

(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2018-538287

(P2018-538287A)

(43) 公表日 平成30年12月27日 (2018. 12. 27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 13/12 (2006. 01)</b>	A 6 1 P 13/12	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 48/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 48/00	
<b>A 6 1 K 38/16 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 38/16	
<b>C 1 2 N 15/113 (2010. 01)</b>	C 1 2 N 15/113 Z N A Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-529219 (P2018-529219)  
 (86) (22) 出願日 平成28年12月13日 (2016. 12. 13)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年7月27日 (2018. 7. 27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/066417  
 (87) 国際公開番号 W02017/106211  
 (87) 国際公開日 平成29年6月22日 (2017. 6. 22)  
 (31) 優先権主張番号 62/267, 252  
 (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)

(71) 出願人 518195829  
 コールド スプリング ハーバー ラボラ  
 トリー  
 アメリカ合衆国 1 1 7 2 4 ニューヨー  
 ク州 コールド・スプリング・ハーバー  
 ワン・バングタウン・ロード ニコラス・  
 ビルディング ピー. オー. ボックス 1  
 O O  
 (71) 出願人 518195690  
 ストック セラピューティクス, インク.  
 アメリカ合衆国 O 1 7 3 O マサチュー  
 セッツ州 ベッドフォード プレストン・コ  
 ート 3  
 (74) 代理人 100082072  
 弁理士 清原 義博

最終頁に続く

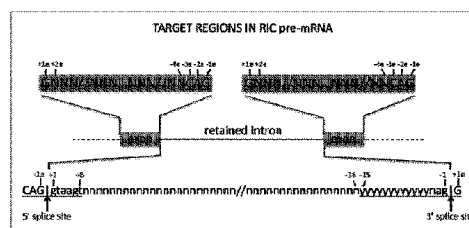
(54) 【発明の名称】 多発性嚢胞腎の処置のためのアンチセンスオリゴマー

## (57) 【要約】

P C - 2 の発現を増加させるための、および、被験体、例えば、P C - 2 タンパク質発現が不足している被験体、あるいは多発性嚢胞腎 ( P K D ) を抱える被験体を処置するための方法と組成物が本明細書で提供される。

【選択図】 図 1

FIG. 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験体の細胞によって標的タンパク質または機能的 RNA の発現を増加させることにより、被験体の多発性嚢胞腎を処置する方法であって、

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、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するエクソン、3' スプライス部位に隣接するエクソンを含み、および、RIC mRNA 前駆体は標的タンパク質または機能的 RNA をコードし、

前記方法は、

標的タンパク質または機能的 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) に、被験体の細胞を接触させる工程を含み、これによって、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能的 RNA をコードする RIC mRNA 前駆体から構成的にスプライシングされ、それにより、標的タンパク質または機能的 RNA をコードする mRNA のレベルを増加させ、被験体の細胞中の標的タンパク質あるいは機能的 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 mRNA 前駆体 (RIC mRNA 前駆体) を有する細胞により、PC-2 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、

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、および、RIC mRNA 前駆体は PC-2 タンパク質をコードし、

20

前記方法は、

PC-2 タンパク質をコードする 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) に、被験体の細胞を接触させる工程を含み、これによって、保持されたイントロンは、PC-2 タンパク質をコードする RIC mRNA 前駆体から構成的にスプライシングされ、それにより、PC-2 タンパク質をコードする mRNA のレベルを増加させ、細胞中の PC-2 タンパク質の発現を増加させる、方法。

## 【請求項 3】

標的タンパク質は PC-2 である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

30

標的タンパク質または機能的 RNA は、被験体において量あるいは活性が不足している標的タンパク質あるいは機能的 RNA を機能的に増大させるか、これに取って代わる、補償タンパク質あるいは補償機能的 RNA である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

細胞は、PC-2 タンパク質の不足している量または活性によって引き起こされた疾病を抱える被験体中のものであるか、該被験体からのものである、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 6】

標的タンパク質の不足している量は、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 の対立遺伝子と、標的タンパク質が生成されない第 2 の対立遺伝子、あるいは非機能的標的タンパク質をコードする第 2 の対立遺伝子とを有し、ここで、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 mRNA 前駆体の標的部分に結合する、請求項 1 - 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

## 【請求項 7】

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り引き起こされた疾病を抱えており、ここで、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生成と比較して、減少したレベルで生成され、

(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生

50

成され、あるいは、

( i i i ) 標的タンパク質が生成されない、

第 1 の変異対立遺伝子と、

( b )

( i ) 標的タンパク質が野生型対立遺伝子からの生成と比較して、減少したレベルで生成され、

( 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生成され、あるいは、

( i i i ) 標的タンパク質が生成されない、

第 2 の変異対立遺伝子とを有し、

ここで、被験体が第 1 の変異対立遺伝子 ( a ) ( i i i ) を有するとき、第 2 の変異対立遺伝子は ( b ) ( i ) あるいは ( b ) ( i i ) であり、ここで、被験体が第 2 の変異対立遺伝子 ( b ) ( i i i ) を有するとき、第 1 の変異対立遺伝子は ( a ) ( i ) あるいは ( a ) ( i i ) であり、ここで、R I C m R N A 前駆体は、( a ) ( i ) あるいは ( a ) ( i i ) である第 1 の変異対立遺伝子、および / または、( b ) ( i ) あるいは ( 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 - 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 8】

