保持されたイントロンの構成的スプライシング

本明細書で提供される方法およびアンチセンスオリゴヌクレオチド組成物は、J A G 1タンパク質をコードするm R N A、またはJ A G 1タンパク質をコードする成熟m R N Aのレベルを増加させることによって、例えば、J A G 1タンパク質の量または活性の不足がもたらすアラジール症候群を有する被験体において細胞内のJ A G 1タンパク質の発現を増加させることに有用である。特に、本明細書に記載されるような方法および組成物は、J A G 1タンパク質をコードするJ A G 1 R I C m R N A 前駆体の転写産物からの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘発し、それによって、J A G 1タンパク質をコードするm R N A、またはJ A G 1タンパク質をコードする成熟m R N Aのレベルが増加し、J A G 1タンパク質の発現が増加する。

40

【0067】

R I C m R N A 前駆体からの保持されたイントロンの構成的スプライシングは、保持されたイントロンをR I C m R N A 前駆体から正しく除去し、ここで保持されたイントロンは、野生型スプライス配列を有する。構成的スプライシングは、本明細書で使用されるように、遺伝子または対立遺伝子から転写されたm R N A 前駆体の選択的スプライシングまたは異常スプライシングを引き起こす突然変異を有する遺伝子または対立遺伝子から転写されたR I C m R N A 前駆体からの保持されたイントロンのスプライシングを包含しない。例えば、本明細書で提供される方法およびアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して誘発された、保持されたイントロンの構成的スプライシングは、m R N A 前駆体における異常スプライシングを訂正しない、またはm R N A 前駆体の選択的スプライシングに影響せず、結果的に標的タンパク質または機能的R N Aの発現が増加する。

50

【0068】

実施形態では、構成的スプライシングは、保持されたイントロンをJ A G 1 R I C

50

mRNA前駆体から正しく除去し、ここでJAG1 RIC mRNA前駆体は、野生型の遺伝子または対立遺伝子、あるいは多形性の遺伝子または対立遺伝子から転写され、完全に機能的な標的タンパク質または機能的RNAをコードし、遺伝子または対立遺伝子は、保持されたイントロンの選択的スプライシングまたは異常スプライシングを引き起こす突然変異を有さない。

【0069】

幾つかの実施形態では、JAG1タンパク質をコードするJAG1 RIC mRNA前駆体からの保持されたイントロンの構成的スプライシングは、JAG1タンパク質をコードするJAG1 RIC mRNA前駆体から、保持されたイントロンを正しく除去し、ここでJAG1 RIC mRNA前駆体は、野生型対立遺伝子からの産生と比較して減少したレベルで標的遺伝子あるいは機能的RNAを産生する遺伝子または対立遺伝子から転写され、および遺伝子または対立遺伝子は、保持されたイントロンの選択的スプライシングまたは異常スプライシングを引き起こす突然変異を有さない。これらの実施形態では、構成的にスプライシングされた保持されたイントロンの正しい除去は、結果として、同等の野生型タンパク質または機能的RNAと比較したときに機能的である標的タンパク質または機能的RNAの産生をもたらす。

10

【0070】

他の実施形態では、構成的スプライシングは、保持されたイントロンをJAG1 RIC mRNA前駆体から正しく除去し、ここでJAG1 RIC mRNA前駆体は、同等の野生型タンパク質または機能的RNAと比較して、機能の低下した形態で産生された標的タンパク質または機能的RNAをコードする遺伝子または対立遺伝子から転写され、遺伝子または対立遺伝子は、保持されたイントロンの選択的スプライシングまたは異常スプライシングを引き起こす突然変異を有さない。これらの実施形態では、構成的にスプライシングされた保持されたイントロンの正しい除去は、結果として、部分的に機能的な標的タンパク質、または同等の野生型タンパク質または機能的RNAと比較したときに部分的に機能的である機能的RNAの産生をもたらす。

20

【0071】

構成的スプライシングによる保持されたイントロンの「正しい除去」は、エクソンのいかなる部分も除去することのない、全イントロンの除去を指す。

【0072】

実施形態では、本明細書に記載されるような、または本明細書に記載される方法に使用されるアンチセンスオリゴマーは、JAG1遺伝子から転写されたmRNA前駆体の選択的スプライシングまたは異常スプライシングを調節することによって、JAG1タンパク質をコードするmRNAの量、またはJAG1タンパク質の量を増加させない。選択的スプライシングまたは異常スプライシングの調節は、RNA種の配列および長さを解析する既知の方法を使用して、例えばRT-PCRによって、および本明細書および文献中で別記される方法を使用して測定することができる。実施形態では、選択的スプライシングまたは異常スプライシングの調節は、対象となるスプライシングされた種の量の、少なくとも10%または1.1倍の増加または減少に基づいて判定される。実施形態では、調節は、本発明の方法においてJAG1タンパク質をコードするmRNAの増加の判定に関して本明細書に記載されるように、少なくとも10%から100%または1.1倍から10倍のレベルでの増加または減少に基づいて判定される。

30

【0073】

実施形態では、該方法は、JAG1 RIC mRNA前駆体が、野生型JAG1 mRNA前駆体の部分的スプライシングによって生成された方法である。実施形態では、該方法は、JAG1 RIC mRNA前駆体が、全長の野生型JAG1 mRNA前駆体の部分的スプライシングによって生成された方法である。実施形態では、JAG1 RIC mRNA前駆体は、全長のJAG1 mRNA前駆体の部分的スプライシングによって生成された。これらの実施形態では、全長のJAG1 mRNA前駆体は、野生型スプライス部位配列を有する保持されたイントロンのスプライシングと比較して、保持された

40

50

イントロンの正しいスプライシングを損なわない保持されたイントロンのスプライス部位に多型を有し得る。

【0074】

実施形態では、JAG1タンパク質をコードするmRNAは、全長の成熟mRNAまたは野生型成熟mRNAである。これらの実施形態では、全長の成熟mRNAは、野生型成熟mRNAによってコードされたJAG1タンパク質の活性と比較して、成熟mRNAによってコードされた標的タンパク質または機能的RNAの活性に影響しない多型を有し得る。

【0075】

<アンチセンスオリゴマー>

本開示の一態様は、JAG1 RIC mRNA前駆体の標的部分に結合することによってスプライシングを増強するアンチセンスオリゴマーを含む組成物である。本明細書で使用されるように、用語「ASO」および「アンチセンスオリゴマー」は、交換可能に使用され、ワトソン・クリック塩基対またはゆらぎ塩基対(G-U)によって標的核酸(例えば、JAG1 RIC mRNA前駆体)配列にハイブリダイズする、核酸塩基を含む、ポリヌクレオチドなどのオリゴマーを指す。ASOは、標的配列に相補的な又はほぼ相補的(例えば、標的配列に結合し、スプライス部位でスプライシングを増強させるのに十分な相補性)である正確な配列を有し得る。ASOは、標的核酸(例えば、mRNA前駆体の転写産物の標的部分)に結合し(ハイブリダイズし)、生理学的条件下でハイブリダイズされたままであるように設計されている。典型的に、ASOは、意図した(標的とされた)核酸配列以外の部位にハイブリダイズする場合、標的核酸でない限られた数の配列に(標的核酸以外の少数の部位に)ハイブリダイズする。ASOの設計は、mRNA前駆体の転写産物の標的部分の核酸配列、或いはゲノムまたは細胞のmRNA前駆体またはトランスクリプトームにおける他の場所での十分に類似した核酸配列の発生を考慮に入れることが可能である。その結果、ASOが他の部位に結合し「オフターゲット」効果を引き起こす可能性は限定される。例えば、発明の名称「Reducing Nonsense-Mediated mRNA Decay」のWO2015/035091として公開されたPCT国際出願番号PCT/US2014/054151におけるものなどの、当業者に既知のアンチセンスオリゴマーは、本明細書に記載される方法を実施するために使用され得る。

【0076】

幾つかの実施形態では、ASOは、標的核酸またはRIC mRNA前駆体の標的部分に「特異的にハイブリダイズする」または「特異的である」。典型的に、そのようなハイブリダイゼーションは、37より実質的に高い融解温度(Tm)で、好ましくは少なくとも50で、および典型的に60からおよそ90の間で生じる。そのようなハイブリダイゼーションは、好ましくは、厳しいハイブリダイゼーション条件に対応している。与えられたイオン強度およびpHで、Tmは、標的配列の50%が相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする温度である。

【0077】

オリゴヌクレオチドなどのオリゴマーは、ハイブリダイゼーションが2つの一本鎖ポリヌクレオチド間の逆平行構成で生じるときに、互いに「相補的」である。二本鎖ポリヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションが第1のポリヌクレオチドの鎖の1つと第2のポリヌクレオチドの鎖の1つの間に生じる場合に、別のポリヌクレオチドに「相補的」であり得る。相補性(1つのポリヌクレオチドが別のポリヌクレオチドと相補的である程度)は、一般に容認された塩基対合則に従って、互いに水素結合を形成すると予期される対向する鎖における塩基の割合(例えばパーセンテージ)の点から数量化できる。アンチセンスオリゴマー(ASO)の配列は、ハイブリダイズするその標的核酸の配列に100%相補的である必要はない。特定の実施形態では、ASOは、標的とされる標的核酸配列内の標的部位に対する、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%

10

20

30

40

50

、少なくとも 98%、または少なくとも 99% の配列相補性を含むことができる。例えば、オリゴマー化合物の 20 の核酸塩基のうちの 18 が標的部位に相補的であり、それ故、特異的にハイブリダイズする ASO は、90 パーセントの相補性を表わす。この例において、残りの相補的でない核酸塩基は、ともにクラスター化され得るか、または相補的な核酸塩基と分散され (interspersed)、互いに又は相補的な核酸塩基に隣接している必要はない。ASO の標的核酸の領域とのパーセント相補性は、BLAST プログラム (基礎的なローカルアライメント検索ツール) および当該技術分野で既知の PowerBLAST プログラム (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656) を慣例的に使用して判定され得る。 10

【0078】

ASO は、標的配列におけるすべての核酸塩基にハイブリダイズする必要はなく、それがハイブリダイズする核酸塩基は、隣接しているか又は隣接していないかも知れない。ASO は、mRNA 前駆体の転写産物の 1 つ以上のセグメントにわたってハイブリダイズし得、その結果、介在する又は隣接するセグメントは、ハイブリダイゼーション事象に関係しない (例えば、ループ構造またはヘアピン構造が形成され得る)。特定の実施形態では、ASO は、標的 mRNA 前駆体の転写産物において隣接していない核酸塩基にハイブリダイズする。例えば、ASO は、ASO がハイブリダイズしない 1 つ以上の核酸塩基によって分離される、mRNA 前駆体の転写産物における核酸塩基にハイブリダイズすることができる。 20

【0079】

本明細書に記載される ASO は、RIC mRNA 前駆体の標的部位に存在する核酸塩基に相補的である核酸塩基を含む。用語「ASO」は、オリゴヌクレオチド、および標的 mRNA 上の相補的な核酸塩基にハイブリダイズすることができる核酸塩基を含むが、ペプチド核酸 (PNA) などの糖部を含まない、他のオリゴマー分子を具体化する。ASO は、自然発生のヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、修飾されたヌクレオチド、またはそれらの 2 つ又は 3 つの任意の組み合わせを含み得る。用語「自然発生のヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む。用語「修飾されたヌクレオチド」は、修飾された又は置換された糖類及び / 又は修飾された骨格を有するヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、ASO のヌクレオチドのすべてが、修飾されたヌクレオチドである。本明細書に記載される方法および組成物と適合性のある ASO の化学修飾および ASO の成分は、当業者に明白であり、例えば、米国特許第 8,258,109 号 B2、米国特許第 5,656,612 号、米国特許公開番号 2012/0190728、および Dias and Stein, Mol. Cancer Ther. 2002, 347-355 で見られ得、それら全体が引用によって本明細書に組み込まれる。 30

【0080】

ASO の核酸塩基は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルなどの自然発生の未修飾の核酸塩基、または標的 mRNA 前駆体上に存在する核酸塩基との水素結合が可能であるように未修飾の核酸塩基に十分に類似している合成または修飾された核酸塩基であり得る。修飾された核酸塩基の例としては、限定されないが、ヒポキサンチン、キサンチン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、および 5-ヒドロキシメチルシトシンが挙げられる。 40

