

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-525837
(P2024-525837A)

(43)公表日 令和6年7月12日(2024.7.12)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	4 C 0 8 6	
C 1 2 N	15/113(2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02		
A 6 1 P	25/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/02		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全22頁) 最終頁に続く

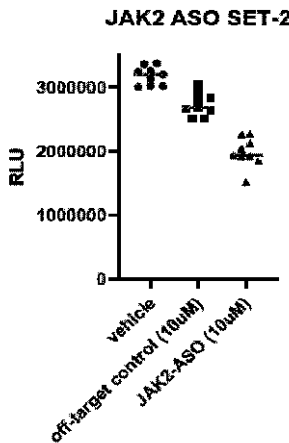
(21)出願番号	特願2024-502210(P2024-502210)	(71)出願人	313006588
(86)(22)出願日	令和4年7月13日(2022.7.13)	バンダ・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド VANDA PHARMACEUTICALS INC. アメリカ合衆国 2 0 0 3 7 ワシントン・ディストリクト・オブ・コロンビア、スウィート 3 0 0 イー、ノースウエスト・ペンシルバニア・アベニュー 2 2 0 0 番 110001519 弁理士法人太陽国際特許事務所 (72)発明者 ブルズィホドゼン、バルトロミエイ アメリカ合衆国 2 0 0 3 7 ワシントンワシントン、2 2 ストリート ノースウエスト 1 4 1 4 4 最終頁に続く	
(85)翻訳文提出日	令和6年2月20日(2024.2.20)		
(86)国際出願番号	PCT/US2022/073668		
(87)国際公開番号	WO2023/288240		
(87)国際公開日	令和5年1月19日(2023.1.19)		
(31)優先権主張番号	63/222,336		
(32)優先日	令和3年7月15日(2021.7.15)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	63/224,362		
(32)優先日	令和3年7月21日(2021.7.21)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 アンチセンスオリゴヌクレオチド（A S O）遺伝子阻害及び処置

(57)【要約】

本発明の実施形態は一般にアンチセンスオリゴヌクレオチド（A S O）に関し、より詳細には、A S Oを使用してタンパク質合成を調節するための組成物及び方法に関する。ある実施形態では、本発明は、骨髓異形成症候群（M D S）と診断された患者を処置する方法であって、かかる疾患を処置するのに有効な量の J A K 2（A S O－T－J A K 2）化合物をコードする核酸分子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド（A S O）を患者に投与することを含む方法を提供する。

FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

骨髓異形成症候群（MDS）と診断された患者を処置する方法であって、前記患者に、MDS 疾患を処置するのに有効な量の ASO-T-JAK2 化合物を投与することを含む方法。

【請求項 2】

前記 ASO-T-JAK2 化合物が、配列番号 2、配列番号 3、又はその両方を標的とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 ASO-T-JAK2 化合物が、配列番号 4 又は配列番号 5 を含むヌクレオチド配列を含む、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記 ASO-T-JAK2 化合物の前記量が、前記患者における JAK2 の発現を阻害するのに十分な量である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

真性赤血球増加症（PV）と診断された患者を処置する方法であって、PV 疾患を処置するのに有効な量の ASO-T-JAK2 化合物を前記患者に投与することを含む方法。

【請求項 6】

前記 ASO-T-JAK2 化合物が、配列番号 2、配列番号 3、又はその両方を標的とする、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記 ASO-T-JAK2 化合物が、配列番号 4 又は配列番号 5 を含むヌクレオチド配列を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 ASO-T-JAK2 化合物の前記量が、前記患者における JAK2 の発現を阻害するのに十分な量である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

個人（individual）における JAK2 遺伝子の発現を阻害する方法であって、前記個人における JAK2 発現を阻害するのに有効な量の ASO-T-JAK2 化合物を前記個人に投与する工程を含む、方法。

30

【請求項 10】

前記 ASO-T-JAK2 化合物が、配列番号 2、配列番号 3、又はその両方を標的とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 ASO-T-JAK2 化合物が、配列番号 4 又は配列番号 5 を含むヌクレオチド配列を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

JAK2 をコードする核酸分子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）。

【請求項 13】

前記 ASO が、配列番号 2、配列番号 3、又はその両方を標的とする、請求項 12 に記載の ASO。

40

【請求項 14】

前記 ASO が、配列番号 4 及び配列番号 5 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 13 に記載の ASO。

【請求項 15】

請求項 12 に記載の ASO；及び

医薬的に許容される希釈剤、担体、アジュバント、又はそれらの組み合わせを含む医薬組成物。

【請求項 16】

50

滅菌非経口剤形をさらに含む、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

シャルコー・マリー・トゥース病 2 型 (CMT2) と診断された患者を処置する方法であって、CMT2 疾患を処置するのに有効な量の ASO-T-IGHMBP2 化合物を前記患者に投与することを含む、方法。

【請求項 18】

前記患者がシャルコー・マリー・トゥース病 2 型 S (CMT2S) と診断されている、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 ASO-T-IGHMBP2 化合物が配列番号 7 を標的とする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 ASO-T-IGHMBP2 化合物が、配列番号 9 を含むヌクレオチド配列を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 ASO-T-IGHMBP2 化合物が、配列番号 8 を含むヌクレオチド配列を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記 ASO-T-IGHMBP2 化合物が、配列番号 10、配列番号 11、及び配列番号 12 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記 ASO-T-IGHMBP2 化合物が、配列番号 15 内の 13～35 ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 24】