標的タンパク質は、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生成される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

標的タンパク質は、同等の野性型タンパク質と比較して、十分に機能的な形態で生成される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に対して + 6 ~ 保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対して - 1 6 までの領域内の保持されたイントロンにある、請求項 1 - 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 11】

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、

( a ) 保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に対して + 6 ~ + 4 9 7 の領域、あるいは、

( b ) 保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対して - 1 6 ~ - 4 9 6 の領域、の内部の保持されたイントロンにある、請求項 1 - 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 12】

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、

( a ) 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中の + 2 e ~ - 4 e の領域、あるいは

( b ) 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中の + 2 e ~ - 4 e の領域、

の内部にある、請求項 1 - 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 13】

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 ' スプライス部位に対して - 4 e ~ - 1 , 0 5 4 e の領域、

( b ) 保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に対して + 6 ~ + 4 9 9 の領域、

( c ) 保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対して - 1 6 ~ - 4 9 6 の領域、あるいは、

( d ) 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 ~ + 1 , 9 1 2 e の領域、

の内部の保持されたイントロンにある、請求項 1 - 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 14】

標的タンパク質は PC - 2 である、請求項 1 - 13 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【請求項 15】

RIC mRNA 前駆体は、SEQ ID NO : 2 に少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % の配列同一性を備えた配列を含む、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

RIC mRNA 前駆体は、SEQ ID NO : 1 に少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % の配列同一性を備えた遺伝子配列によってコードされる、請求項 14 に記載の方法。

10

## 【請求項 17】

RIC mRNA 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO : 281 の少なくとも 8 つの隣接する核酸を含む領域に少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % の配列同一性を備えた配列を含む、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 18】

ASO は、SEQ ID NO : 3 - 280 のいずれか 1 つに少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % 相補的な配列を含む、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 19】

RIC mRNA 前駆体の標的部分は、保持されたイントロン 5 の 5' スプライス部位に対して - 204 e ~ + 497 までの領域内、あるいは保持されたイントロン 5 の 3' スプライス部位に対して - 496 ~ + 212 e の領域内にある、請求項 14 に記載の方法。

20

## 【請求項 20】

ASO は、SEQ ID NO : 3 - 280 のいずれか 1 つに少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % 相補的な配列を含む、請求項 19 に記載の方法。

## 【請求項 21】

RIC mRNA 前駆体の標的部分は、保持されたイントロン 5 の 5' スプライス部位に対して - 204 e ~ - 4 e の領域内のエクソン 5 にある、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 22】

ASO は、SEQ ID NO : 3 - 43 のいずれか 1 つに少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % 相補的な配列を含む、請求項 21 に記載の方法。

30

## 【請求項 23】

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して + 6 ~ + 497 の領域内の保持されたイントロン 5 にある、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 24】

ASO は、SEQ ID NO : 44 - 140 のいずれか 1 つに少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % 相補的な配列を含む、請求項 23 に記載の方法。

40

## 【請求項 25】

RIC mRNA 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対して - 16 ~ - 496 の領域内の保持されたイントロン 5 にある、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 26】

ASO は、SEQ ID NO : 141 - 237 のいずれか 1 つに少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % 相補的な配列を含む、請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 27】

50

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 5 の 3' スプライス部位に対して + 2 e ~ + 2 1 2 e の領域内のエクソン 6 にある、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 8】

A S O は、S E Q I D N O : 2 3 8 - 2 8 0 のいずれか 1 つに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、あるいは 1 0 0 % 相補的な配列を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

アンチセンスオリゴマーは、機能的 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、標的タンパク質または機能的 R N A の量を増加させない、請求項 1 - 2 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【請求項 3 0】

アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能的 R N A をコードする遺伝子の突然変異に起因する異常な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的 R N A の量を増加させない、請求項 1 - 2 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 3 1】

R I C m R N A 前駆体は、全長の m R N A 前駆体の部分的なスプライシング、または野生型の m R N A 前駆体の部分的なスプライシングによって生成された、請求項 1 - 3 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 3 2】

標的タンパク質または機能的 R N A をコードする m R N A は、全長の成熟 m R N A、あるいは野生型の成熟 m R N A である、請求項 1 - 3 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【請求項 3 3】

生成された標的タンパク質は、全長のタンパク質あるいは野生型のタンパク質である、請求項 1 - 3 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 3 4】

アンチセンスオリゴマーと接触させた細胞中で生成された標的タンパク質または機能的 R N A をコードする m R N A の総量は、対照細胞中で生成された標的タンパク質または機能的 R N A をコードする m R N A の総量と比較して、約 1 . 1 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 5 ~ 約 1 0 倍、約 2 ~ 約 1 0 倍、約 3 ~ 約 1 0 倍、約 4 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 1 ~ 約 5 倍、約 1 . 1 ~ 約 6 倍、約 1 . 1 ~ 約 7 倍、約 1 . 1 ~ 約 8 倍、約 1 . 1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 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 1 0 倍増加する、請求項 1 - 3 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

【請求項 3 5】

アンチセンスオリゴマーと接触させた細胞によって生成された標的タンパク質の総量は、対照細胞によって生成された標的タンパク質の総量として、約 1 . 1 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 5 ~ 約 1 0 倍、約 2 ~ 約 1 0 倍、約 3 ~ 約 1 0 倍、約 4 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 1 ~ 約 5 倍、約 1 . 1 ~ 約 6 倍、約 1 . 1 ~ 約 7 倍、約 1 . 1 ~ 約 8 倍、約 1 . 1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 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 1 0 倍増加する、請求項 1 - 3 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【請求項 3 6】