【0081】

本明細書に記載される ASO はまた、オリゴマーの成分に結合する骨格構造を含む。用語「骨格構造」および「オリゴマー結合」は、交換可能に使用され、ASO の単量体間の結合を指し得る。自然発生のオリゴヌクレオチドでは、骨格は、オリゴマーの糖部を結合する 3' - 5' ホスホジエステル結合を含む。本明細書に記載される ASO の骨格構造またはオリゴマー結合は、(限定されないが) ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホ

ラニラデート(phosphoranyl adate)、ホスホラミデート(phosphoramidate)などを含む。例えば、La Planche et al. , Nucleic Acids Res. 14:9081 (1986) ; Stec et al. , J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984) , Stein et al. , Nucleic Acids Res. 16:3209 (1988) , Zon et al. , Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991) ; Zon et al. , Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach , pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)) ; Stec et al. , 米国特許第5,151,510号; Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews 90:543 (1990) を参照。幾つかの実施形態では、ASOの骨格構造は、亜リン酸を含有していないが、例えば、ペプチド核酸(PNA)、またはカルバミン酸塩、アミド、および直鎖および環式の炭化水素基を含む連結基において、ペプチド結合を含有している。幾つかの実施形態では、骨格修飾は、ホスホロチオエート結合である。幾つかの実施形態では、骨格修飾は、ホスホラミデート結合である。

【0082】

実施形態では、ASO骨格のリンヌクレオチド間の結合の各々での立体化学は、ランダムである。実施形態では、ASO骨格のリンヌクレオチド間の結合の各々での立体化学は、制御され、ランダムではない。例えば、引用によって本明細書に組み込まれた米国特許公開番号2014/0194610、「Methods for the Synthesis of Functionalized Nucleic Acids」は、核酸オリゴマーにおいて各リン原子でキラリティーの対掌性(handedness)を独立して選択する方法について記載している。実施形態では、限定されないが、本明細書で表1に明記されるASOのいずれかを含む、本発明の方法に使用されるASOは、ランダムでないリンヌクレオチド間の結合を有するASOを含む。実施形態では、本発明の方法に使用される組成物は、純粋なジアステレオマーASOを含む。実施形態では、本発明の方法に使用される組成物は、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、約100%、約90%～約100%、約91%～約100%、約92%～約100%、約93%～約100%、約94%～約100%、約95%～約100%、約96%～約100%、約97%～約100%、約98%～約100%、または約99%～約100%のジアステレオマー純度を有するASOを含む。

【0083】

実施形態では、ASOは、そのリンヌクレオチド間の結合でRpおよびSpの構成のランダムでない混合物を有している。例えば、RpとSpの混合物が、アンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、優れた活性とヌクレアーゼ安定性との間のバランスを達成する必要があることが示唆されてきた(Wan, et al., 2014, 「Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages」, Nucleic Acids Research 42(22): 13456-13468、引用によって本明細書に組み込まれる)。実施形態では、限定されないが、本明細書で表1に明記されるASOのいずれかを含む、本発明の方法に使用されるASOは、約5-100%のRp、少なくとも約5%のRp、少なくとも約10%のRp、少なくとも約15%のRp、少なくとも約20%のRp、少なくとも約25%のRp、少なくとも約30%のRp、少なくとも約35%のRp、少なくとも約40%のRp、少なくとも約45%のRp、少なくとも約50%

の R p、少なくとも約 5 5 % の R p、少なくとも約 6 0 % の R p、少なくとも約 6 5 % の R p、少なくとも約 7 0 % の R p、少なくとも約 7 5 % の R p、少なくとも約 8 0 % の R p、少なくとも約 8 5 % の R p、少なくとも約 9 0 % の R p、または少なくとも約 9 5 % の R p と、残りの S p、或いは、約 1 0 0 % の R p を含む。実施形態では、限定されないが、本明細書で表 1 に明記される A S O のいずれかを含む、本発明の方法に使用される A S O は、約 1 0 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 1 5 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 2 0 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 2 5 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 3 0 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 3 5 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 4 0 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 4 5 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 5 0 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 5 5 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 6 0 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 6 5 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 7 0 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 7 5 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 8 0 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 8 5 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 9 0 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 9 5 % ~ 約 1 0 0 % の R p、約 2 0 % ~ 約 8 0 % の R p、約 2 5 % ~ 約 7 5 % の R p、約 3 0 % ~ 約 7 0 % の R p、約 4 0 % ~ 約 6 0 % の R p、または約 4 5 % ~ 約 5 5 % R p と、残りの S p を含む。

【 0 0 8 4 】

実施形態では、限定されないが、本明細書で表 1 に明記される A S O のいずれかを含む、本発明の方法に使用される A S O は、約 5 ~ 1 0 0 % の S p、少なくとも約 5 % の S p、少なくとも約 1 0 % の S p、少なくとも約 1 5 % の S p、少なくとも約 2 0 % の S p、少なくとも約 2 5 % の S p、少なくとも約 3 0 % の S p、少なくとも約 3 5 % の S p、少なくとも約 4 0 % の S p、少なくとも約 4 5 % の S p、少なくとも約 5 0 % の S p、少なくとも約 5 5 % の S p、少なくとも約 6 0 % の S p、少なくとも約 6 5 % の S p、少なくとも約 7 0 % の S p、少なくとも約 7 5 % の S p、少なくとも約 8 0 % の S p、少なくとも約 8 5 % の S p、少なくとも約 9 0 % の S p、または少なくとも約 9 5 % の S p と、残りの R p、あるいは約 1 0 0 % の S p を含む。実施形態では、限定されないが、本明細書で表 1 に明記される A S O のいずれかを含む、本発明の方法に使用される A S O は、約 1 0 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 1 5 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 2 0 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 2 5 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 3 0 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 3 5 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 4 0 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 4 5 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 5 0 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 5 5 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 6 0 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 6 5 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 7 0 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 7 5 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 8 0 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 8 5 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 9 0 % ~ 約 1 0 0 % の S p、または約 9 5 % ~ 約 1 0 0 % の S p、約 2 0 % ~ 約 8 0 % の S p、約 2 5 % ~ 約 7 5 % の S p、約 3 0 % ~ 約 7 0 % の S p、約 4 0 % ~ 約 6 0 % の S p、または約 4 5 % ~ 約 5 5 % S p と、残りの R p を含む。

【 0 0 8 5 】

本明細書に記載される A S O のいずれかは、自然発生のヌクレオチド中に存在するような、リボースまたはデオキシリボースを含む糖部、あるいはモルホリン環を含む、修飾された糖部または糖アナログを含有し得る。修飾された糖部の限定しない例は、2' - O - メチル (2' - O - M e)、2' - O - メトキシエチル (2' M O E)、2' - O - アミノエチル、2' F ; N 3' - > P 5' ホスホラミデート、2' ジメチルアミノオキシエトキシ、2' ジメチルアミノエトキシエトキシ、2' - グアニジニウム (g u a n i d i n i d i u m)、2' - O - グアニジニウムエチル、カルバミン酸塩修飾した糖、および二環式修飾した糖などの、2' 置換基が挙げられる。幾つかの実施形態では、糖部修飾は、2' - O - M e、2' F、および 2' M O E から選択される。幾つかの実施形態では、糖部修飾は、ロックド核酸 (L N A) におけるような追加の架橋結合である。幾つかの実施形態では、糖アナログは、ホスホジアミデートモルホリノ (P M O) などのモルホリン環を含有している。幾つかの実施形態では、糖部は、リボフラノシリルまたは 2' デオキシリボフラノシリルの修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、2' 4' 抑制された (c on s t r a i n e d) 2' O - メチルオキシエチル (c M O E) 修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、c E t 2'，4' 抑制された 2' - O エチル B N A 修飾を含む。

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態では、糖部は、トリシクロDNA(tcDNA)修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、エチレン核酸(ENA)修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、MCE修飾を含む。修飾は当該技術分野で既知であり、文献、例えば、Jarver, et al., 2014, 「A Chemical View of Oligonucleotides for Exon Skipping and Related Drug Applications」, Nucleic Acid Therapeutics 24(1): 37-47に記載され、これは、この目的のための引用によって本明細書に組み込まれる。

【0086】

幾つかの例では、ASOの各単量体は、同じ方法で修飾され、例えば、ASOの骨格の各結合はホスホロチオエート結合を含み、または各リボース糖部は2'-O-メチル修飾を含む。ASOの単量体成分の各々の上に存在する、そのような修飾は、「均一な修飾」と呼ばれる。幾つかの例では、異なる修飾の組み合わせが望まれ得、例えば、ASOは、ホスホロジアミデート結合とモルホリン環を含む糖部(モルホリノ)との組み合わせを含み得る。ASOへの異なる修飾の組み合わせは、「混合修飾」または「混合化学作用」と呼ばれる。

【0087】

幾つかの実施形態では、ASOは、1つ以上の骨格修飾を含む。幾つかの実施形態では、ASOは、1つ以上の糖部修飾を含む。幾つかの実施形態では、ASOは、1つ以上の骨格修飾および1つ以上の糖部修飾を含む。幾つかの実施形態では、ASOは、2'MOE修飾およびホスホロチオエート骨格を含む。幾つかの実施形態では、ASOは、ホスホロジアミデートモルホリノ(PMO)を含む。幾つかの実施形態では、ASOは、ペプチド核酸(PNA)を含む。本明細書に記載されるASOのいずれか又はASOの成分(例えば、核酸塩基、糖部、骨格)は、ASOの望ましい特性または活性を達成するために或いはASOの望ましくない特性または活性を減少させるために修飾されてもよい。例えば、ASOまたはASOの1つ以上の成分は、mRNA前駆体の転写産物上の標的配列への結合親和性を増強する; 非標的配列への結合を減少させる; 細胞のヌクレアーゼ(つまり、RNase H)による分解を減少させる; 細胞及び/又は細胞の核へのASOの取り込みを改善する; ASOの薬物動態(pharmacokinetics)または薬力(pharmacodynamics)を変更する; およびASOの半減期を調節するために修飾され得る。

【0088】

幾つかの実施形態では、ASOは、2'-O-(2-メトキシエチル)(MOE)ホスホロチオエート修飾されたヌクレオチドで構成される。そのようなヌクレオチドで構成されたASOは、特に、本明細書で開示される方法によく適しており、そのような修飾を有しているオリゴマーは、ヌクレアーゼ分解に対する著しく増強された耐性および増加したバイオアベイラビリティを有すると示されており、これによって、例えば、本明細書に記載される幾つかの実施形態における経口送達に適するようになる。例えば、Gearhardt et al., J Pharmacol Exp Ther. 2001; 296(3): 890-7; Gearhardt et al., J Pharmacol Exp Ther. 2001; 296(3): 898-904を参照。

【0089】

ASOを合成する方法は当業者に既知である。代替的に又は加えて、ASOは商用源から得てもよい。

【0090】

他に明記されない限り、一本鎖核酸(例えば、mRNA前駆体の転写産物、オリゴヌクレオチド、ASOなど)配列の左端は、5'末端であり、一本鎖または二本鎖の核酸配列の左方向は、5'方向と呼ばれる。同様に、核酸配列(一本鎖または二本鎖)の右端または右方向は、3'末端または3'方向である。一般に、核酸中の基準点に対する5'にある領域または配列は、「上流」として言及され、核酸中の基準点に対する3'にある領域

10

20

30

40

50

または配列は、「下流」として言及される。一般に、mRNAの5'方向または5'末端は、開始コドン(*initiation or start codon*)が位置する場所であり、一方で、3'末端または3'方向は、終止コドンが位置する場所である。幾つかの態様では、核酸中の基準点の上流にあるヌクレオチドは、負の数によって指定され、基準点の下流にあるヌクレオチドは、正の数によって指定され得る。例えば、基準点(例えば、mRNA中のエクソンエクソン連結)は「ゼロ」部位として指定され得、基準点に直接隣接し且つその上流にあるヌクレオチドは、「マイナス1」、例えば「-1」と指定され、一方で、基準点に直接隣接し且つその下流にあるヌクレオチドは、「プラス1」、例えば「+1」と指定される。