IGHMBP2 遺伝子の C31401A 変異を有する個人 (individual) における前記の変異した IGHMBP2 遺伝子の発現を阻害する方法であって、前記個人における変異体 IGHMBP2 遺伝子の発現を阻害するのに有効な量の ASO-T-IGHMBP2 化合物を前記個人に投与する工程を含む、方法。

【請求項 25】

前記 ASO-T-IGHMBP2 化合物が配列番号 7 を標的とする、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 ASO-T-IGHMBP2 化合物が、配列番号 9 を含むヌクレオチド配列を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記 ASO-T-IGHMBP2 化合物が、配列番号 8 を含むヌクレオチド配列を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 ASO-T-IGHMBP2 化合物が、配列番号 10、配列番号 11、及び配列番号 12 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

前記 ASO-T-IGHMBP2 化合物が、配列番号 15 中の 13～35 ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

変異 IGHMBP2 遺伝子をコードする核酸分子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)。

【請求項 31】

前記 ASO が配列番号 7 を標的とする、請求項 30 に記載の ASO。

【請求項 32】

配列番号 9 を含むヌクレオチド配列を含む、請求項 31 に記載の ASO。

10

20

30

40

50

【請求項 33】

配列番号 8 を含むヌクレオチド配列を含む、請求項 32 に記載の A S O。

【請求項 34】

配列番号 10、配列番号 611 及び配列番号 12 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 32 に記載の A S O。

【請求項 35】

配列番号 15 中の 13～35ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む、請求項 32 に記載の A S O。

【請求項 36】

請求項 30 に記載の A S O；及び

医薬的に許容される希釈剤、担体、アジュバント、又はそれらの組み合わせを含む医薬組成物。

【請求項 37】

滅菌非経口剤形をさらに含む、請求項 36 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は 2021 年 7 月 15 日に出願された同時係属中の米国仮特許出願第 63 / 222, 336 号及び 2021 年 7 月 21 日に出願された米国仮特許出願第 63 / 224, 362 号の優先権を主張し、その各々は、完全に記載されているのと同様に本明細書に組み込まれる。

配列表

2022 年 6 月 19 日に作成され 63 kb を含む電子ファイル「\text_VAND-224-PC.T.xml」に含まれる配列表は、本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

本発明は特定の新規なアンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O) に関し、より詳細には、その医薬組成物、及び A S O を使用してタンパク質合成を調節することが治療的価値を有する特定の疾患又は状態を処置するための方法に関する。より詳細には、本発明の態様は、真性赤血球増加症 (P V) 及び骨髓異形成症候群 (M D S)、ならびにシャルコー・マリー・トゥース病 2 型 (C M T 2) 疾患などの公知の障害の処置に関する。

【0003】

P V は、赤血球過形成、骨髓性白血球増加症、血小板増加症、及び脾腫を特徴とする骨髓増殖性疾患である。P V と診断された個人 (individual) のほとんどは、J A K 2 遺伝子の 617 位にバリンからフェニルアラニンへの変異 (V 617 F) を有する。

【0004】

M D S は、しばしば貧血をもたらす、無効造血 (ineffective hematopoiesis) を特徴とするクローン性血液幹細胞障害の一群である。M D S のいくつかの症例は、同じ J A K 2 遺伝子の V 617 F 突然変異、特に血小板数の増加に関連している。

【0005】

J A K 2 遺伝子は、細胞増殖、発生、分化、及びヒストン修飾、ならびにサイトカイン及び増殖因子のシグナル伝達に関与する非受容体チロシンキナーゼをコードする。

【0006】

遺伝性の運動神経及び感覚神経の障害としても知られるシャルコー・マリー・トゥース病 (C M T) は、末梢神経及び筋肉制御に関与する神経に損傷を引き起こす。症状は進行性であり、しばしば足及び下肢から始まり、次いで指、手、及び腕に進む。

【0007】

C M T のほぼ全ての症例は遺伝する。40 個を超える遺伝子が C M T と関連している。いくつかの遺伝子は 2 つ以上の形態の C M T と関連し、いくつかの形態の C M T は、2 個

10

20

30

40

50

以上の遺伝子と関連する。したがって、1人の個人は、2つ以上の遺伝性突然変異の結果として、2つ以上の形態のCMTに罹患しうる。全CMT症例のうち半数超は、第17染色体上のPMP22遺伝子の重複によって引き起こされる。その他の形態のCMTは、X連鎖変異によって引き起こされる。

【0008】

CMT2型(CMT2)は、神経軸索に影響を及ぼすCMTのあまり一般的ではないサブタイプである。CMT2のほとんどの形態は常染色体優性パターンで遺伝するが、CMT2S型(CMT2S)を含むいくつかの形態は常染色体劣性パターンで遺伝する。したがって、CMT2Sに付随する症状は、典型的にはCMT2の常染色体優性型よりも重症度が低い。CMT2Sに関連する変異は第11染色体上のIGHMBP2(免疫グロブリンμDNA結合タンパク質2)遺伝子の変異であり、異常なRNAプロセッシング及び軸索ニューロパシーをもたらす。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