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ロジアミデート結合を含む骨格修飾を含む、請求項 1 - 3 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 3 7】

50

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、あるいは2'-O-メトキシエチル部分を含む、請求項1-36のいずれか1つに記載の方法。

【請求項38】

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、請求項1-37のいずれか1つに記載の方法。

【請求項39】

それぞれの糖部は修飾された糖部である、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

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、あるいは12~15の核酸塩基からなる、請求項1-39のいずれか1つに記載の方法。

10

20

【請求項41】

アンチセンスオリゴマーは、タンパク質をコードするRIC mRNA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%、あるいは100%相補的である、請求項1-40のいずれか1つに記載の方法。

【請求項42】

細胞は、標的タンパク質または機能的RNAをコードする遺伝子から転写されたRIC mRNA前駆体の集団を含み、ここで、RIC mRNA前駆体の集団は少なくとも1つの保持されたイントロンを含み、および、ここで、アンチセンスオリゴマーは、RIC mRNA前駆体の集団で最も豊富な保持されたイントロンに結合する、請求項1-41のいずれか1つに記載の方法。

30

【請求項43】

最も豊富な保持されたイントロンに対するアンチセンスオリゴマーの結合は、標的タンパク質または機能的RNAをコードするmRNAを生成するRIC mRNA前駆体の集団からの少なくとも1つ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42に記載の方法。

【請求項44】

細胞は、標的タンパク質または機能的RNAをコードする遺伝子から転写されたRIC mRNA前駆体の集団を含み、ここで、RIC 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み、および、ここで、アンチセンスオリゴマーは、RIC mRNA前駆体の集団で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1-43のいずれか1つに記載の方法。

40

【請求項45】

2番目に豊富な保持されたイントロンに対するアンチセンスオリゴマーの結合は、標的タンパク質または機能的RNAをコードするmRNAを生成するRIC mRNA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44に記載の方法。

【請求項46】

前記方法はPC-2タンパク質発現を評価する工程をさらに含む、請求項1-45のいずれか1つに記載の方法。

50

## 【請求項 47】

アンチセンスオリゴマーは P K D 2 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 : 3 - 2 8 0 から選択される配列である、請求項 1 - 4 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【請求項 48】

被験体はヒトである、請求項 1 - 4 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【請求項 49】

被験体はヒト以外の動物である、請求項 1 - 4 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【請求項 50】

被験体は胎児、胚、あるいは子供である、請求項 1 - 4 8 のいずれか 1 つに記載の方法

10

## 【請求項 51】

細胞はエクスピボである、請求項 1 - 4 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【請求項 52】

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、あるいは静脈内注射によって投与される、請求項 1 - 5 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【請求項 53】

5' スプライス部位に隣接するエクソンの - 3 e ~ - 1 e と、保持されたイントロンの + 1 ~ + 6 にある 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、請求項 1 - 5 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

## 【請求項 54】

保持されたイントロンの - 1 5 ~ - 1 と 3' スプライス部位に隣接するエクソンの + 1 e にある 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 - 5 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【請求項 55】

請求項 1 - 5 4 のいずれか 1 つの方法で使用されるアンチセンスオリゴマー。

## 【請求項 56】

S E Q I D N O : 3 - 2 8 0 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 %、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を備えた配列を含む、アンチセンスオリゴマー。

30

## 【請求項 57】

請求項 5 5 または 5 6 のアンチセンスオリゴマーと、薬学的に許容可能な賦形剤、希釈剤、または担体とを含む医薬組成物。

## 【請求項 58】

腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、あるいは静脈内注射によって、請求項 5 7 の医薬組成物を投与することにより被験体を処置する方法。

## 【請求項 59】

不足しているタンパク質または不足している機能的 R N A に関連付けられる被験体の多発性嚢胞腎を処置するために細胞によって標的タンパク質あるいは機能的 R N A の発現を増加させる方法で使用されるアンチセンスオリゴマーを含む組成物であって、

40

不足しているタンパク質または不足している機能的 R N A は、被験体において量あるいは活性が不足しており、ここで、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能的 R N A をコードする、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 ) の構成的なスプライシングを増強し、

ここで、

標的タンパク質は、

( a ) 不足しているタンパク質、あるいは

( b ) 被験体において不足しているタンパク質を機能的に増大させるか、これに取って代わる、補償タンパク質であり、

ここで、

50

機能的 R N A は、

( c ) 不足している R N A、あるいは、

( d ) 被験体の不足している機能的 R N A を機能的に増大させるか、これに取って代わる、補償機能的 R N A であり、

ここで、

R I C m R N A 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み、ここで、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能的 R N A をコードする R I C m R N A 前駆体からスプライシングされ、それによって、被験体の標的タンパク質あるいは機能的 R N A の生成あるいは活性を増加させる、組成物。