【0091】

10

他の実施形態では、ASOは、JAG1 RIC mRNA前駆体において保持されたイントロンの5'スプライス部位の下流(3'の方向)であるJAG1 RIC mRNA前駆体の標的部分(例えば5'スプライス部位に対して、正の数で示された方向)に対して相補的である(及び、標的部分に結合する)(図1)。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する領域+6から+500、+6から+400、+6から+300、+6から+200、または+6から+100内にあるJAG1 RIC mRNA前駆体の標的部分に相補的である。幾つかの実施形態では、ASOは、5'スプライス部位に対して、+1から+5までのヌクレオチド(5'スプライス部位の下流に位置付けられた最初の5つのヌクレオチド)に対して相補的ではない。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対するヌクレオチド+6と+50の間の領域内にあるJAG1 RIC mRNA前駆体の標的部分に相補的であり得る。幾つかの態様では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する領域+6から+90、+6から+80、+6から+70、+6から+60、+6から+50、+6から+40、+6から+30、または+6から+20内にある標的部分に相補的である。

20

【0092】

幾つかの実施形態では、ASOは、JAG1 RIC mRNA前駆体において保持されたイントロンの3'スプライス部位の上流(5'の方向(*relative*))にあるJAG1 RIC mRNA前駆体の標的領域(例えば負の数で指定された方向)に対して相補的である(図1)。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する領域-16から-500、-16から-400、-16から-300、-16から-200、または-16から-100内にあるJAG1 RIC mRNA前駆体の標的部分に相補的である。幾つかの実施形態では、ASOは、3'スプライス部位に対して、-1から-15までのヌクレオチド(3'スプライス部位の上流に位置付けられた最初の15のヌクレオチド)には相補的ではない。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する領域-16から-50内にあるJAG1 RIC mRNA前駆体の標的部分に相補的である。幾つかの態様では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する領域-16から-90、-16から-80、-16から-70、-16から-60、-16から-50、-16から-40、または-16から-30内にある、標的部分に相補的である。

30

【0093】

40

実施形態において、JAG1 RIC mRNA前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+6から、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-16までの領域内に存在する。

【0094】

幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソン内(上流)にあるJAG1 RIC mRNA前駆体の標的部分に相補的である(図1)。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける領域+2eから-4e内にあるJAG1 RIC mRNA前駆体の標的部分に相補的である。幾つかの実施形態では、ASOは、保

50

持されたイントロンの 5' スプライス部位に対するヌクレオチド - 1 e から - 3 e に相補的ではない。幾つかの実施形態では、ASO は、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する領域 - 4 e から - 100 e、- 4 e から - 90 e、- 4 e から - 80 e、- 4 e から - 70 e、- 4 e から - 60 e、- 4 e から - 50 e、- 4 e から - 40 e、- 4 e から - 30 e、または - 4 e から - 20 e 内にある、JAG1 RIC mRNA 前駆体の標的部分に相補的である。

【0095】

幾つかの実施形態では、ASO は、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に隣接しているエクソン内（下流）にある JAG1 RIC mRNA 前駆体の標的部分に相補的である（図 1）。幾つかの実施形態では、ASO は、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に隣接しているエクソンにおける + 2 e から - 4 e の領域内にある JAG1 RIC mRNA 前駆体の標的部分に相補的である。幾つかの実施形態では、ASO は、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対するヌクレオチド + 1 e に相補的ではない。幾つかの実施形態では、ASO は、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対して + 2 e から + 100 e、+ 2 e から + 90 e、+ 2 e から + 80 e、+ 2 e から + 70 e、+ 2 e から + 60 e、+ 2 e から + 50 e、+ 2 e から + 40 e、+ 2 e から + 30 e、または + 2 e から + 20 e の領域内にある、JAG1 RIC mRNA 前駆体の標的部分に相補的である。ASO は、スプライシングの特異的結合および効果的な増強作用に適する任意の長さでもよい。幾つかの実施形態では、ASO は 8 から 50 の核酸塩基から成る。例えば、ASO は、長さが 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、45 または 50 の核酸塩基であってもよい。幾つかの実施形態では、ASO は 50 よりも多い核酸塩基から成る。幾つかの実施形態では、ASO は、8 ~ 50 の核酸塩基、8 ~ 40 の核酸塩基、8 ~ 35 の核酸塩基、8 ~ 30 の核酸塩基、8 ~ 25 の核酸塩基、8 ~ 20 の核酸塩基、8 ~ 15 の核酸塩基、9 ~ 50 の核酸塩基、9 ~ 40 の核酸塩基、9 ~ 35 の核酸塩基、9 ~ 30 の核酸塩基、9 ~ 25 の核酸塩基、9 ~ 20 の核酸塩基、9 ~ 15 の核酸塩基、10 ~ 50 の核酸塩基、10 ~ 40 の核酸塩基、10 ~ 35 の核酸塩基、10 ~ 30 の核酸塩基、10 ~ 25 の核酸塩基、10 ~ 20 の核酸塩基、10 ~ 15 の核酸塩基、11 ~ 50 の核酸塩基、11 ~ 40 の核酸塩基、11 ~ 35 の核酸塩基、11 ~ 30 の核酸塩基、11 ~ 25 の核酸塩基、11 ~ 20 の核酸塩基、11 ~ 15 の核酸塩基、12 ~ 50 の核酸塩基、12 ~ 40 の核酸塩基、12 ~ 35 の核酸塩基、12 ~ 30 の核酸塩基、12 ~ 25 の核酸塩基、12 ~ 20 の核酸塩基、12 ~ 15 の核酸塩基、13 ~ 50 の核酸塩基、13 ~ 40 の核酸塩基、13 ~ 35 の核酸塩基、13 ~ 30 の核酸塩基、13 ~ 25 の核酸塩基、13 ~ 20 の核酸塩基、14 ~ 50 の核酸塩基、14 ~ 40 の核酸塩基、14 ~ 35 の核酸塩基、14 ~ 30 の核酸塩基、14 ~ 25 の核酸塩基、14 ~ 20 の核酸塩基、15 ~ 50 の核酸塩基、15 ~ 40 の核酸塩基、15 ~ 35 の核酸塩基、15 ~ 30 の核酸塩基、15 ~ 25 の核酸塩基、15 ~ 20 の核酸塩基、20 ~ 50 の核酸塩基、20 ~ 40 の核酸塩基、20 ~ 35 の核酸塩基、20 ~ 30 の核酸塩基、20 ~ 25 の核酸塩基、25 ~ 50 の核酸塩基、25 ~ 40 の核酸塩基、25 ~ 35 の核酸塩基、または 25 ~ 30 の核酸塩基の長さである。幾つかの実施形態では、ASO は長さが 30 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASO は長さが 29 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASO は長さが 28 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASO は長さが 27 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASO は長さが 26 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASO は長さが 25 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASO は長さが 24 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASO は長さが 23 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASO は長さが 22 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASO は長さが 21 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASO は長さが 20 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASO は長さが 19 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASO は長さが 18 のヌクレオチドである。

10

20

30

40

50

チドである。幾つかの実施形態では、ASOは長さが17のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASOは長さが16のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASOは長さが15のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASOは長さが14のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASOは長さが13のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASOは長さが12のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASOは長さが11のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、ASOは長さが10のヌクレオチドである。

【0096】

幾つかの実施形態では、異なる化学的性質を有するが、RIC mRNA前駆体の同じ標的部分に相補的である2つ以上のASOが使用される。幾つかの実施形態では、RIC mRNA前駆体の異なる標的部分に相補的である2つ以上のASOが使用される。

10

【0097】

実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、1つ以上の部分または抱合体、例えば、オリゴヌクレオチドの活性または細胞取り込みを増強する標的部分または他の抱合体に化学的に連結される。そのような部分には、限定されないが、例えば、コレステロール部分、コレステリル部分、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基などの脂肪族鎖、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖、または、アダマンタン酢酸として、脂質部分が含まれる。親油性部分を含むオリゴヌクレオチドおよび調製方法は、公開された文献に記載されている。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定されないが、脱塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、例えばN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、N-Ac-グルコサミン(GlcNAc)、またはマンノース(例えばマンノース6-リン酸)、脂質、またはポリ炭化水素化合物を含む部分と抱合する。当該技術分野で理解され且つ文献に記載されるように、例えばリンカーを用いて、抱合体は、糖、塩基またはリン酸基上のいくつかの位置のうちのいずれかでアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む任意のヌクレオチドの1つ以上に連結することができる。リンカーは二価または三価の分枝リンカーを含み得る。実施形態では、抱合体はアンチセンスオリゴヌクレオチドの3'末端に付けられている。オリゴヌクレオチド抱合体を調製する方法は、例えば、米国特許第8,450,467号「Carbohydrate conjugates as delivery agents for oligonucleotides」に記載され、これは参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0098】

幾つかの実施形態では、ASOによって標的とされる核酸は、真核細胞などの細胞内に発現したJAG1 mRNA前駆体である。幾つかの実施形態では、用語「細胞」は、細胞の集団を指すこともある。幾つかの実施形態では、細胞は被験体内に存在する。幾つかの実施形態では、細胞は被験体から単離されている。幾つかの実施形態では、細胞はエクスピロである。幾つかの実施形態では、細胞は疾患関連細胞もしくは疾患関連細胞、または細胞株である。幾つかの実施形態では、細胞はインビトロである(例えば細胞培養液中にある)。

30

【0099】

<医薬組成物>

40

記載された組成物のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、上記方法のいずれかにおいて使用するための医薬組成物または医薬製剤は、医薬品産業において周知の従来技術に従って調製することができ、且つ公開文献においても記載されている。実施形態において、被験体を処置するための医薬組成物または医薬製剤は、上記のような任意のアンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物、水和物、またはエステルの有効量、および薬学的に許容可能な希釈剤を含む。医薬製剤のアンチセンスオリゴマーはさらに、薬学的に許容可能な賦形剤、希釈剤または担体を含み得る。

【0100】

薬学的に許容可能な塩は、過度の毒性反応、刺激反応、アレルギー反応等を持たないヒ

50

トおよび下等動物の組織に接する使用に適しており、かつ適切なベネフィット・リスク比に相応している（例えば、S. M. Berger, et al., J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977) を参照、この目的のために参照によって本明細書に組み込まれる）。塩は、化合物の最終的な分離および精製中にインサイチュで、または遊離基機能を適切な有機酸と反応させることによって別々に調製されうる。薬学的に許容可能で無毒な酸付加塩の例は、塩化水素、臭化水素酸、リン酸、硫酸、および過塩素酸などの無機酸か、酢酸、シュウ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸もしくはマロン酸などの有機酸か、またはイオン交換などの他の文書で立証された方法を用いることによって形成されたアミノ基の塩である。他の薬学的に許容可能な塩は、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペニタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘブタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシ-エタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸、チオシアノ酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などを含む。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属の塩は、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどを含む。さらに薬学的に許容可能な塩は、適切な場合、ハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、低級アルキルのスルホン酸塩、およびアリールスルホン酸塩などの対イオンを使用して形成された、無毒なアンモニウム、第四級アンモニウム、およびアミンのカチオンを含む。

【0101】

実施形態において、組成物は、限定されないが、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、ソフトゲル、坐剤、および浣腸剤などの多くの考えられる剤形のいずれかへと製剤される。実施形態において、組成物は、水性培地、非水性培地、または混合培地状の懸濁液として製剤化される。水性懸濁液は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム（ソルビトールおよび/またはデキストラン）を含む懸濁液の粘度を増加させる物質をさらに含むこともある。その懸濁液は、安定化剤も含むこともある。実施形態において、本発明の医薬製剤または医薬組成物は、限定されないが、溶液、エマルジョン、マイクロエマルジョン、発泡体またはリポソーム含有製剤（例えばカチオンリポソームまたは非カチオンリポソーム）を含む。

【0102】

本発明の医薬組成物または医薬製剤は、必要に応じて当業者に周知されるように、または公開文献において記載されているように、1つ以上の透過促進剤、担体、賦形剤、または他の活性成分もしくは非活性成分を含むこともある。実施形態において、リポソームは立体的に安定したリポソーム、例えば1つ以上の特定の脂質を含むリポソームも含む。これらの特定の脂質は、循環寿命が増強されたリポソームを結果としてもたらす。実施形態において、立体的に安定したリポソームは、1つ以上の糖脂質を含むか、またはポリエチレングリコール（PEG）部分などの1つ以上の親油性ポリマーを用いて誘導体化される。実施形態において、界面活性剤は医薬製剤または医薬組成物中に含まれる。薬物製品、製剤およびエマルジョンにおける界面活性剤の使用は、当技術分野においてよく知られている。実施形態では、本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの効率的な送達を達成する、例えば、細胞膜にわたる拡散を助ける及び/又は脂溶性薬物の浸透性を増強するために、浸透促進剤を利用する。実施形態では、浸透促進剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、または非キレート性の非界面活性剤である。