「アンチセンスオリゴヌクレオチド」又は「ASO」は、mRNA分子を不活性化することを含む、遺伝子発現が阻害され得るような様式で、標的RNA配列にハイブリダイズする、合成マルチヌクレオチドRNA化合物を指す。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、MDSと診断された患者を処置する方法であって、MDSを処置するのに有効な量のASO-T-JAK2化合物を前記患者に投与することを含む方法を提供する。本発明によれば、ASO-T-JAK2化合物は、JAK2をコードする核酸分子を標的とする任意のアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を指す。さらに、MDSを処置するのに有効なASO-T-JAK2化合物の量は、患者におけるJAK2タンパク質発現を阻害するのに有効な量の化合物の投与を必要とする。

20

【0011】

上記のように、「ASO-T-JAK2」という用語は、遺伝子JAK2をコードする核酸分子を標的とするASOを指す。「核酸分子」という用語は、ポリヌクレオチド化合物、すなわちRNAへの言及である。「アンチセンスオリゴヌクレオチド」又は「ASO」は、mRNA化合物を不活性化することを含む、遺伝子発現が阻害され得るような様式で、標的RNAにハイブリダイズする、合成マルチヌクレオチドDNA化合物を指す。例示的なASO-T-JAK2化合物を本明細書に開示する(配列番号2及び配列番号3をそれぞれ標的とする配列番号4及び配列番号5)。さらなるASO-T-JAK2化合物は、標的RNA配列に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを開発するための当技術分野で公知の方法によって、同定及び調製することができる。

30

【0012】

「ASO-T-IGHMBP2」という用語は、IGHMBP2遺伝子をコードする核酸分子を標的とするASOを指す。「核酸分子」という用語は、ポリヌクレオチド化合物、すなわちRNAへの言及である。例示的なASO-T-IGHMBP2化合物を開示し、以下に詳細に記載する。さらなるASO-T-IGHMBP2化合物は、標的RNA配列に特異的なASOを開発するための当技術分野で公知の方法によって、同定及び調製することができる。

40

【0013】

上記で言及した「患者」は、疾患又は障害、特にPV又はMDS又はCMT2Sと診断された、それに罹患している、又はそれを発症するリスクがある、又はそれに罹患している、又はそれに罹患している個人を指す。

【0014】

別の実施形態では、本発明は、PVを処置するのに有効な量のASO-T-JAK2化合物を、PVと診断された患者に投与することを含む、前記患者を処置する方法を提供す

50

る。P Vを処置するのに有効なA S O-T-J A K 2化合物の量は、患者におけるJ A K 2タンパク質発現を阻害するのに有効な量である。

【0015】

さらに別の実施形態では、本発明は、個人におけるJ A K 2遺伝子の発現を阻害する方法であって、かかる阻害を達成するのに有効な量のA S O-T-J A K 2化合物を個人に投与することを含む方法を提供する。

【0016】

さらに別の実施形態において、本発明は、新規なA S O-T-J A K 2化合物を提供する。上記のように、かかる化合物には配列番号4及び配列番号5のオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。いったんヌクレオチド塩基配列が決定されればA S Oを調製する方法が、当技術分野に多数存在する。A S OがRNA結合でタンパク質発現を阻害する遺伝子の遺伝子配列を同定するためにも同様に、A S O-T-J A K 2化合物に係る適切な塩基配列の決定が、当技術分野で公知の戦略によって達成される。

10

【0017】

A S O-T-J A K 2の投与による個々の患者の処置では、用量及び投与計画を容易に決定することができる。A S Oの承認された投与例は、ヌシネルセン（Spinrazaとして販売される）、ミボメルセン（Kynamroとして販売される）、ホミビルセン（Vitraveneとして販売される）など、当業界では数多く知られている。特定の状況においては、バイオアベイラビリティ、作用期間、又は他の治療効果を最適化するために、誘導体化された又は修飾された形態のA S O-T-J A K 2を投与することが有利であり得る。このような修飾／誘導体化のための方法は、当技術分野で公知である。一般に、Drug Delivery Trends in Clinical Trials and Translational Medicine: challenges and opportunities in delivery of nucleic acid-based therapeutics、J Pharm Sci. (2011 1月; 100 (1): 38-52を参照されたい。本発明の目的のためには、A S Oは静脈内投与されるが、経口投与を含む他の投与経路も可能である。かかる代替投与経路は、本明細書に記載のA S Oに適用可能である。

20

【0018】

したがって、本発明のさらなる態様は、処置対象の患者にA S O-T-J A K 2化合物を投与するために使用される医薬組成物である。これらには、薬剤の静脈内投与のために従来使用されているタイプの無菌非経口剤形が含まれる。かかる医薬組成物は、必要とされ得るエキシピエント（excipients）を含有する。これらは、完成剤形の製造のための当技術分野において公知であるように、1つ以上の希釈剤、担体、アジュバント、又はそれらの組み合わせを含む。うる。

30

【0019】

一実施形態では、本発明は、シャルコー・マリー・トゥース病2型（CMT2）と診断された患者を処置する方法であって、前記患者に、かかる疾患を処置するのに有効な量のA S O-T-I G H M B P 2化合物を投与することを含む方法を提供する。

【0020】

別の実施形態では、本発明は、I G H M B P 2遺伝子のC31401A変異を保有する個人における変異I G H M B P 2遺伝子の発現を阻害する方法であって、個人における変異I G H M B P 2遺伝子の発現を阻害するのに有効な量のA S O-T-I G H M B P 2化合物を個人に投与することを含む方法を提供する。