10

#### 【請求項 6 0】

被験体において P C - 2 タンパク質に関連する疾病を処置する方法で使用されるアンチセンスオリゴマーを含む組成物であって、

当該方法は、被験体の細胞によって P C - 2 タンパク質の発現を増加させる工程であって、細胞が、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む、保持されたイントロン含有 m R N A 前駆体を有し、および、R I C m R N A 前駆体が P C - 2 タンパク質をコードする、工程と、アンチセンスオリゴマーに細胞を接触させる工程であって、これによって、保持されたイントロンは、P C - 2 タンパク質をコードする R I C m R N A 前駆体転写産物から構成的にスプライシングされ、それにより、被験体の細胞において P C - 2 タンパク質をコードする m R N A のレベルを増加させ、P C - 2 タンパク質の発現を増加させる、工程を含む、組成物。

20

#### 【請求項 6 1】

疾病は疾患または障害である、請求項 6 0 に記載の組成物。

#### 【請求項 6 2】

疾患または障害は多発性嚢胞腎である、請求項 6 1 に記載の組成物。

#### 【請求項 6 3】

標的タンパク質と R I C m R N A 前駆体は P K D 2 遺伝子によってコードされる、請求項 6 2 に記載の組成物。

#### 【請求項 6 4】

アンチセンスオリゴマーは、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対して + 6 から、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対して - 1 6 までの領域内の保持されたイントロンにある R I C m R N A 前駆体の一部を標的とする、請求項 5 9 - 6 3 のいずれか 1 つに記載の組成物。

30

#### 【請求項 6 5】

アンチセンスオリゴマーは R I C m R N A 前駆体の一部を標的とし、これは、

( a ) 保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対して + 6 ~ + 4 9 7 の領域、あるいは、

( b ) 保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対して - 1 6 ~ - 4 9 6 の領域、の内部の保持されたイントロンにある、請求項 5 9 - 6 4 のいずれか 1 つに記載の組成物。

40

#### 【請求項 6 6】

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 1 0 0 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 1 0 0 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 9 - 6 3 のいずれか 1 つに記載の組成物。

#### 【請求項 6 7】

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するエクソン中の + 2 e ~ - 4 e の領域、あるいは、

50



(b) 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中の + 2 e ~ - 4 e の領域、

の内部にある、請求項 59 - 63 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 68】

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' スプライス部位に対して - 4 e ~ - 1 , 0 5 4 e の領域、

(b) 保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対して + 6 ~ + 4 9 9 の領域、

(c) 保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対して - 1 6 ~ - 4 9 6 の領域、あるいは、

(d) 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 ~ + 1 , 9 1 2 e の領域、

の内部にある、請求項 59 - 63 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 69】

標的タンパク質は P C - 2 である、請求項 59 - 68 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 70】

R I C m R N A 前駆体は、S E Q I D N O : 2 に少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % の配列同一性を備えた配列を含む、請求項 69 に記載の組成物。

【請求項 71】

R I C m R N A 前駆体は、S E Q I D N O : 1 に少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % の配列同一性を備えた遺伝子配列によってコードされる、請求項 69 に記載の組成物。

【請求項 72】

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、S E Q I D N O : 2 8 1 の少なくとも 8 つの隣接する核酸を含む領域に少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % の配列同一性を備えた配列を含む、請求項 69 に記載の組成物。

【請求項 73】

A S O は、S E Q I D N O : 3 - 2 8 0 のいずれか 1 つに少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % 相補的な配列を含む、請求項 69 に記載の組成物。

【請求項 74】

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 5 の 5' スプライス部位に対して - 2 0 4 e ~ + 4 9 7 までの領域内、あるいは保持されたイントロン 5 の 3' スプライス部位に対して - 4 9 6 ~ + 2 1 2 e の領域内にある、請求項 69 に記載の組成物。

【請求項 75】

A S O は、S E Q I D N O : 3 - 2 8 0 のいずれか 1 つに少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % 相補的な配列を含む、請求項 74 に記載の組成物。

【請求項 76】

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 5 の 5' スプライス部位に対して - 2 0 4 e ~ - 4 e の領域内のエクソン 5 にある、請求項 69 に記載の組成物。

【請求項 77】

A S O は、S E Q I D N O : 3 - 4 3 のいずれか 1 つに少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、あるいは 100 % 相補的な配列を含む、請求項 76 に記載の組成物。

【請求項 78】

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の 5' スプライス部位に対して + 6 ~ + 4 9 7 の領域内の保持されたイントロン 5 にある、請求項 69 に記載の組

10

20

30

40

50

成物。

【請求項 79】

ASOは、SEQ ID NO: 44 - 140のいずれか1つに少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%相補的な配列を含む、請求項78に記載の組成物。

【請求項 80】

RIC mRNA前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して-16~-496の領域内の保持されたイントロン5にある、請求項69に記載の組成物。

【請求項 81】

ASOは、SEQ ID NO: 141 - 237のいずれか1つに少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%相補的な配列を含む、請求項80に記載の組成物。

【請求項 82】

RIC mRNA前駆体の標的部分は、保持されたイントロン5の3'スプライス部位に対して+2e~+212eの領域内のエクソン6にある、請求項69に記載の組成物。

【請求項 83】

ASOは、SEQ ID NO: 238 - 280のいずれか1つに少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%相補的な配列を含む、請求項82に記載の組成物。

【請求項 84】

アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能的RNAをコードする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を調節することにより、標的タンパク質または機能的RNAの量を増加させない、請求項59-83のいずれか1つに記載の組成物。