【0103】

10

20

30

40

50

実施形態において、医薬製剤は複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは他の薬物または治療剤と組み合わせて投与される。実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当技術分野において知られている任意の方法によって、血液脳関門を介する主題のアンチセンスオリゴヌクレオチドの浸透を促進することができる1つ以上の薬剤と共に投与される。例えば、筋組織内の運動ニューロンヘアデノウイルスベクターを投与することによる薬剤の送達は、引用によって本明細書に組み込まれる米国特許第6,632,427号「*Adenoviral - vector - mediated gene transfer into medullary motor neurons*」に記載されている。脳、例えば、線条体、視床、海馬、または黒質への直接のベクターの送達は、例えば、引用によって本明細書に組み込まれる米国特許第6,756,523号「*Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brains*」に記載される。10

【0104】

実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、望ましい薬理学的性質または薬力学的性質を提供する薬剤に結合されるか抱合される。実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、血液脳関門を介する浸透または輸送を促進すると当技術分野において知られている物質、例えばトランスフェリン受容体の抗体に結合される。実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、アンチセンス化合物をより効果的にするために、または血液脳関門を介する輸送を増加させるためにウイルスベクターに結合される。実施形態において、浸透性の血液脳関門の破壊は、砂糖、例えばメソエリスリトール、キシリトール、D(+)ガラクトース、D(+)ラクトース、D(+)キシロース、ズルシトール、ミオ-イノシトール、L(-)フルクトース、D(-)マンニトール、D(+)グルコース、D(+)アラビノース、D(-)アラビノース、セロビオース、D(+)マルトース、D(+)ラフィノース、L(+)ラムノース、D(+)メリビオース、D(-)リボース、アドニトール、D(+)アラビトール、L(-)アラビトール、D(+)フコース、L(-)フコース、D(-)リキソース、L(+)リキソース、およびL(-)リキソース、またはアミノ酸、例えばグルタミン、リジン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、チロシン、バリン、およびタウリンを注入することにより促進される。血液脳関門の浸透性を増強するための方法および物質は、例えば、米国特許第4,866,042号「*Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier*」、米国特許第6,294,520号「*Material for passage through the blood-brain barrier*」、および米国特許第6,936,589号「*Parenteral delivery systems*」に記載されており、各々は引用によって本明細書に組み込まれる。20

【0105】

実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、1つ以上の部分または抱合体、例えば、オリゴヌクレオチドの活性または細胞取り込みを増強する標的部位または他の抱合体に化学的に連結される。そのような部分には、限定されないが、例えば、コレステロール部分、コレステリル部分、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基などの脂肪族鎖、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖、または、アダマンタン酢酸として、脂質部分が含まれる。親油性部分を含むオリゴヌクレオチドおよび調製方法は、公開された文献に記載されている。実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定されないが、脱塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、例えばN-アセチルガラクトサミン(GlucNAc)、N-Acグルコサミン(GalNAc)、もしくはマンノース(例えばマンノース-6-リン酸)、脂質30

10

20

30

40

50

、またはポリ炭化水素化合物を含む部分で抱合される。抱合体は、当該技術分野で理解され文献に記載されるように、例えばリンカーを用いて、糖、塩基またはリン酸基上のいくつかの位置のうちのいずれかでアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む任意のヌクレオチドの1つ以上に連結されうる。リンカーは二価または三価の分枝リンカーを含みうる。実施形態では、抱合体はアンチセンスオリゴヌクレオチドの3'末端に結合している。オリゴヌクレオチド抱合体を調製する方法は、例えば、米国特許第8,450,467号「Carbohydrate conjugates as delivery agents for oligonucleotides」に記載され、参照により本明細書に組み込まれる。

【0106】

10

被験体の処置本明細書に提供される組成物のうちのいずれかが個体に投与されうる。「個体」は、「被験体」または「患者」と互換的に使用されてもよい。個体は、哺乳動物、例えば、ヒト、またはヒト以外の靈長類、げっ歯類、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ロバ、ヤギ、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、またはヒツジなどの動物であってもよい。実施形態では、個体はヒトである。実施形態では、個体は胎児、胚、または小児である。他の実施形態では、個体は植物などの別の真核生物かもしれない。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される化合物は細胞にエクスピボで投与される。

【0107】

20

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物は、疾病または障害を処置する方法として個体に投与される。いくつかの実施形態では、個体は、本明細書に記述されたいずれかの疾病などの遺伝病を有する。いくつかの実施形態では、個体は、本明細書に記述されたいずれかの疾病などの疾病を有するリスクがある。いくつかの実施形態では、個体は、不十分な量のタンパク質または不十分な活性のタンパク質により引き起こされる疾病または障害を有するリスクが増大している。個体が、不十分な量のタンパク質または不十分な活性のタンパク質により引き起こされる疾病または障害を有するリスクが増大している場合、方法は防止的または予防的な処置を含む。例えば、個体は、その疾病的家族歴のために、そのような疾病または障害を有するリスクが増大している場合がある。典型的には、そのような疾病または障害を有するリスクが増大している個体は、予防的処置（例えば、疾病または障害の発症または悪化を予防するかまたは遅らせることによる）から利益を受ける。

30

【0108】

本発明のASOの投与に適切な経路は、ASOの送達が所望される細胞型に応じて変わりうる。多数の組織および器官はアラジール症候群によって影響を受け、肝臓が最も著しく影響を受ける組織である。本発明のASOは、患者に非経口的に投与されることもある。実施形態では、本発明のASOは、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または静脈内注射によって患者に投与される。実施形態では、送達は心臓または肝臓に対して行なわれる。実施形態では、胎児は、例えばASO組成物を胎児に対して直接または間接的（例えば母を介して）に投与することにより、子宮内で処置される。

【0109】

40

筋ジストロフィーの被験体の処置において、本発明の組成物は、直接投与（例えば注射により局所的に、もしくは処置部位における局所投与）、もしくは全身的な（例えば非経口的もしくは経口的な）、鼻腔内、経口的な投与を含む任意の適切な手段か、または吸入、腸内、局所的、子宮内、膣、舌下、直腸、筋肉内、胸膜内、脳室内、腹腔内、眼、静脈内、もしくは皮下の手段により筋細胞に提供されてもよい。

【0110】

50

スプライシングを増強する追加のASOを識別する方法本発明の範囲内にはまた、特に標的イントロンにおけるJAG1-RICのmRNA前駆体のスプライシングを増強する追加のASOを識別する（判定する）方法がある。mRNA前駆体の標的領域内で様々なヌクレオチドを特異的にハイブリダイズさせるASOは、標的イントロンのスプライシングの速度および/または程度を改善するASOを識別する（判定する）ためにスクリーニ

ングされてもよい。いくつかの実施形態では、ASOはスプライシング抑制因子／サイレンサーの結合部位でブロックまたは妨害することもある。当該技術分野において既知の任意の方法は、イントロンの標的領域にハイブリダイズされた時に所望の効果（例えばスプライシング、タンパク質または機能性RNAの生産の向上）をもたらすASOを識別する（判定する）ために使用されてもよい。これらの方法はまた、保持されたイントロンに隣接するエクソン中、または保持されていないイントロン中の標的領域へ結合することにより、保持されたイントロンのスプライシングを増強するASOを識別するために使用することができる。使用されうる方法の一例が下記に提供される。

【0111】

mRNA前駆体の標的領域にハイブリダイズするように設計されたASOを用いて、ASO「ウォーク」（walk）と呼ばれる1ラウンドのスクリーニングを行うこともある。例えば、ASOウォークに使用されるASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位の上流のおよそ100ヌクレオチド（例えば、標的とされた／保持されたイントロンの上流に位置するエクソンの配列の一部）から標的とされた／保持されたイントロンの5'スプライス部位の下流のおよそ100ヌクレオチドまで、および／または、保持されたイントロンの3'スプライス部位の上流のおよそ100ヌクレオチドから標的とされた／保持されたイントロンの3'スプライス部位の下流のおよそ100ヌクレオチド（例えば、標的とされた／保持されたイントロンの下流に位置するエクソンの配列の一部）まで、5ヌクレオチドごとに敷き詰められうる。例えば、長さが15ヌクレオチドの第1のASOは、標的とされた／保持されたイントロンの5'スプライス部位に対するヌクレオチド+6から+20まで特異的にハイブリダイズするように設計されうる。第2のASOは、標的とされた／保持されたイントロンの5'スプライス部位に対するヌクレオチド+11から+25まで特異的にハイブリダイズするように設計されている。ASOは、mRNA前駆体の標的領域に及ぶように設計されている。実施形態では、ASOは、より密に、例えば、1、2、3、または4ヌクレオチドごとに敷き詰められうる。さらに、ASOは、5'スプライス部位の下流の100ヌクレオチドから3'スプライス部位の上流の100ヌクレオチドまで敷き詰められうる。

【0112】

1つ以上のASO、または1つの対照ASO（標的領域にハイブリダイズするとは予期されていらない配列である、スクランブル配列を有するASO）は、例えばトランスフェクションによって、標的mRNA前駆体（例えば、本明細書で別記されるRICmRNA前駆体）を発現する疾患関連の細胞株へと送達される。ASOの各々のスプライシングを誘発する効果は、本明細書で記載されるように、当該技術分野で既知の方法、例えば、スプライスジャンクションに及ぶプライマーを使用する逆転写酵素（RT）-PCRによって評価されうる（「イントロン保持事象の特定」を参照）。対照ASO処理された細胞と比較して、ASO処理された細胞におけるスプライスジャンクションに及ぶプライマーを使用して生成されたRT-PCR産物が減少または欠如しているということは、標的イントロンのスプライシングが増強されたことを示している。いくつかの実施形態では、スプライシング効率、スプライシングされていないmRNA前駆体に対するスプライシングされたmRNA前駆体の比率、スプライシングの速度、またはスプライシングの程度は、本明細書に記載のASOを使用して改善されうる。標的mRNA前駆体によってコード化されるタンパク質または機能性RNAの量も、各ASOが所望の効果（例えば、タンパク質産生の増強）を達成したかどうかを判定するために評価されうる。ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡検査法、およびELISAなどの、タンパク質産生を評価および／または定量するための当該技術分野で既知の方法も使用することができる。

【0113】

ASO「ミクロウォーク」（micro-walk）と呼ばれる第2ラウンドのスクリーニングは、mRNA前駆体の標的領域にハイブリダイズするように設計されたASOを使用して実行されうる。ASOミクロウォークに使用されるASOは、ASOでハイブリ

10

20

30

40

50

ダイズされたときに結果的にスプライシングを増強させるmRNA前駆体のヌクレオチド配列をさらに改良する(refine)ために、1ヌクレオチドごとに敷き詰められる。

【0114】

標的イントロンのスプライシングを促進するASOによって画定される領域は、1-ntステップで間隔を置かれたASO、ならびに典型的には18-25ntであるより長いASOを含む、ASO「ミクロウォーク」によって、より詳細に調査される。

【0115】

上記にASOウォークに関して記載されたように、1つ以上のASO、または対照ASO(標的領域にハイブリダイズすると予期されていない配列である、スクランブル配列を有するASO)を、例えばトランスフェクションによって、標的mRNA前駆体を発現する疾患関連細胞株へと送達することによって、ASOミクロウォークが実行される。ASOの各々のスプライシングを誘発する効果は、本明細書で記載されるように、当該技術分野で既知の方法、例えば、スプライスジヤンクションに及ぶプライマーを使用する逆転写酵素(RT) - PCRによって評価されうる(「イントロン保持事象の特定」を参照)。対照ASO処理された細胞と比較して、ASO処理された細胞におけるスプライスジヤンクションに及ぶプライマーを使用して生成されたRT - PCR産物が減少または欠如しているということは、標的イントロンのスプライシングが増強されたことを示している。いくつかの実施形態では、スプライシング効率、スプライシングされていないmRNA前駆体に対するスプライシングされたmRNA前駆体の比率、スプライシングの速度、またはスプライシングの程度は、本明細書に記載のASOを使用して改善されうる。標的mRNA前駆体によってコード化されるタンパク質または機能性RNAの量も、各ASOが所望の効果(例えば、タンパク質産生の増強)を達成したかどうかを判定するために評価されうる。ウェスタンプロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡検査法、およびELISAなどの、タンパク質産生を評価および/または定量するための当該技術分野で既知の方法も使用することができる。