40

【0021】

さらに別の実施形態では、本発明は、変異I G H M B P 2遺伝子をコードする核酸分子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド（A S O）を提供する。かかるA S Oは、医薬的に許容される希釈剤、担体、アジュバント、又はそれらの組み合わせと組み合わせて、医薬組成物中に含まれ得る。

【0022】

いったんA S Oのヌクレオチド塩基配列が決定されればそれを調製するための多くの方法が、当技術分野に存在する。A S OがRNA結合でタンパク質発現を阻害する遺伝子の

50

遺伝子配列を同定するためにも同様に、A S O - T I G H M B P 2 化合物に係る適切な塩基配列の決定が、当技術分野で公知の戦略によって達成される。

【0023】

A S O - T I G H M B P 2 の投与による個々の患者の処置では、用量及び投与計画を容易に決定することができる。A S O の承認された投与の例は、ヌシネルセン (S p i n r a z a として販売される)、ミボメルセン (K y n a m r o として販売される)、ホミビルセン (V i t r a v e n e として販売される) など、当業界では数多く知られている。特定の状況においては、バイオアベイラビリティ、作用期間、又は他の治療効果を最適化するために、誘導体化又は修飾形態で A S O - T I G H M B P 2 を投与することが有利であり得る。このような修飾／誘導体化のための方法は、当技術分野で公知である。一般に、Drug Delivery Trends in Clinical Trials and Translational Medicine: challenges and opportunities in delivery of nucleic acid-based therapeutics、J Pharm Sci. (2011 1月; 100 (1): 38-52を参照されたい。本発明の目的のためには、A S O は静脈内投与されるが、経口投与を含む他の投与経路も可能である。かかる代替投与経路は、本明細書に記載の A S O に適用可能である。

10

【0024】

したがって、本発明のさらなる態様は、処置対象の患者に A S O - T I G H M B P 2 化合物を投与するために使用される医薬組成物である。これらには、薬剤の静脈内投与のために従来使用されているタイプの無菌非経口剤形が含まれる。かかる医薬組成物は、必要とされ得るエキシピエントを含有する。これらは、完成剤形の製造のための当技術分野において公知であるように、1つ以上の希釈剤、担体、アジュバント、又はそれらの組み合わせを含みうる。

20

【0025】

本発明のこれら及び他の特徴は、本発明の様々な実施形態を示す添付図面と併せて、本発明の様々な態様の以下の詳細な説明からより容易に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は、A S O 処理が J A K 2 発現を阻害し細胞生存率を減少させる、生物発光アッセイの結果を示す。

【図2A】図2Aは、本発明の実施形態による A S O で処理された S E T - 2 細胞の蛍光画像を示す。

30

【図2B】図2Bは、本発明の実施形態による A S O で処理された S E T - 2 細胞の明視野画像を示す。

【図3A】図3Aは、本発明の実施形態による A S O で処理された H E L 細胞の蛍光画像を示す。

【図3B】図3Bは、本発明の実施形態による A S O で処理された H E L 細胞の明視野画像を示す。

【図4A】図4Aは、本発明の実施形態による A S O で処理された S E T - 2 細胞の蛍光画像を示す。

【図4B】図4Bは、本発明の実施形態による A S O で処理された S E T - 2 細胞の明視野画像を示す。

40

【図5A】図5Aは、本発明の実施形態による A S O で処理された H E L 細胞の蛍光画像を示す。

【図5B】図5Bは、本発明の実施形態による A S O で処理された H E L 細胞の明視野画像を示す。本発明の図面は正確な縮尺ではないことに留意されたい。図面は本発明の典型的な態様のみを示すことを意図しており、したがって、本発明の範囲を限定するものと見なされるべきではない。図面において、類似の番号は、図面間で類似の要素を表す。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明は、合成 A S O による結合を受けやすい J A K 2 プレ m R N A (pre-mRNA)

50

中の標的配列を提供する。そのように結合すると、JAK2遺伝子の発現が阻害される。MDS及びPVと診断された患者において、JAK2発現のかかる阻害は、障害の有効な処置方法を提供する。

【0028】

上記のように、MDS及びPVは両方とも、JAK2タンパク質のV617F変異と関連している。野生型JAK2タンパク質配列は、617位のアミノ酸がバリンである配列番号1に示される。

【0029】

本発明の一態様では、JAK2プレmRNA分子内の標的領域がASOと結合した場合、JAK2タンパク質の合成を阻害することができることが同定される。この領域は19bp配列

【0030】

【化1】

TTTCCTTAGTCTTTCTTTG (配列番号2)

【0031】

及び、より短い16bp配列

【0032】

【化2】

CCTTAGTCTTTCTTTG (配列番号3)

【0033】

を含む。

【0034】

相補的なASO配列はそれぞれ

【0035】

【化3】

5'-CAAAGAAAGACUAAGGAAA-3' (配列番号4)

【0036】

及び

【0037】

【化4】

5'-CAAAGAAAGACUAAGG-3' (配列番号5)

【0038】

である。

【0039】

これらの配列はそれぞれ、JAK2プレmRNAのイントロンとエクソンとを架橋する。これらの配列を含むASOがJAK2プレmRNAに結合すると、プレmRNAの成熟mRNAへのプロセッシングが妨げられ、JAK2タンパク質の合成が同様に妨げられる。