【請求項 85】

アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能的RNAをコードする遺伝子の突然変異に起因する異常なスプライシングを調節することにより、機能的RNAまたは機能的タンパク質の量を増加させない、請求項59-84のいずれか1つに記載の組成物。

【請求項 86】

RIC mRNA前駆体は、全長のmRNA前駆体、あるいは野生型のmRNA前駆体の部分的なスプライシングによって生成された、請求項59-85のいずれか1つに記載の組成物。

【請求項 87】

標的タンパク質または機能的RNAをコードするmRNAは、全長の成熟mRNA、あるいは野生型の成熟mRNAである、請求項59-86のいずれか1つに記載の組成物。

【請求項 88】

生成された標的タンパク質は、全長のタンパク質あるいは野生型のタンパク質である、請求項59-87のいずれか1つに記載の組成物。

【請求項 89】

保持されたイントロンは律速イントロンである、請求項59-88のいずれか1つに記載の組成物。

【請求項 90】

前記保持されたイントロンは前記RIC mRNA前駆体で最も豊富な保持されたイントロンである、請求項59-89のいずれか1つに記載の組成物。

【請求項 91】

保持されたイントロンは前記RIC mRNA前駆体で2番目に豊富な保持されたイントロンである、請求項59-89のいずれか1つに記載の組成物。

【請求項 92】

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ロジアミデート結合

10

20

30

40

50

を含む骨格修飾を含む、請求項 59 - 91 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 93】

前記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、請求項 59 - 92 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 94】

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、あるいは 2' - O - メトキシエチル部分を含む、請求項 59 - 93 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 95】

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、請求項 59 - 94 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 96】

それぞれの糖部は修飾された糖部である、請求項 95 に記載の組成物。

【請求項 97】

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、あるいは 12 ~ 15 の核酸塩基からなる、請求項 59 - 96 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【請求項 98】

請求項 59 - 97 の組成物のいずれか 1 つのアンチセンスオリゴマーと、薬学的に許容可能な賦形剤、希釈剤、または担体とを含む医薬組成物。

【請求項 99】

腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、あるいは静脈内注射によって請求項 98 の医薬組成物を投与することにより被験体を処置する方法。

【請求項 100】

不足している PKD2 mRNA 転写産物の標的配列にハイブリダイズされるアンチセンスオリゴマーであって、不足している PKD2 mRNA 転写産物が保持されたイントロンを含み、アンチセンスオリゴマーが不足している PKD2 mRNA 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、アンチセンスオリゴマーと、薬学的に許容可能な賦形剤、希釈剤、または担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 101】

不足している PKD2 mRNA 転写産物は PKD2 RIC mRNA 前駆体転写産物である、請求項 100 に記載の医薬組成物。

【請求項 102】

PKD2 RIC mRNA 前駆体転写産物の標的部分は、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対して約 + 500 ~ 保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対して約 - 500 までの領域内の保持されたイントロンにある、請求項 100 または 101 に記載の医薬組成物。

【請求項 103】

PKD2 RIC mRNA 前駆体転写産物は、SEQ ID NO: 1 に対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは 100% の配列同一性を備えた遺伝子配列によってコードされる、請求項 100 または 1

10

20

30

40

50

01に記載の医薬組成物。

【請求項104】

PKD2 RIC mRNA前駆体転写産物は、SEQ ID NO:2に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む、請求項100または101に記載の医薬組成物。

【請求項105】

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ロジアミデート結合を含む骨格修飾を含む、請求項100に記載の医薬組成物。

【請求項106】

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、請求項100に記載の医薬組成物。

【請求項107】

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、あるいは2'-O-メトキシエチル部分を含む、請求項100に記載の医薬組成物。

【請求項108】

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、請求項100に記載の医薬組成物。

【請求項109】

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、あるいは12~15の核酸塩基を含む、請求項100に記載の医薬組成物。

【請求項110】

アンチセンスオリゴマーは、PKD2 RIC mRNA前駆体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%、あるいは100%相補的である、請求項100または101に記載の医薬組成物。

【請求項111】

PKD2 RIC mRNA前駆体転写産物の標的部分は、SEQ ID NO:281内にある、請求項100または101に記載の医薬組成物。

【請求項112】

アンチセンスオリゴマーは、SEQ ID NO:3-280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%、あるいは99%の配列同一性であるヌクレオチド配列を含む、請求項100に記載の医薬組成物。

【請求項113】

アンチセンスオリゴマーは、SEQ ID NO:3-280から選択されたヌクレオチド配列を含む、請求項100に記載の医薬組成物。

【請求項114】

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、あるいは静脈内注射のために製剤される、請求項100-113のいずれか1つに記載の医薬組

10

20

30

40

50

成物。

【請求項 1 1 5】

PC-2タンパク質の機能的な形態をコードする十分に処理されたPKD2 mRNA転写産物を生成するべく、保持されたイントロンの除去を促すために不足しているPKD2 mRNA転写産物の処理を誘発する方法であって、

前記方法は、

- (a) 被験体の標的細胞へアンチセンスオリゴマーを接触させる工程と、
  - (b) 不足しているPKD2 mRNA転写産物へアンチセンスオリゴマーをハイブリダイズする工程であって、不足しているPKD2 mRNA転写産物が、PC-2タンパク質の機能的な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、工程と、
  - (c) PC-2タンパク質の機能的な形態をコードする十分に処理されたPKD2 mRNA転写産物を生成するために不足しているPKD2 mRNA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と、
  - (d) 十分に処理されたPKD2 mRNA転写産物からPC-2タンパク質の機能的な形態を翻訳する工程、
- を含む、方法。