10

20

30

【0116】

mRNA前駆体の領域にハイブリダイズされたときに、結果的にスプライシングを増強させ、タンパク質産生を増加させるASOは、動物モデル、例えば、全長ヒト遺伝子がノックインされたトランスジェニックマウスモデルまたは疾患のヒト化マウスモデルを使用して、インピボで試験されうる。ASOの投与に適した経路は、ASOの送達が望まれる疾患及び/又は細胞型に応じて変化しうる。ASOは、例えば、腹腔内注射、筋肉注射、皮下注射、または静脈注射によって投与されうる。投与後に、モデル動物の細胞、組織、及び/又は臓器は、当該技術分野に既知の方法および本明細書に記載される方法によって、例えば、スプライシング(効率、速度、程度)およびタンパク質産生を評価することにより、ASO処置の効果を判定するために評価されうる。動物モデルはまた、疾患または疾患重症度の表現型または行動的徴候でありうる。

40

【0117】

本発明の好ましい実施形態が本明細書中に示され記述された一方、そのような実施形態が一例としてしか提供されていないことは当業者にとって明白だろう。多くの変更、変化、および置換が、本発明から逸脱することなく、当業者に想到されるであろう。本明細書に記載される本発明の実施形態の様々な代案が、本発明の実施において利用されることもあることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義するものであり、この特許請求の範囲内の方法および構造およびそれらの同等物がそれによって包含されることが意図されている。

【実施例】

【0118】

本発明は、以下の実施例によってより具体的に例証されるだろう。しかしながら、本発明がいかなる方法においてもこれらの実施例によって限定されないことが理解されるべきである。

50

【0119】

<実施例1：次世代配列決定を用いたRNAseqによるJAG1転写産物のイントロン保持事象の特定>

イントロン保持事象を特定するために次世代配列決定を使用して、全トランスクリプトームショットガン配列決定を実行し、JAG1遺伝子によって生成された転写産物のスナップショットを明らかにした。この目的のために、THLE-3（ヒトの肝臓上皮）細胞の核および細胞質の分画からのpolyA+RNAを単離し、Illumina's Truseq Stranded mRNA library Prep Kitを使用してcDNAライブラリを構築した。ライブラリに対してペア-エンド配列決定（pair-end sequence）を行い、結果として、ヒトゲノム（2009年2月、GRCh37/hg19アセンブリ）にマッピングされた100ヌクレオチドの読み取りをもたらした。JAG1に対する配列決定の結果を、図3に示す。簡潔に言うと、図3は、UCSC Genome Informatics Group (Center for Biomolecular Science & Engineering, University of California, Santa Cruz, 1156 High Street, Santa Cruz, CA 95064)によって操作され、かつ、例えばRos enblom, et al., 2015, "The UCSC Genome Browser database: 2015年アップデート," Nucleic Acids Research 43, Database Issue (doi: 10.1093/nar/gku1177)に記載された、UCSCのゲノムブラウザを使用して視覚化されマッピングされた読み取りを示し、読み取りの範囲および数はピーク信号によって推論されうる。ピークの高さは、特定の領域における読み取り密度によって与えられた発現のレベルを示している。ピークがJAG1エクソン領域およびイントロン領域に適合されるように、（読み取りシグナルの下の）UCSCゲノムブラウザによってJAG1の模式図（縮尺通りに描かれている）が提供される。この表示に基づいて、THLE-3細胞の核分画における高い読み取り密度を持つが、（図3の下のダイアグラムにおけるイントロン13に関して、図7の下のダイアグラムにおけるイントロン18に関して、および図11の下のダイアグラムにおけるイントロン23に関して示されるように、）これらの細胞の細胞質分画中では、読み取りが非常に低いか全くない3つのイントロン（矢印により示された13、18および23）を識別した。このことは、これらのイントロンが保持されること、およびイントロン-13、イントロン-18およびイントロン-23含有転写産物は細胞核中に残存し、かつそれらが細胞質へと運び出されないため、これらの保持されたJAG1 RIC mRNA前駆体は非生産的であることが示唆されることを示す。

【0120】

<実施例2：JAG1のイントロン13を標的とするASOウォークの設計>

ASOウォークを、本明細書中に記載された方法を使用して、イントロン13を標的とするよう設計した（図4；表2）。ヌクレオチド+6から+69に及ぶイントロン13の5'スプライス部位のすぐ下流の領域、およびヌクレオチド-16から-68に及ぶイントロン13の3'スプライス部位のすぐ上流の領域を、（1ASO、JAG1-IVS13+52を例外として、）2'-O-Me RNA、PS骨格、5ヌクレオチド間隔でシフトされた18-mer ASOを用いて標的とした（図4；表2）。

【0121】

<実施例3：JAG1イントロン13のASO標的化によるスプライシング効率の改善が転写レベルを増加させる>

ASOを使用してJAG1イントロン13のスプライシング効率を改善することによって、JAG1発現の増加を達成することができるかどうかを判定するために、本明細書に記載される方法を使用した（図5）。この目的のために、ARPE-19細胞を偽トランスフェクトしたか、あるいはRNAiMAX (RiM) (Invitrogen) の送達試薬を独立して使用して、図4および表2に記載される標的ASOの各々、または非標的化SMN-ASO対照でトランスフェクトした。48時間（図5に示されるように）60

10

20

30

40

50

nMのASOを使用して、実験を行った。放射性RT-PCRの結果は、いくつかの標的ASO(+6、SEQ ID NO: 135; +11、SEQ ID NO: 136; +21、SEQ ID NO: 138; +26、SEQ ID NO: 139; +31、SEQ ID NO: 140; +36、SEQ ID NO: 141; +52; -16、SEQ ID NO: 301; -36、SEQ ID NO: 297; -41、SEQ ID NO: 296; -46、SEQ ID NO: 295; および-51、SEQ ID NO: 294)が、疑似トランスフェクトされた、または非標的化のASO(図5)と比べて、JAG1転写産物のレベルを増大させることを示した。標的ASOでトランスフェクトされた細胞からのJAG1 PCR産物に対応するバンドの強度を アクチンに正規化し、偽処理された細胞からの正規化されたJAG1 PCR産物に対してプロットした。この分析の結果は、そのいくつかの標的ASOが、PKD1転写産物レベルを2から6倍増大させることを示している(図5)。これらの結果は、JAG1転写産物の他の部分にプライマーを使用してRT-qPCRによって確認され、図6における倍率変化プロットにより証明されたJAG1アップレギュレーションの同じ傾向を示す(上部がベータアクチンに正規化されたもの、下部がRPL32に正規化されたもの)。要するに、これらの結果によって、ASOを使用してJAG1遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を改善することが、遺伝子発現の増加につながることが確認される。

10

20

30

40

50

【0122】

<実施例4：JAG1のイントロン18を標的とするASOウォークの設計>

ASOウォークを、本明細書中に記載された方法を使用して、イントロン18を標的とするよう設計した(図8；表2)。イントロン18のヌクレオチド+15から+67に及ぶ5'スプライス部位のすぐ下流の領域、およびイントロン18のヌクレオチド-16から-68に及ぶ3'スプライス部位のすぐ上流の領域を、2'-O-Me RNA、PS骨格、5ヌクレオチド間隔でシフトされた18-mer ASOを用いて標的とした(図8；表2)。

【0123】

<実施例5：JAG1イントロン18のASO標的化によるスプライシング効率の改善が転写レベルを増加させる>

ASOを使用してJAG1イントロン18のスプライシング効率を改善することにより、JAG1の発現の増加を達成しうるかどうかを判断するために、本明細書に記載された方法を使用した(図9)。この目的のために、独立してRNAiMAX(RiM)(In vitrorogen)の送達試薬を使用して、ARPE-19細胞を偽トランスフェクトしたか、図8および表2に記載される標的ASOの各々でトランスフェクトしたか、または非標的化SMN-ASO対照でトランスフェクトした。48時間(図5に示されるように)60nMのASOを使用して、実験を行った。放射性RT-PCRの結果は、いくつかの標的ASO(+15; +20; および-26、SEQ ID NO: 107)が、疑似トランスフェクトされたか、非標的のASOと比較してJAG1転写産物レベルを増大させることを示す(図9)。標的ASOでトランスフェクトされた細胞からのJAG1 PCR産物に対応するバンドの強度を アクチンに正規化し、偽処理された細胞からの正規化されたJAG1 PCR産物に対してプロットした。この分析の結果は、その3つの標的ASOが、JAG1転写産物レベルを少なくとも1.5倍増大させることを示している(図9)。これらの結果は、JAG1転写産物の他の部分にプライマーを使用するRT-qPCRによって確認され、図10における倍率変化プロットにより証明されたJAG1アップレギュレーションの同じ傾向を示す(上部はベータアクチンに正規化されたもの、下部はRPL32に正規化されたもの)。要するに、これらの結果によって、ASOを使用してJAG1遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を改善することが、遺伝子発現の増加につながることが確認される。

【0124】

第2の方法は、ASOを用いてJAG1標的遺伝子イントロンのスプライシング効率の増大を達成することができるかどうかを判定するために使用されうる。簡潔に言えば、ヒ

トの網膜の上皮細胞である A R P E - 1 9 細胞 (A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) , U S A) 、またはヒトの肝細胞腫細胞株である H u h - 7 (N I B I O H N (日本)) 、またはヒトの神経芽細胞腫細胞株である S K - N - A S (A T C C) は、疑似トランスフェクトされるか、または表 1 および 2 に記載の標的 A S O でトランスフェクトされる。細胞を、供給業者の仕様書に従って、 L i p o f e c t a m i n e R N A i M a x トランスフェクション試薬 (T h e r m o F i s h e r) を用いてトランスフェクトする。A S O を 9 6 ウェル組織培養プレートに蒔き、 O p t i - M E M で希釈した R N A i M a x と組み合わせる。トリプシンを用いて細胞を剥離し、完全培地内で再懸濁し、約 2 5 , 0 0 0 個の細胞を A S O トランスフェクション混合物に加える。トランスフェクション実験は 3 通りのプレート複製において実行される。最終的な A S O 濃度は 8 0 n M である。供給業者の仕様書に従って、培地をトランスフェクションの 6 時間後に交換し、細胞を、 D N A s e (T h e r m o F i s h e r) を補充した C e l l s - t o - C t R T 試薬を用いて 2 4 時間で回収する。供給業者の仕様書に従い、 c D N A を C e l l s - t o - C t R T 試薬 (T h e r m o F i s h e r) で生成する。対象のイントロンでスプライシングする量を定量化するために、対応するエクソン - エクソン連結 (T h e r m o F i s h e r) に及ぶプローブで T a q m a n アッセイを用いて、定量的 P C R を実施する。 T a q m a n アッセイを、 Q u a n t S t u d i o 7 F l e x R e a l - T i m e P C R システム (T h e r m o F i s h e r) 上の供給業者の仕様書に従い実行する。標的遺伝子アッセイ値を、 R P L 3 2 (C t) およびプレート適合偽トランスフェクションサンプル (C t) に対して正規化し、模擬モックの定量 (2 ^ - (C t)) に対して倍数変化を生成する。
10

【 0 1 2 5 】

< 実施例 6 : J A G 1 のイントロン 2 3 を標的とする A S O ウォークの設計 >

A S O ウォークを、本明細書中に記載された方法を使用して、イントロン 2 3 を標的とするよう設計した (図 1 2 ; 表 2) 。イントロン 2 3 のヌクレオチド + 6 から + 5 8 に及ぶ 5 ' スプライス部位のすぐ下流の領域、およびイントロン 2 3 のヌクレオチド - 1 6 から - 6 8 に及ぶ 3 ' スプライス部位のすぐ上流の領域を、 2 ' - O - M e R N A 、 P S 骨格、 5 ヌクレオチド間隔でシフトされた 1 8 - m e r A S O を用いて標的とした (図 1 2 ; 表 2) 。
20