【0040】

JAK2プレmRNAに結合してJAK2タンパク質合成を阻害する配列番号4及び／又は配列番号5を有するASOの有効性を試験するために、3つのヒト細胞株（SET2、HEL、CMK）をこれらのASOのそれぞれとインキュベートし、シクロヘキシミドで処理する。48時間インキュベートした後、処理した細胞株を回収し、CellTiter-Glo^(R)（CTG）分析及びRNA抽出に供する。細胞株及び培養培地に関するデータを以下の表1に示す。

【0041】

【表 1】

細胞株	生育期間	培地
SET-2	60～80時間	80%RPMI 1640+20%熱不活化FBS
HEL	36時間	90%RPMI 1640+10%熱不活化FBS
CMK	40～50時間	80%RPMI 1640+20%熱不活化FBS

【0042】

細胞を増殖期間中に回収し、Cellometer K2を用いて計数する。100万個の細胞を、6ウェルプレートのそれぞれのウェルにおいて、上掲の培地中でインキュベートし、5%CO₂を含む37℃の加湿インキュベーター中でインキュベートする。

【0043】

24時間後、培地を交換し、ASOを添加し、インキュベーションを同じ条件下でさらに24時間続ける。次いで、シクロヘキシミドを最終濃度0.1mg/mLになるように添加する。シクロヘキシミドの添加の24時間後、培地及び細胞を15mLのコニカルチューブ中で合わせ、50μLの一定分量の細胞を、CTGアッセイ用の96ウェルアッセイプレートに添加する。発光は、BioTek Synergy neo2 Multi-mode Readerを用いて記録する。残りの細胞を4℃で遠心して、トリゾール試薬によるRNA抽出のための細胞ペレットを収集する。

【0044】

図1は、SET-2細胞株についての上述のCTGアッセイの結果を示す。第1列は、ASOを含まないアッセイビヒクルの結果である。平均相対発光単位(RLU)は3,000,000を超える。RLUは、アッセイウェル中の生存細胞の数に比例する。

【0045】

第2列はオフターゲット対照ASO（すなわち、JAK2プレmRNA又はmRNAを標的としていないASO）が使用される場合のアッセイの結果を示す。平均RLUはビヒクルと比較して低減されるが、依然として2,500,000を超える。

【0046】

図1の第3列は、配列番号4又は配列番号5を含むASOを添加した場合のアッセイの結果を示す。ここで、平均RLUは2,000,000未満に減少し、いくつかのサンプルでは約1,500,000に減少する。これは、ビヒクルと比較しての、RLUの有意な減少、したがって細胞生存率の有意な減少を構成する。

【0047】

これらの結果は、JAK2遺伝子の発現を定量するための次世代シーケンシング(NGS)を使用するRNAシーケンシングによって確認される。図2A及び図2Bは、それぞれ、配列番号4又は配列番号5を含むASOで処理されたSET-2細胞のアッセイウェルの蛍光(GFP)画像及び明視野画像を示す。図3A及び図3Bは、同じASOで処理したHEL細胞の蛍光画像及び明視野画像をそれぞれ示す。それぞれの場合において、蛍光は、未処理細胞におけるものよりも低く、配列番号4又は配列番号5を含むASOと共にインキュベートされた試料中における成熟JAK2 mRNAの減少を実証している。

【0048】

したがって、本発明の実施形態はJAK2の発現を阻害するために、配列番号4、配列番号5、又はその両方を含むASOを個人に投与すること；MDS、PV、又はその両方の処置としてのかかる投与；配列番号2、配列番号3、又はその両方を標的とするASO；配列番号4又は配列番号5を含むヌクレオチド配列を有するASO；及び、医薬的に許容される希釈剤、担体、アジュバント、又はその組み合わせと組み合わせてかかるASOを含む組成物を含む。

【0049】

他の態様では、本発明は、合成ASOによる結合を受けやすい変異体IGHMBP2プ

レ m R N A 中の標的配列を提供する。そのように結合すると、変異体 I G H M B P 2 遺伝子の発現が阻害される。突然変異についてヘテロ接合性である C M T 2 S と診断された患者において、かかる阻害は、I G H M B P 2 タンパク質の「レスキュー」又は正常な機能への復帰をもたらす可能性がある。

【0050】

野生型 I G H M B P 2 遺伝子の完全な配列を、添付の配列表に配列番号 6 として示す。3 1 4 0 1 位のヌクレオチドはシトシンである。C M T 2 S に関連する変異では、このヌクレオチドはアデニンである。

【0051】

本発明の一態様では、得られる変異体 I G H M B P 2 プレ m R N A 分子内の標的領域が、A S O と結合した場合に、変異体 I G H M B P 2 タンパク質の合成を阻害することができることが同定される。変異体 I G H M B P 2 遺伝子内の当該領域は、C 3 1 4 0 1 A 変異を含む 1 9 b p 配列

【0052】

【化 5】

CACTTCCACAGGGGGAAGA (配列番号 7)

【0053】

を含む。

相補的 A S O 配列は

【0054】

【化 6】

UCUUCUUUUUGUGGAAGUG (配列番号 8)

【0055】

である。

【0056】

配列番号 3 を含む A S O は変異体 I G H M B P 2 プレ m R N A のイントロン及びエクソンを架橋し、プレ m R N A に結合すると、変異体 I G H M B P 2 タンパク質の合成を妨げる。