【請求項 1 1 6】

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、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

不足しているPKD2 mRNA転写産物はPKD2 mRNA前駆体転写産物である、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

PC2タンパク質の量と活性の不足によって引き起こされた疾病を抱える被験体を処置する方法であって、

SEQ ID NO: 3 - 280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%、あるいは99%の配列同一性を備えた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>

【0002】

本出願は、2015年12月14日に出願された米国仮出願第62/267,252号の利益を主張するものであり、当該出願は参照により本明細書に組み込まれる。配列リストへの言及

【0003】

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出され、参照によって本明細書に組み込まれる配列表を含んでいる。2016年12月9日に作成された上記のASCIIコピーは、47991\_\_707\_\_601\_\_SL.txtと命名され、253,332バイトのサイズである。

【背景技術】

【0004】

常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)は、嚢胞の進行と様々な腎外の徴候を特徴とした疾病である、最も一般的な遺伝性の嚢胞性腎疾患の1つである(Torres and Harris, 2009, Kidney International (2009) 76, 149-168)。ADPKDに苛まれている患者は一般に、70歳までに末期の腎疾患(ESRD)を進行させ、これは最終的には腎透析などの介入を必要

10

20

30

40

50

とする。生まれながらのADPKDの罹患率は1:400~1:1,000の間であり、米国で約600,000人に影響を与えていると推測される。

【0005】

PKD1あるいはPKD2遺伝子のいずれかの突然変異は、ADPKDとして現れ、PKD2の突然変異はADPKDの後期の発症形態の原因であることが分かっている。PKD1とPKD2の遺伝子はPC-1とPC-2のタンパク質をそれぞれコードする。こうしたタンパク質は、尿細管上皮の分化した表現型を維持するのに必要不可欠であると考えられている(Torres and Harris, 2009)。

【発明の概要】

【0006】

10

いくつかの実施形態では、被験体の細胞によって標的タンパク質または機能的RNAの発現を増加させることにより、被験体の多発性嚢胞腎を処置する方法が本明細書で開示され、ここで、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、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するエクソン、3'スプライス部位に隣接するエクソンを含み、および、ここで、RIC mRNA前駆体は標的タンパク質または機能的RNAをコードし、当該方法は、標的タンパク質または機能的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)に、被験体の細胞を接触させる工程を含み、これによって、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能的RNAをコードするRIC mRNA前駆体から構成的にスプライシングされ、それにより、標的タンパク質または機能的RNAをコードするmRNAのレベルを増加させ、被験体の細胞中の標的タンパク質あるいは機能的RNAの発現を増加させる。

20

【0007】

さらにいくつかの実施形態では、保持されたイントロン含有mRNA前駆体(RIC mRNA前駆体)を有する細胞により、PC-2である標的タンパク質の発現を増加させる方法が本明細書に開示され、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、および、ここで、RIC mRNA前駆体はPC-2タンパク質をコードし、当該方法は、PC-2タンパク質をコードする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)に、細胞を接

30

【0008】

前述の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、標的タンパク質はPC-2である。いくつかの実施形態において、標的タンパク質または機能的RNAは、被験体において量あるいは活性が不足している標的タンパク質あるいは機能的RNAを機能的に増大させるか、これに取って代わる、補償タンパク質あるいは補償機能的RNAである。いくつかの実施形態において、細胞は、PC-2タンパク質の不足している量または活性

40

【0009】

前述の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態において、標的タンパク質の不足している量は、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の対立遺伝子と、標的タンパク質が生成されない第2の対立遺伝子、あるいは非機能的標的タンパク質をコードする第2の対立遺伝子とを有し、ここで、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 mRNA前駆体の標的部分に結合する。いくつかの実施形態において、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り引き起こされた疾病を抱えており、こ

50

で、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生成と比較して、減少したレベルで生成され、(ii) 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生成され、あるいは、(iii) 標的タンパク質が生成されない、第1の変異対立遺伝子と、(b)(i) 標的タンパク質が野生型対立遺伝子からの生成と比較して、減少したレベルで生成され、(ii) 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生成され、あるいは、(iii) 標的タンパク質が生成されない、第2の変異対立遺伝子とを有し、ここで、被験体が第1の変異対立遺伝子(a)(iii)を有するとき、第2の変異対立遺伝子は(b)(i)あるいは(b)(ii)であり、ここで、被験体が第2の変異対立遺伝子(b)(iii)を有するとき、第1の変異対立遺伝子は(a)(i)あるいは(a)(ii)であり、ここで、RIC mRNA前駆体は、(a)(i)あるいは(a)(ii)である第1の変異対立遺伝子、および/または、(b)(i)あるいは(b)(ii)である第2の変異対立遺伝子から転写される。いくつかの実施形態において、標的タンパク質は、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生成される。いくつかの実施形態において、標的タンパク質は、同等の野性型タンパク質と比較して、十分に機能的な形態で生成される。