【 0 1 2 6 】

【表2】

表2：JAG1遺伝子を標的とするASO

SEQ ID NO	ASOの名称	5'から3'までの配列	イントロン
135	JAG-IVS13+6	aggucccgggagaaggga	13
136	JAG-IVS13+11	cagccaggucggggaga	13
137	JAG-IVS13+16	ggagacagccaggucgg	13
138	JAG-IVS13+21	agucuggagacagccagg	13
139	JAG-IVS13+26	gagcaagucuggagacag	13
140	JAG-IVS13+31	aaaaggagcaagucugga	13
141	JAG-IVS13+36	gggacaaaaggagcaagu	13
440	JAG-IVS13+52	gcagugguaaguaagggg	13
301	JAG-IVS13-16	gggaucagacaucagcca	13
300	JAG-IVS13-21	cagaucacagccaugcac	13
299	JAG-IVS13-26	cacagccaugcacccaca	13
298	JAG-IVS13-31	ccaugcacccacagaugc	13
297	JAG-IVS13-36	cacccacagaugcggcau	13
296	JAG-IVS13-41	acagaugcggcauuccua	13
295	JAG-IVS13-46	ugcggcauuccuaagcca	13
294	JAG-IVS13-51	cauuccuaagccaagggc	13
441	JAG-IVS18+15	ccugggagaguucaagggg	18
442	JAG-IVS18+20	acagcccugggagaguuc	18
443	JAG-IVS18+25	cuccgacagcccugggag	18
444	JAG-IVS18+30	aucugcuccgacagccu	18
445	JAG-IVS18+35	ucaggaucugcuccgaca	18
446	JAG-IVS18+40	gggugucaggaugcugcuc	18
447	JAG-IVS18+45	cccaagggugugcaggau	18
448	JAG-IVS18+50	aaguccccaaaggguuca	18
109	JAG-IVS18-16	aacuuuaauagugaggacu	18
108	JAG-IVS18-21	aaugugaggacuucaac	18
107	JAG-IVS18-26	ugaggacuuacaacaggga	18
106	JAG-IVS18-31	acuuacaacaggaaagcg	18
105	JAG-IVS18-36	aacagggaaagcggcuu	18
104	JAG-IVS18-41	ggaaagcggcuuagccc	18
103	JAG-IVS18-46	gcggcucuuagccuaagu	18
102	JAG-IVS18-51	cuuagccuaaguuaaac	18
369	JAG-IVS23+6	aaaaaaacaaagguguua	23
370	JAG-IVS23+11	aaaaaaaaaaaaacaaagggu	23
371	JAG-IVS23+16	ccauuaaaaaaaaaaaaaca	23
372	JAG-IVS23+21	auccaccauucaaaaaaaaa	23
373	JAG-IVS23+26	cagacauccaccauucaa	23
374	JAG-IVS23+31	gcaagcagacauccacca	23
375	JAG-IVS23+36	agcaagcaagcagacauc	23
376	JAG-IVS23+41	uuuuaagcaagcaagcag	23
414	JAG-IVS23-16	aaaaccccacacacgugua	23
413	JAG-IVS23-21	ccacacacguguaagauuu	23
412	JAG-IVS23-26	cacguguaagauugagag	23
411	JAG-IVS23-31	guaagauugagaggaaga	23
410	JAG-IVS23-36	auugagaggaagaacaaa	23
409	JAG-IVS23-41	gaggaagaacaaaaggcu	23
408	JAG-IVS23-46	agaacaaaaggcugagau	23
407	JAG-IVS23-51	aaaaggcugagauuuu	23

10

20

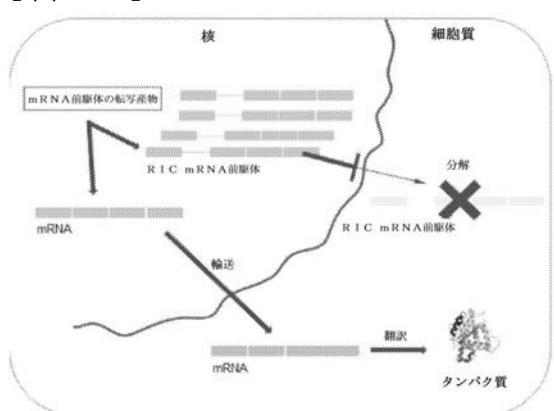
30

40

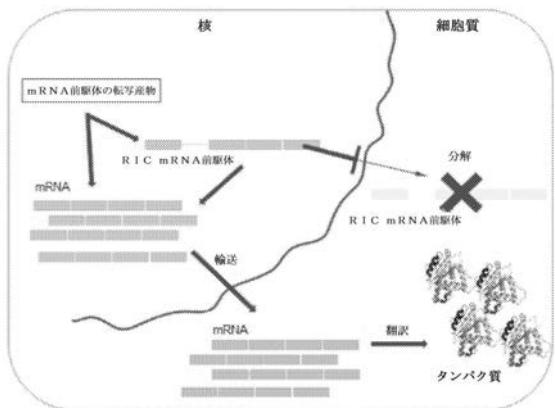
〔 図 1 〕



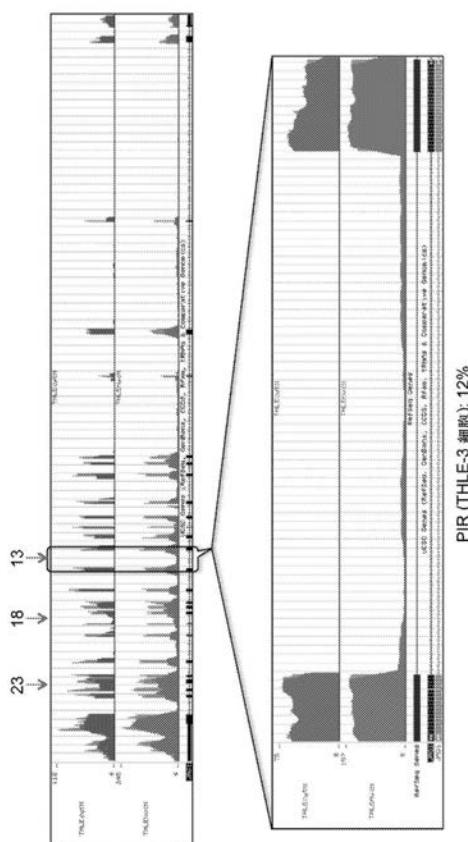
【図 2 A】



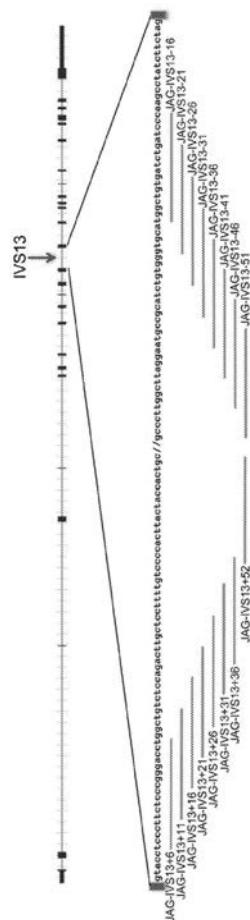
【 図 2 B 】



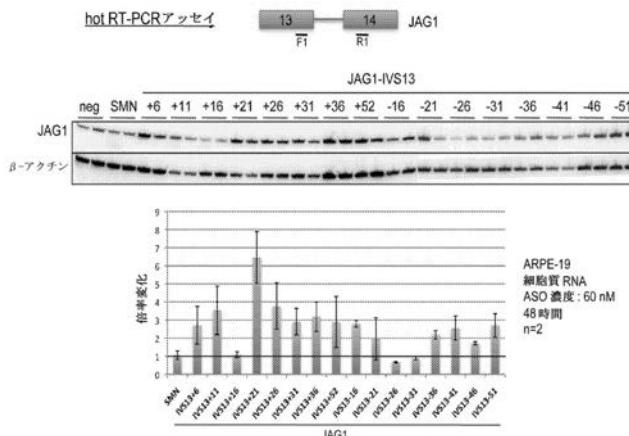
【 3 】



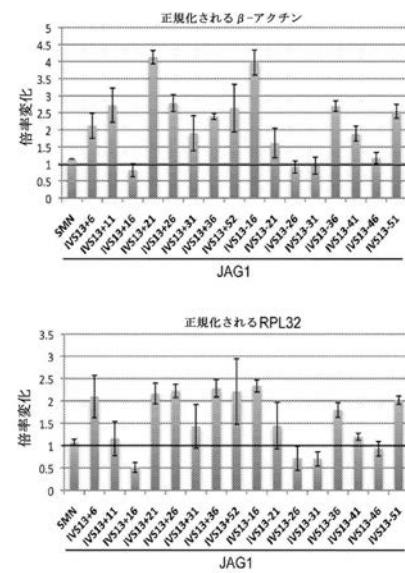
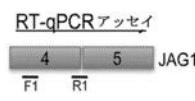
【 図 4 】



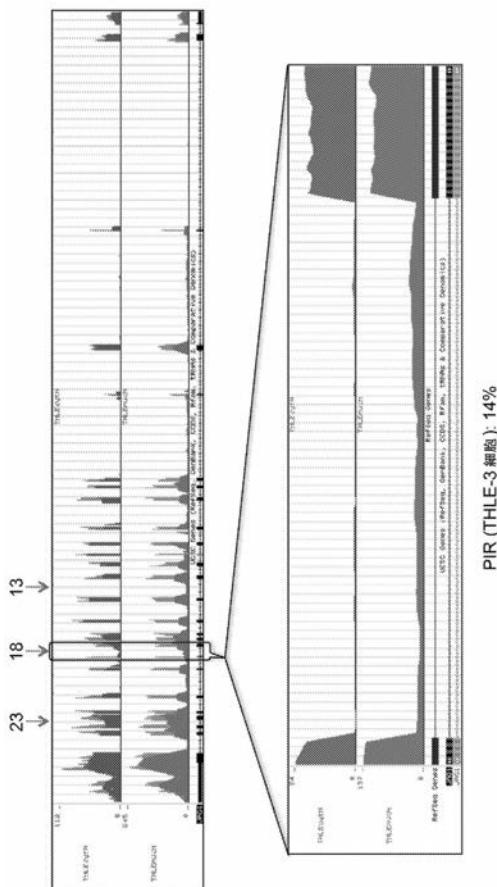
【 四 5 】



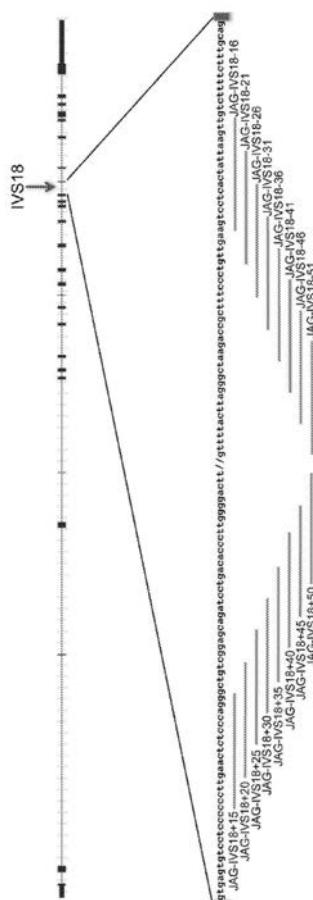
【 四 6 】



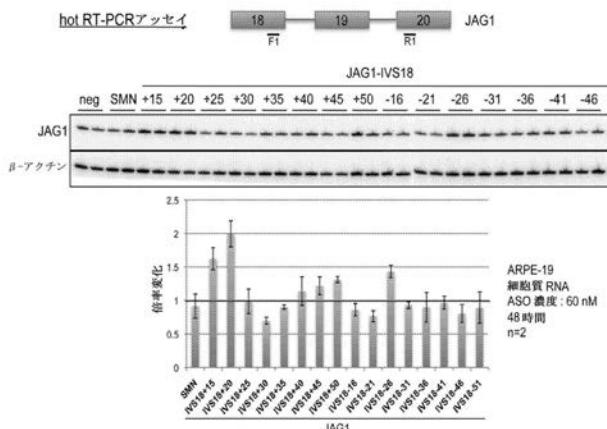
【 义 7 】



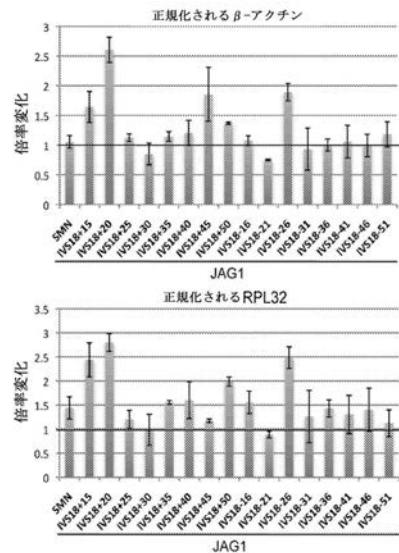
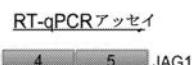
【 図 8 】