【0057】

変異体 I G H M B P 2 プレ m R N A への結合及び変異体 I G H M B P 2 タンパク質合成の阻害における配列番号 8 を含む A S O の有効性を試験するために、C M T 2 S を有する患者の線維芽細胞株を、1 0 % F B S を補充した R P M I 1 6 4 0 培地中で、配列番号 8 を含む A S O と共にインキュベートし、シクロヘキシミドで処理する。4 8 時間のインキュベーション後、処理された細胞を回収し、R N A 抽出及びウエスタンブロット分析について I G H M B P 2 タンパク質発現を決定する。

【0058】

より具体的には、1 0 0 万個の細胞を、5 % 二酸化炭素を含む 3 7 °C の加湿インキュベーターにおいて、上記の R P M I 1 6 4 0 培地 2 m L 中でインキュベートする。2 4 時間後、培地を交換し、A S O を添加し、インキュベーションをさらに 2 4 時間続ける。次いで、シクロヘキシミドを最終濃度 0 . 1 m g / m L になるように添加する。シクロヘキシミド添加の 2 4 時間後、培地及び細胞を 1 5 m L のコニカルチューブ中で合わせ、回転させて、トリゾール試薬による R N A 抽出のための細胞ペレットを収集する。R N A 抽出は例えば、Q i a g e n の R N e a s y M i n i K i t を用いて行われる。次いで、ウエスタンブロット分析を実施して、試料中の野生型タンパク質及び変異体タンパク質の濃度を決定する。

【0059】

図 4 A 及び図 4 B は、配列番号 8 を含む A S O で処理した後の S E T - 2 細胞の蛍光顕微鏡写真及び明視野顕微鏡写真をそれぞれ示しており、これらの A S O が細胞膜に浸透す

10

20

30

40

50

る能力を実証する。

【0060】

図5A及び図5Bは、配列番号8を含むASOで処理した後のHEL細胞の同様の蛍光顕微鏡写真及び明視野顕微鏡写真をそれぞれ示す。これらの結果もまた、かかるASOが細胞膜に浸透する能力を実証する。

【0061】

配列番号8を含むASO以外の又は配列番号8を含むASOに加えてのASOも、本発明を実施するのに有用であり得る。本出願人は、ASOの変異体IGHMBP2プレmRNAへの結合を識別することを可能にするのに十分な特異性を有する配列の基礎を提供する、配列番号8内の「コア」11ヌクレオチド配列を同定した。当業者が理解するように、本明細書に記載されるものなどの効率的かつ有効なASO療法は、ASOの標的配列への結合を確実に識別するのに十分な長さを有するASOの使用を必要とする。長さが13ヌクレオチド～35ヌクレオチドである配列を含み、配列番号9のコア配列を含むASOが、本発明の実施形態を実施する際に使用するのに十分な長さを有するものである。

10

【0062】

【化7】

5'-CCCCCUGUGGA-3' (配列番号9)

【0063】

したがって、配列番号4を含み、2～24個の隣接するヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を有するASOは、本発明の実施形態を実施するのに有用である。このようなヌクレオチド配列としては、例えば、配列番号10、11、及び配列番号12の13ヌクレオチド配列と同程度に短い配列が挙げられる。

20

【0064】

【化8】

5'-CCCCCUGUGGAAG-3' (配列番号10)

5'-UCCCCCUGUGGAA-3' (配列番号11)

5'-UUCCCCCUGUGGA-3' (配列番号12)

30

【0065】

このようなヌクレオチド配列には、例えば、35ヌクレオチド配列の長さのあるような配列番号13及び配列番号14の配列も含まれる。

【0066】

【化9】

5'-GAAGAAAUCAAUCUCCCCCUGUGGAAGUGAGGGGC-3'

(配列番号13)

40

5'-GAAAUCAAUCUCCCCCUGUGGAAGUGAGGGGCCAG-3'

(配列番号14)

【0067】

より一般的には、13ヌクレオチド～35ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を有するASOは配列番号9のコア配列を含み、15個もの上流ヌクレオチド及び／又は12個もの下流ヌクレオチドを有する。ASO「配列ウィンドウ」を配列番号15に示す。

【0068】

50

【化 1 0】
5'-GAAGAAAUCAAUUCUUCCCCCUGUGGAAGUGAGGGGCCAG-3'

(配列番号 1 5)

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明らかに即していない限り、複数形も含むことが意図される。用語「含む (comprises)」及び／又は「含んでいる (comprising)」は本明細書で使用される場合、述べられた特徴、整数、ステップ、動作、要素、及び／又は構成要素の存在を指定するが、1つ又は複数の他の特徴、整数、ステップ、動作、要素、構成要素、及び／又はそれらの群の存在又は追加を排除しないことはさらに理解されよう。