#### 【0010】

前述の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、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して+6 ~ 保持されたイントロンの3' スプライス部位に対して-16までの領域内の保持されたイントロンにある。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、以下の内部の保持されたイントロンにある：(a) 保持されたイントロンの5' スプライス部位に対して+6 ~ +497の領域；あるいは(b) 保持されたイントロンの3' スプライス部位に対して-16 ~ -496の領域。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、以下の内部にある：(a) 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中の+2e ~ -4eの領域；あるいは(b) 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中の+2e ~ -4eの領域。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、以下の内部の保持されたイントロンにある：(a) 保持されたイントロンの5' スプライス部位に対して-4e ~ -1,054eの領域；(b) 保持されたイントロンの5' スプライス部位に対して+6 ~ +499の領域；(c) 保持されたイントロンの3' スプライス部位に対して-16 ~ -496の領域；あるいは、(d) 保持されたイントロンの3' スプライス部位に対して+2e ~ +1,912eの領域。いくつかの実施形態において、標的タンパク質はPC-2である。

#### 【0011】

前述の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体は、SEQ ID NO: 2に少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体は、SEQ ID NO: 1に少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%の配列同一性を備えた遺伝子配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、SEQ ID NO: 281の少なくとも8つの隣接する核酸を含む領域に少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む。いくつかの実施形態において、ASOは、SEQ ID NO: 3-280のいずれか1つに少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%相補的な配列を含む。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、保持されたイントロン5の5' スプライス部位に対して-204e ~ +497までの領域内、あるいは保持されたイントロン5の3' スプライス部位に対して-496 ~ +212eの領域内にある。いくつかの実施形態において、ASOは、SEQ ID NO: 3-280のいずれか1つに少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%相補的な配列を含む。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、保持されたイントロン5の5' スプライス部位に対して-204e ~ -4eの領域内の工

10

20

30

40

50

クソン 5 にある。いくつかの実施形態において、A S O は、S E Q I D N O : 3 - 4 3 のいずれか 1 つに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、あるいは 1 0 0 % 相補的な配列を含む。いくつかの実施形態において、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の 5 ' スプライス部位に対して + 6 ~ + 4 9 7 の領域内の保持されたイントロン 5 にある。いくつかの実施形態において、A S O は、S E Q I D N O : 4 4 - 1 4 0 のいずれか 1 つに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、あるいは 1 0 0 % 相補的な配列を含む。いくつかの実施形態において、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の 3 ' スプライス部位に対して - 1 6 ~ - 4 9 6 の領域内の保持されたイントロン 5 にある。いくつかの実施形態において、A S O は、S E Q I D N O : 1 4 1 - 2 3 7 のいずれか 1 つに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、あるいは 1 0 0 % 相補的な配列を含む。いくつかの実施形態において、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 5 の 3 ' スプライス部位に対して + 2 e ~ + 2 1 2 e の領域内のエクソン 6 にある。いくつかの実施形態において、A S O は、S E Q I D N O : 2 3 8 - 2 8 0 のいずれか 1 つに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、あるいは 1 0 0 % 相補的な配列を含む。

#### 【 0 0 1 2 】

前述の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、機能的 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、標的タンパク質または機能的 R N A の量を増加させない。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能的 R N A をコードする遺伝子の突然変異に起因する異常な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的 R N A の量を増加させない。いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体は、全長の m R N A 前駆体の部分的なスプライシング、または野生型の m R N A 前駆体の部分的なスプライシングによって生成された。いくつかの実施形態において、標的タンパク質または機能的 R N A をコードする m R N A は、全長の成熟 m R N A、あるいは野生型の成熟 m R N A である。いくつかの実施形態において、生成された標的タンパク質は全長のタンパク質あるいは野生型のタンパク質である。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーと接触させた細胞中で生成された標的タンパク質または機能的 R N A をコードする m R N A の総量は、対照細胞中で生成された標的タンパク質または機能的 R N A をコードする m R N A の総量と比較して、約 1 . 1 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 5 ~ 約 1 0 倍、約 2 ~ 約 1 0 倍、約 3 ~ 約 1 0 倍、約 4 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 1 ~ 約 5 倍、約 1 . 1 ~ 約 6 倍、約 1 . 1 ~ 約 7 倍、約 1 . 1 ~ 約 8 倍、約 1 . 1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 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 1 0 倍増加する。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーと接触させた細胞によって生成された標的タンパク質の総量は、対照細胞によって生成された標的タンパク質の総量と比較して、約 1 . 1 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 5 ~ 約 1 0 倍、約 2 ~ 約 1 0 倍、約 3 ~ 約 1 0 倍、約 4 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 1 ~ 約 5 倍、約 1 . 1 ~ 約 6 倍、約 1 . 1 ~ 約 7 倍、約 1 . 1 ~ 約 8 倍、約 1 . 1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 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 1 0 倍増加する。

#### 【 0 0 1 3 】

前述の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、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ロジアミデート結合を含む骨格修飾を含む。いくつか



の実施形態において、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、ロックス核酸、ペプチド核酸、2'-O-メチル、2'-フルオロ、あるいは2'-O-メトキシエチル部分を含む。いくつかの実施形態において、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分を含む。いくつかの実施形態において、それぞれの糖部分は修飾された糖部分である。いくつかの実施形態において、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、あるいは12~15の核酸塩基からなる。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、タンパク質をコードするRIC mRNA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%、あるいは100%相補的である。