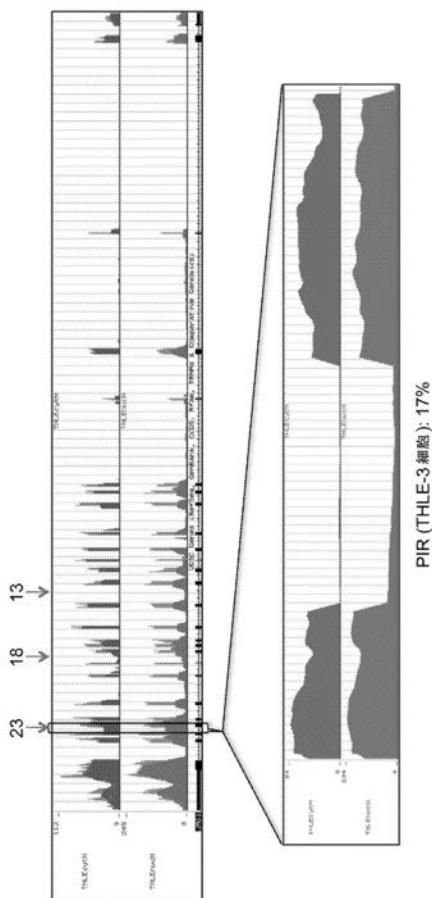
【 図 9 】



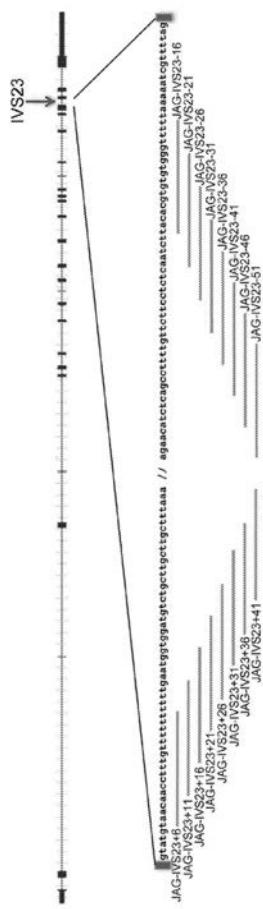
【図10】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【配列表】

2018538288000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/066414
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</p> <p>IPC(8) - A61K 31/7088; C12N 15/11; C12N 15/113; C12Q 1/68 (2017.01) CPC - A61K 31/7088; C12N 15/111; C12N 2310/11; C12Q 1/6883 (2017.02)</p>		
<p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document</p>		
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/375; 514/44A; 536/24.5 (keyword delimited)</p>		
<p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document</p>		
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/035091 A1 (COLD SPRING HARBOR LABORATORY) 12 March 2015 (12.03.2015) entire document	1-9, 48, 51-56, 82-84, 97-100
A	ĐEDIĆ et al. "Alagille Syndrome Mimicking Biliary Atresia in Early Infancy," PLoS One, 30 November 2015 (30.11.2015), Vol. 10, Pgs. 1-7. entire document	1-9, 48, 51-56, 82-84, 97-100
A	PEAR, W.S. "New roles for Notch in tuberous sclerosis," The Journal of Clinical Investigation, 28 December 2009 (28.12.2009), Vol. 120, Pgs. 84-87. entire document	1-9, 48, 51-56, 82-84, 97-100
A	VIEIRA et al. "Jagged 1 Rescues the Duchenne Muscular Dystrophy," Cell, 12 November 2015 (12.11.2015), Vol. 163, Pgs. 1204-1213. entire document	1-9, 48, 51-56, 82-84, 97-100
A	ZIMRIN et al. "An antisense oligonucleotide to the notch ligand jagged enhances fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vitro," J Biol Chem, 20 December 1996 (20.12.1996), Vol. 271, Pgs. 32499-32502. entire document	1-9, 48, 51-56, 82-84, 97-100
P, A	NOMAKUCHI et al. "Antisense oligonucleotide-directed inhibition of nonsense-mediated mRNA decay," Nat Biotechnol, 14 December 2015 (14.12.2015), Vol. 34, Pgs. 164-166. entire document	1-9, 48, 51-56, 82-84, 97-100
<p><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>		
<p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date "C" 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) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "R" 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</p>		
Date of the actual completion of the international search 09 April 2017	Date of mailing of the international search report 19 APR 2017	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/066414
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
<p>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:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13<i>ter.</i> 1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13<i>ter.</i> 1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13<i>ter.</i> 1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments: SEQ ID NO:3 was searched.</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/066414
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.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2.	<input type="checkbox"/> 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.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 10-47, 49, 50, 57-81, 85-96 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
see Extra Sheet(s)		
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.	
3.	<input type="checkbox"/> 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.	<input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-9, 48, 51-56, 82-84, and 97-100 restricted to an antisense oligomer of SEQ ID NO: 3.	
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2016/066414
--

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 need to be paid.

Group I+: claims 1-9, 48, 51-56, 82-84, and 97-100 are drawn to antisense oligomers, and methods and compositions comprising the same.

The first invention of Group I+ is restricted to an antisense oligomer, and methods and compositions comprising the same, wherein the antisense oligomer is selected to be SEQ ID NO: 3. It is believed that claims 1-9, 48, 51-56, 82-84, and 97-100 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on SEQ ID NO: 3.

Applicant is invited to elect additional antisense oligomers, each with specified SEQ ID NO, to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be an antisense oligomer, and methods and compositions comprising the same, wherein the antisense oligomer is selected to be SEQ ID NO: 4. Additional antisense oligomers will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on 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.

The inventions listed in 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:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for inducing processing of a deficient JAG1 mRNA transcript, requiring the selection of alternatives for the antisense oligomers, where "an antisense oligomer comprising a sequence with at least about 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, or 100% sequence identity to any one of SEQ ID NOs: 3-436".

The Groups I+ share the technical features of a method of treating Alagille syndrome in a subject in need thereof by increasing the expression of a target protein or functional RNA by cells of the subject, wherein the cells have a retained-intron-containing pre-mRNA (RIC pre-mRNA), the RIC pre-mRNA comprising a retained intron, an exon flanking the 5' splice site, an exon flanking the 3' splice site, and wherein the RIC pre-mRNA encodes the target protein or functional RNA, the method comprising contacting the cells of the subject with an antisense oligomer (ASO) complementary to a targeted portion of the RIC pre-mRNA encoding the target protein or functional RNA, thereby increasing the level of mRNA encoding the target protein or functional RNA, and increasing the expression of the target protein or functional RNA in the cells of the subject; a method of increasing expression of a target protein, wherein the target protein is JAG1, by cells having a retained-intron-containing pre-mRNA (RIC pre-mRNA), the RIC pre-mRNA comprising a retained intron, an exon flanking the 5' splice site of the retained intron, an exon flanking the 3' splice site of the retained intron, and wherein the RIC pre-mRNA encodes JAG1 protein, the method comprising contacting the cells with an antisense oligomer (ASO) complementary to a targeted portion of the RIC pre-mRNA encoding JAG1 protein, whereby the retained intron is constitutively spliced from the RIC pre-mRNA encoding JAG1 protein, thereby increasing the level of mRNA encoding JAG1 protein, and increasing the expression of JAG1 protein in the cells; an antisense oligomer comprising a sequence; A composition comprising an antisense oligomer for use in a method of increasing expression of a target protein or a functional RNA by cells to treat Alagille syndrome in a subject in need thereof associated with a deficient protein or deficient functional RNA, wherein the deficient protein or deficient functional RNA is deficient in amount or activity in the subject, wherein the antisense oligomer enhances constitutive splicing of a retained intron-containing pre-mRNA (RIC pre-mRNA) encoding the target protein or the functional RNA, wherein the target protein is: (a) the deficient protein; or (b) a compensating protein which functionally augments or replaces the deficient protein or in the subject; and wherein the functional RNA is: (a) the deficient RNA; or (b) a compensating functional RNA which functionally augments or replaces the deficient functional RNA in the subject; wherein the RIC pre-mRNA comprises a retained intron, an exon flanking the 5' splice site and an exon flanking the 3' splice site, and wherein the retained intron is spliced from the RIC pre-mRNA encoding the target protein or the functional RNA, thereby increasing production or activity of the target protein or the functional RNA in the subject; a composition comprising an antisense oligomer for use in a method of treating a condition associated with JAG1 protein in a subject in need thereof, the method comprising the step of increasing expression of JAG1 protein by cells of the subject, wherein the cells have a retained-intron-containing pre-mRNA (RIC pre-mRNA) comprising a retained intron, an exon flanking the 5' splice site of the retained intron, an exon flanking the 3' splice site of the retained intron, and wherein the RIC pre-mRNA encodes the JAG1 protein, the method comprising contacting the cells with the antisense oligomer, whereby the retained intron is constitutively spliced from the RIC pre-mRNA transcripts encoding JAG1 protein, thereby increasing the level of mRNA encoding JAG1, and increasing the expression of JAG1 protein, in the cells of the subject; a pharmaceutical composition comprising: an antisense oligomer that hybridizes to a target sequence of a deficient JAG1 mRNA transcript, wherein the deficient JAG1 mRNA transcript comprises a retained intron, wherein the antisense oligomer induces splicing out of the retained intron from the deficient JAG1 mRNA transcript; and a pharmaceutical acceptable excipient; a method of inducing processing of a deficient JAG1 mRNA transcript to facilitate removal of a retained intron to produce a fully processed JAG1 mRNA transcript that encodes a functional form of a tuberin protein, the method comprising: a) contacting an antisense oligomer to a target cell of a subject; b) hybridizing the antisense oligomer to the deficient JAG1 mRNA transcript, wherein the deficient JAG1 mRNA transcript is capable of encoding the functional form of tuberin protein and comprises at least one retained intron; c) removing the at least one retained intron from the deficient JAG1 mRNA transcript to produce the fully processed JAG1 mRNA transcript that encodes the functional form of tuberin protein; and d) translating the functional form of tuberin protein from the fully processed JAG1 mRNA transcript; a method of treating a subject having a condition caused by a deficient amount or activity of JAG1 protein comprising: administering to the subject an antisense oligomer comprising a nucleotide sequence. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, WO 2015/035091 A1 to Cold Spring Harbor Laboratory discloses a method of treating Alagille syndrome in a subject in need thereof (The present disclosure relates to compositions and methods for inhibiting nonsense-mediated mRNA decay in a gene-specific manner, for example in the treatment of diseases or disorders caused by nonsense mutations, Abstract), by increasing the expression of a target protein or functional RNA by cells of the subject (inhibition of NMD results in an increase in levels of an mRNA... cytoplasmic levels of the PTC-containing mRNA, Pg. 26, Lns. 1-10), wherein the cells have a retained-intron-containing pre-mRNA (RIC pre-mRNA) (mRNA splicing defects that cause retention of an intron (or part of an intron) that alters the reading frame,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2016/066414
--