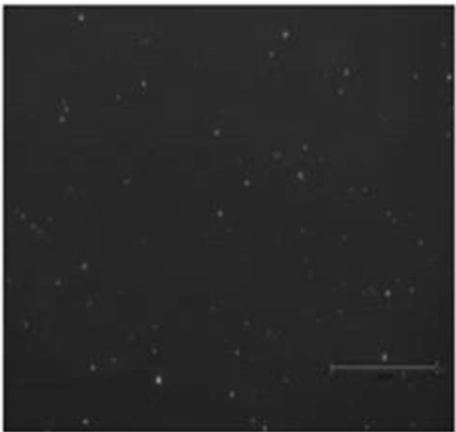
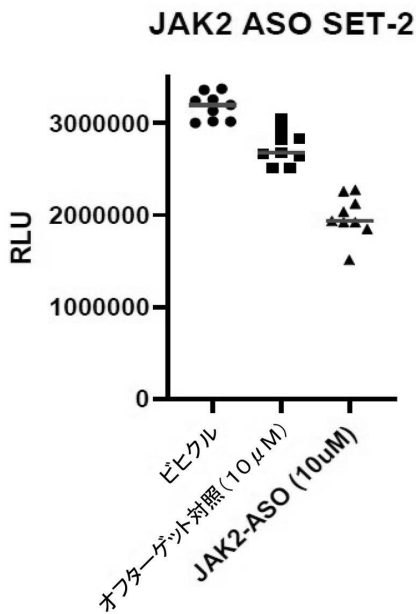
【 0 0 7 0 】

本明細書は最良の形態を含む本発明を開示するための例を使用し、また、当業者が、任意のデバイス又はシステムを作製及び使用すること、ならびに任意の関連する又は組み込まれた方法を実行することを含む、本発明を実施することを可能にする。本発明の特許可能な範囲は、特許請求の範囲によって定義され、当業者に想起される他の例を含みうる。かかる他の例は、それらが特許請求の範囲の文言と異なる構造要素を有する場合、又はそれらが特許請求の範囲の文言と実質的に相違しない均等の構造要素を含む場合、特許請求の範囲内にいることが意図される。