Pg. 18, Lns. 9-10), the RIC pre-mRNA comprising a retained intron, an exon flanking the 5' splice site, an exon flanking the 3' splice site (The minigenes are constructed in a frame-preserving manner, including an initiation codon, with all internal exons flanked by up to 300 nt of intronic sequences, Pg. 44, Lns. 14-16; ASOs are specific to a region in a nucleic acid (e.g., mRNA) that is 5' to an exon-exon junction in an mRNA, Pg. 16, Lns. 3-4; EJC-protected areas were mapped in vitro to a region between -20 to -24 nt upstream of the 3' end of test exons, Pg. 16, Lns. 17-18), and wherein the RIC pre-mRNA encodes the target protein or functional RNA (eukaryotic cell comprises mRNA encoded by a nucleic acid that contains a disease-causing premature termination codon (PTC), Pg. 22, Lns. 42-44), the method comprising contacting the cells of the subject with an antisense oligomer (ASO) complementary to a targeted portion of the RIC pre-mRNA encoding the target protein or functional RNA (The method involves contacting (a) a eukaryotic cell that comprises (i) a nucleic acid that contains a disease-causing premature termination codon (PTC) or a naturally-occurring premature termination codon (PTC) and (ii) mRNA encoded by the nucleic acid with (b) an antisense oligonucleotide (ASO) specific to and sufficiently complementary to a region of the mRNA, Pg. 1, Lns. 30-32, and Pg. 2, Lns. 1-3), whereby the retained intron is constitutively spliced from the RIC pre-mRNA encoding the target protein or functional RNA (eukaryotic cell comprises mRNA encoded by a nucleic acid that contains a disease-causing premature termination codon (PTC), Pg. 22, Lns. 42-44), thereby increasing the level of mRNA encoding the target protein or functional RNA, and increasing the expression of the target protein or functional RNA in the cells of the subject (The method involves contacting (a) a eukaryotic cell that comprises (i) a nucleic acid that contains a disease-causing premature termination codon (PTC) or a naturally-occurring premature termination codon (PTC) and (ii) mRNA encoded by the nucleic acid with (b) an antisense oligonucleotide (ASO) specific to and sufficiently complementary to a region of the mRNA, Pg. 1, Lns. 30-32, and Pg. 2, Lns. 1-3); a method of increasing expression of a target protein (mRNA splicing defects that cause retention of an intron (or part of an intron) that alters the reading frame, Pg. 18, Lns. 9-10), wherein, by cells having a retained-intron-containing pre-mRNA (RIC pre-mRNA), the RIC pre-mRNA comprising a retained intron, an exon flanking the 5' splice site of the retained intron, an exon flanking the 3' splice site of the retained intron (The minigenes are constructed in a frame-preserving manner, including an initiation codon, with all internal exons flanked by up to 300 nt of intronic sequences, Pg. 44, Lns. 14-16; ASOs are specific to a region in a nucleic acid (e.g., mRNA) that is 5' to an exon-exon junction in an mRNA, Pg. 16, Lns. 3-4; EJC-protected areas were mapped in vitro to a region between -20 to -24 nt upstream of the 3' end of test exons, Pg. 16, Lns. 17-18), and wherein the RIC pre-mRNA encodes a protein, the method comprising contacting the cells with an antisense oligomer (ASO) complementary to a targeted portion of the RIC pre-mRNA encoding a protein (The method involves contacting (a) a eukaryotic cell that comprises (i) a nucleic acid that contains a disease-causing premature termination codon (PTC) or a naturally-occurring premature termination codon (PTC) and (ii) mRNA encoded by the nucleic acid with (b) an antisense oligonucleotide (ASO) specific to and sufficiently complementary to a region of the mRNA, Pg. 1, Lns. 30-32, and Pg. 2, Lns. 1-3), whereby the retained intron is spliced from the RIC pre-mRNA encoding a protein (mRNA splicing defects that cause retention of an intron (or part of an intron) that alters the reading frame, Pg. 18, Lns. 9-10), thereby increasing the level of mRNA encoding the protein (inhibition of NMD results in an increase in levels of an mRNA...cytoplasmic levels of the PTC-containing mRNA, Pg. 26, Lns. 1-10), and increasing the expression of the protein in the cells; an antisense oligomer comprising a sequence; a composition comprising an antisense oligomer for use in a method of increasing expression of a target protein or a functional RNA by cells to treat disease in a subject in need thereof (The method comprises administering to the individual a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an ASO that inhibits NMD of the PTC-containing mRNA, Pg. 5, Lns. 13-15), associated with a deficient protein or deficient functional RNA, wherein the deficient protein or deficient functional RNA is deficient in amount or activity in the subject (As described herein, binding of antisense oligonucleotides (ASOs, e.g., uniform 2'-O-(2-methoxyethyl) (MOE) phosphorothioate-modified ASOs) to transcripts containing PTCs interferes with the deposition of EJCs at exon-exon junctions downstream of PTCs, thereby removing the landmarks that single out PTCs, and inhibiting NMD in a gene-specific manner. Inhibition of NMD increases the availability of PTC-containing transcripts, which increases the efficacy of readthrough drugs., Pg. 7, Lns. 27-32), wherein the antisense oligomer enhances constitutive splicing of a retained intron-containing pre-mRNA (RIC pre-mRNA) encoding the target protein or the functional RNA, wherein the target protein is: (a) the deficient protein (binding of antisense oligonucleotides (ASOs, e.g., uniform 2'-O-(2-methoxyethyl) (MOE) phosphorothioate-modified ASOs) to transcripts containing PTCs interferes with the deposition of EJCs at exon-exon junctions downstream of PTCs, thereby removing the landmarks that single out PTCs, and inhibiting NMD in a gene-specific manner. Inhibition of NMD increases the availability of PTC-containing transcripts, which increases the efficacy of readthrough drugs., Pg. 7, Lns. 27-32); and wherein the functional RNA is: (a) the deficient RNA; or (b) a compensating functional RNA which functionally augments or replaces the deficient functional RNA in the subject (binding of antisense oligonucleotides (ASOs, e.g., uniform 2'-O-(2-methoxyethyl) (MOE) phosphorothioate-modified ASOs) to transcripts containing PTCs interferes with the deposition of EJCs at exon-exon junctions downstream of PTCs, thereby removing the landmarks that single out PTCs, and inhibiting NMD in a gene-specific manner, Pg. 8, Lns. 27-30); wherein the RIC pre-mRNA comprises a retained intron, an exon flanking the 5' splice site and an exon flanking the 3' splice site, and wherein the retained intron is spliced from the RIC pre-mRNA encoding the target protein or the functional RNA (The method involves contacting (a) a eukaryotic cell that comprises (i) a nucleic acid that contains a disease-causing premature termination codon (PTC) or a naturally-occurring premature termination codon (PTC) and (ii) mRNA encoded by the nucleic acid with (b) an antisense oligonucleotide (ASO) specific to and sufficiently complementary to a region of the mRNA, Pg. 1, Lns. 30-32, and Pg. 2, Lns. 1-3), thereby increasing production or activity of the target protein or the functional RNA in the subject (The present disclosure relates to compositions and methods for inhibiting nonsense-mediated mRNA decay in a gene-specific manner, for example in the treatment of diseases or disorders caused by nonsense mutations, Abstract); a composition comprising an antisense oligomer for use in a method of treating a condition associated with a protein in a subject in need thereof (The method comprises administering to the individual a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an ASO that inhibits NMD of the PTC-containing mRNA, Pg. 5, Lns. 13-15), the method comprising the step of increasing expression of a protein by cells of the subject, wherein the cells have a retained-intron-containing pre-mRNA (RIC pre-mRNA) comprising a retained intron, an exon flanking the 5' splice site of the retained intron, an exon flanking the 3' splice site of the retained intron, and wherein the RIC pre-mRNA encodes the protein (The minigenes are constructed in a frame-preserving manner, including an initiation codon, with all internal exons flanked by up to 300 nt of intronic sequences, Pg. 44, Lns. 14-16; ASOs are specific to a region in a nucleic acid (e.g., mRNA) that is 5' to an exon-exon junction in an mRNA, Pg. 16, Lns. 3-4; EJC-protected areas were mapped in vitro to a region between -20 to -24 nt upstream of the 3' end of test exons, Pg. 16, Lns. 17-18), the method comprising contacting the cells with the antisense oligomer, whereby the retained intron is constitutively spliced from the RIC pre-mRNA transcripts encoding a protein, thereby increasing the level of mRNA encoding a, and increasing the expression of a protein, in the cells of the subject (The method involves contacting (a) a eukaryotic cell that comprises (i) a nucleic acid that contains a disease-causing premature termination codon (PTC) or a naturally-occurring premature termination codon (PTC) and (ii) mRNA encoded by the nucleic acid with (b) an antisense oligonucleotide (ASO) specific to and sufficiently complementary to a region of the mRNA, Pg. 1, Lns. 30-32, and Pg. 2, Lns. 1-3); a pharmaceutical composition comprising: an antisense oligomer that hybridizes to a target sequence of a deficient mRNA transcript (The method comprises administering to the individual a

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/086414

pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an ASO that inhibits NMD of the PTC-containing mRNA, Pg. 5, Lns. 13-15), wherein the deficient mRNA transcript comprises a retained intron, wherein the antisense oligomer induces splicing out of the retained intron from the deficient mRNA transcript (The method comprises administering to the individual a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an ASO that inhibits NMD of the PTC-containing mRNA, Pg. 5, Lns. 13-15); and a pharmaceutical acceptable excipient; a method of inducing processing of a deficient mRNA transcript to facilitate removal of a retained intron to produce a fully processed mRNA transcript that encodes a functional form of a protein (The compositions comprising ASO(s) and optionally additional drug(s) can be mixed with a pharmaceutically acceptable carrier, either taken alone or in combination with the one or more additional therapeutic agents described above, Pg. 34, Lns. 23-25), the method comprising: a) contacting an antisense oligomer to a target cell of a subject (said method comprising contacting said eukaryotic cell with said ASO, wherein the ASO hybridizes to a region of the mRNA, Pg. 22, Lns. 45-46); b) hybridizing the antisense oligomer to the deficient mRNA transcript (wherein the ASO hybridizes to a region of the mRNA, Pg. 22, Lns. 45-46), wherein the deficient mRNA transcript is capable of encoding the functional form of a protein (mRNA splicing defects that cause retention of an intron (or part of an intron) that alters the reading frame, Pg. 18, Lns. 9-10) and comprises at least one retained intron; c) removing the at least one retained intron from the deficient mRNA transcript to produce the fully processed mRNA transcript that encodes the functional form of a protein (binding of antisense oligonucleotides (ASOs, e.g., uniform 2'-O-(2-methoxyethyl) (MOE) phosphorothioate-modified ASOs) to transcripts containing PTCs interferes with the deposition of EJCs at exon-exon junctions downstream of PTCs, thereby removing the landmarks that single out PTCs, and inhibiting NMD in a gene-specific manner, Pg. 8, Lns. 27-30); and d) translating the functional form of the protein from the fully processed mRNA transcript (mRNA expressed from such a gene, thereby increasing the levels of available mRNA and resulting in increased levels of the functional truncated protein, Pg. 28, Lns. 10-12); a method of treating a subject having a condition caused by a deficient amount or activity of the protein comprising: administering to the subject an antisense oligomer comprising a nucleotide sequence (The method comprises administering to the individual a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an ASO that inhibits NMD of the PTC-containing mRNA, Pg. 5, Lns. 13-15).

"Alagille Syndrome Mimicking Biliary Atresia in Early Infancy" to Dedic et al. discloses a target protein is JAG1; treat Alagille syndrome (Mutational analysis of JAG1 was performed in the remaining 72 individuals with biliary atresia treated by the Kasai procedure and in 4 patients, Pg. 2, third paragraph; three novel mutations were found in three index subjects and one sibling with typical features of Alagille syndrome at the age of six months, Pg. 3, fourth paragraph; JAG1 mRNA, whereby the retained intron is constitutively spliced (Location in the spliced mRNA and protein sequence of all 8 mutations we have found in our patients, Pg. 2, bottom of page; Mutations in JAG1 have also been found in a subset of patients with biliary atresia, Pg. 1, second paragraph).

"New roles for Notch in tuberous sclerosis" to Warren Pear discloses a tuberin protein (the Notch ligand Jagged1 was upregulated in the TSC-deficient MEF cells, Pg. 85, right column, first paragraph; TSC is caused by mutations that inactivate either the TSC1 or TSC2 genes, also known as hamartin and tuberin, Pg. 84, left-hand column, middle page).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 07H 21/02 (2006.01)	C 07H 21/02	C S P
A 61P 43/00 (2006.01)	A 61P 43/00	1 0 5
C 12N 15/113 (2010.01)	C 12N 15/113	1 4 0 Z
	C 12N 15/113	Z N A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,C1,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,A0,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(72)発明者 アズナレス, イザベル

アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 ケンブリッジ マガジン・ストリート 55
アパートメント 12エー

(72)発明者 ナッシュ, ヒュー エム.

アメリカ合衆国 02421 マサチューセッツ州 レキシントン ワシントン・ストリート 4

F ターム(参考) 4C057 BB02 DD03 MM02

4C084 AA13 MA66 NA14 ZA941 ZB211 ZC511
4C086 AA01 AA02 EA16 FA03 MA02 MA05 MA66 NA14 ZA94 ZB21
ZC51