【 図 面 】

【 図 1 】

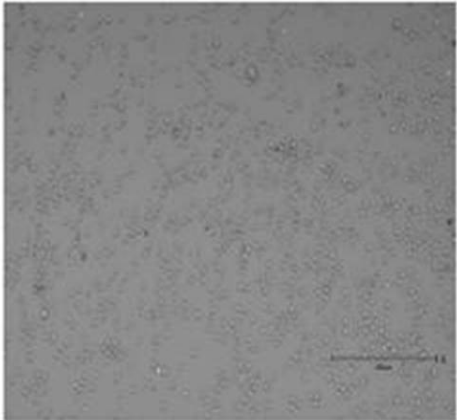
【 図 2 A 】



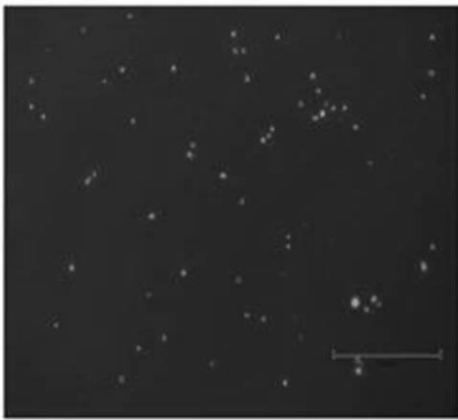
40

50

【図 2 B】

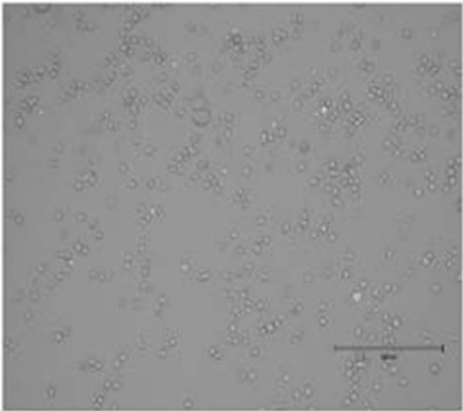


【図 3 A】



10

【図 3 B】



【図 4 A】



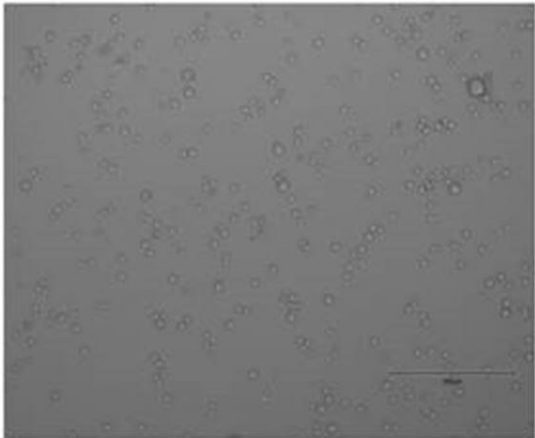
20

30

40

50

【図 4 B】

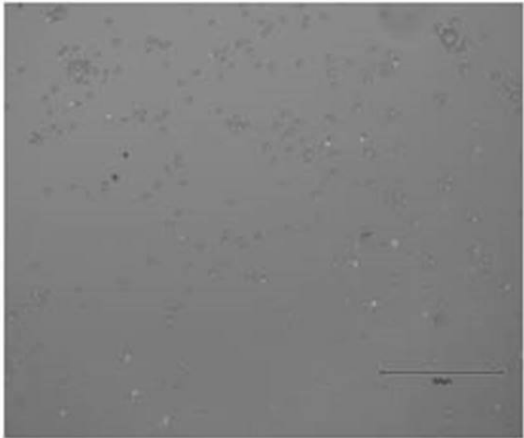


【図 5 A】



10

【図 5 B】



20

30

【配列表】

2024525837000001.xml

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/073668

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/7088 C12N15/113 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKASHIMA OSAMU ET AL: "Inducible Nitric Oxide Synthase Can Be Induced in the Absence of Active Nuclear Factor-[kappa]B in Rat Mesangial Cells : Involvement of the Janus Kinase 2 Signaling Pathway", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, vol. 10, no. 4, 1 April 1999 (1999-04-01), pages 721-729, XP055965948, US ISSN: 1046-6673, DOI: 10.1681/ASN.V104721 Retrieved from the Internet: URL:https://jasn.asnjournals.org/content/jnephrol/10/4/721.full.pdf?with-ds=yes> page 722	12
Y	----- -/--	1-4, 9-16
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 October 2022		Date of mailing of the international search report 03/01/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Piret, Bernard

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/073668

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Zhu Kui ET AL: "Mechanism by which H-2g, a glucose analog of blood group H antigen, mediates angiogenesis", / 15 March 2005 (2005-03-15), XP055965929, DOI: 10.1182/blood-2004-08- Retrieved from the Internet: URL:https://watermark.silverchair.com/zh800605002343.pdf?token=AQECAHi208BE490oan9kkhw_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKac485ysgAAA9YwggPSBgkqhkiG9w0BBwagggPDMIIDvwIBADCCA7gGCSqGS1b3DQEhATAeBg1ghkgBZQMEAS4wEQQMeTcgbekUVV2RyJo_AgEQgIIDiSe8m6K2Xhs6ZQQuiAMCN6GFqic6o52aQ7wUiZuOL8uhcYLlnxX7iF0KQgGST_27vBzUjhUJen-Y4zq3cYzCt [retrieved on 2022-09-28]	12
Y	page 2344 -----	1-4, 9-16
X	BITTORF T ET AL: "Requirement for JAK2 in Erythropoietin-Induced Signalling Pathways", CELLULAR SIGNALLING, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 9, no. 1, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 85-89, XP027373282, ISSN: 0898-6568 [retrieved on 1997-01-01]	12
Y	page 86 -----	1-4, 9-16
X	YAKUBENKO VALENTIN P. ET AL: "From Macrophage Interleukin-13 Receptor to Foam Cell Formation", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 288, no. 4, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 2778-2788, XP055967658, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M112.381343	12
Y	page 2780 -----	1-4, 9-16
X	WO 2014/161046 A1 (INST MEDICAL W & E HALL [AU]) 9 October 2014 (2014-10-09) claims 1-7, 20-22 -----	1, 4, 9, 12, 15, 16
X	WO 2017/214463 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 14 December 2017 (2017-12-14)	1, 4, 9, 12, 15, 16
Y	page 28 - page 29; claims 1-5 ----- -/--	1-4, 9-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/073668

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KURODA JUNYA ET AL: "NS-018, a selective JAK2 inhibitor, preferentially inhibits CFU-GM colony formation by bone marrow mononuclear cells from high-risk myelodysplastic syndrome patients", LEUKEMIA RESEARCH, vol. 38, no. 5, 1 May 2014 (2014-05-01), pages 619-624, XP055967575, US ISSN: 0145-2126, DOI: 10.1016/j.leukres.2014.03.001 -----	1-4,9-16
A	BOEHRER SIMONE ET AL: "Erlotinib exhibits antineoplastic off-target effects in AML and MDS: a preclinical study", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 111, no. 4, 15 February 2008 (2008-02-15), pages 2170-2180, XP086509639, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2007-07-100362 [retrieved on 2020-10-31] -----	1-4,9-16

1

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/073668
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/073668

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

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

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

10

20

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-4 (completely) ; 9-16 (partially)

30

40

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2022/073668

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-4(completely); 9-16(partially)

A method of treating a patient diagnosed with myelodysplastic syndrome (MDS) which comprises: administering to said patient an amount of an ASO-T-JAK2 compound effective to treat such disease.

2. claims: 5-8(completely); 9-16(partially)

A method of treating a patient diagnosed with polycythemia vera (PV) which comprises: administering to the patient an amount of an ASO-T-JAK2 compound effective to treat such disease.

3. claims: 17-37

An antisense oligonucleotide (ASO) targeted to a nucleic acid molecule encoding a mutated IGHMBP2 gene; methods and products derived therefrom.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT						International application No	
Information on patent family members						PCT/US2022/073668	
Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date	
WO 2014161046	A1	09-10-2014	AU	2014246667	A1	19-11-2015	
			EP	2981252	A1	10-02-2016	
			US	2016045498	A1	18-02-2016	
			WO	2014161046	A1	09-10-2014	

WO 2017214463	A1	14-12-2017	US	2019247413	A1	15-08-2019	
			WO	2017214463	A1	14-12-2017	

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
,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,D K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB ,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,W S,ZA,ZM,ZW		
(72)発明者	スミースゼク、サンドラ	
	アメリカ合衆国 2 0 0 3 7 ワシントン ワシントン、 2 2 ストリート ノースウェスト 1 4 1 4 4	
F ターム (参考)	4C086 AA01 AA02 BC71 MA01 MA04 MA66 NA14 ZA21 ZA94 ZB21 ZB26 ZB27 ZC54	