#### 【0014】

前述の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、細胞は、標的タンパク質または機能的RNAをコードする遺伝子から転写されたRIC mRNA前駆体の集団を含み、ここで、RIC mRNA前駆体の集団は少なくとも1つの保持されたイントロンを含み、および、ここで、アンチセンスオリゴマーは、RIC mRNA前駆体の集団で最も豊富な保持されたイントロンに結合する。いくつかの実施形態において、最も豊富な保持されたイントロンに対するアンチセンスオリゴマーの結合は、標的タンパク質または機能的RNAをコードするmRNAを生成するRIC mRNA前駆体の集団からの少なくとも1つ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。いくつかの実施形態において、細胞は、標的タンパク質または機能的RNAをコードする遺伝子から転写されたRIC mRNA前駆体の集団を含み、ここで、RIC 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み、および、ここで、アンチセンスオリゴマーは、RIC mRNA前駆体の集団で2番目に豊富な保持されたイントロンに結合する。いくつかの実施形態において、2番目に豊富な保持されたイントロンに対するアンチセンスオリゴマーの結合は、標的タンパク質または機能的RNAをコードするmRNAを生成するRIC mRNA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。いくつかの実施形態において、当該方法はPC-2タンパク質発現を評価する工程をさらに含む。

#### 【0015】

前述の方法のいずれかのいくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーはPKD2 RIC mRNA前駆体の標的部分に結合し、ここで、標的部分はSEQ ID NO: 3-280から選択される配列である。いくつかの実施形態では、被験体はヒトである。いくつかの実施形態では、被験体はヒト以外の動物である。いくつかの実施形態において、被験体は胎児、胚、あるいは子供である。いくつかの実施形態では、細胞はエクスピボである。いくつかの実施形態において、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、あるいは静脈内注射によって投与される。いくつかの実施形態において、5'スプライス部位に隣接するエクソンの-3e~-1eと、保持されたイントロンの+1~+6にある9つのヌクレオチドは、対応する野性型配列と同一である。いくつかの実施形態において、保持されたイントロンの-15~-1と3'スプライス部位に隣接するエクソンの+1eにある16のヌクレオチドは、対応する野性型配列と同一である。いくつかの実施形態では、前述の方法のいずれかに記載されるようなアンチセンスオリゴマーが本明細書に開示される。

10

20

30

40

50

## 【0016】

いくつかの実施形態では、SEQ ID NO: 3 - 280のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含むアンチセンスオリゴマーが本明細書で開示される。

## 【0017】

さらにいくつかの実施形態では、前述のアンチセンスオリゴマーのいずれかと賦形剤を含む医薬組成物が本明細書で開示される。

## 【0018】

いくつかの実施形態では、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、あるいは静脈内注射によって前述の医薬組成物のいずれかを投与することにより、必要としている被験体を処置する方法が本明細書で開示される。

## 【0019】

いくつかの実施形態では、不足しているタンパク質または不足している機能的RNAに関連付けられる被験体の多発性嚢胞腎を処置するために細胞によって標的タンパク質あるいは機能的RNAの発現を増加させる方法で使用されるアンチセンスオリゴマーを含む組成物が本明細書で開示される。ここで、不足しているタンパク質または不足している機能的RNAは、被験体において量あるいは活性が不足しており、ここで、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能的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)の構成的なスプライシングを増強し、ここで、標的タンパク質は：(a)不足しているタンパク質；あるいは(b)被験体において不足しているタンパク質を機能的に増大させるか、これに取って代わる、補償タンパク質であり、ここで、機能的RNAは：(c)不足しているRNA；あるいは(d)被験体の不足している機能的RNAを機能的に増大させるか、これに取って代わる、補償機能的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み、ここで、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能的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、被験体の標的タンパク質あるいは機能的RNAの生成あるいは活性を増加させる。

## 【0020】

いくつかの実施形態では、被験体においてPC-2タンパク質に関連する疾病を処置する方法で使用されるアンチセンスオリゴマーを含む組成物が本明細書で開示され、当該方法は、被験体の細胞によってPC-2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む、保持されたイントロン含有mRNA前駆体を有し、および、ここで、RIC mRNA前駆体はPC-2タンパク質をコードし、当該方法は、アンチセンスオリゴマーに細胞を接触させる工程を含み、これによって、保持されたイントロンは、PC-2タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体転写産物から構成的にスプライシングされ、それにより、被験体の細胞においてPC-2タンパク質をコードするmRNAのレベルを増加させ、PC-2タンパク質の発現を増加させる。いくつかの実施形態では、疾病は疾患または障害である。いくつかの実施形態において、疾患または障害は多発性嚢胞腎である。いくつかの実施形態において、標的タンパク質とRIC mRNA前駆体はPKD2遺伝子によってコードされる。

## 【0021】

前述の組成物のいずれかのいくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して+6から、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して-16までの領域内の保持されたイントロンにあるRIC mRNA前駆体の一部を標的とする。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーはRIC mRNA前駆体の一部を標的とし、これは、以下の内部の保持されたイントロンにある：(a)保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して+6~+49

7の領域；あるいは（b）保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して-16～-496の領域。いくつかの実施形態において、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。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、以下の内部にある：（a）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中の+2e～-4eの領域；あるいは（b）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中の+2e～-4eの領域。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、以下の内部にある：（a）保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して-4e～-1, 054eの領域；（b）保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して+6～+499の領域；（c）保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して-16～-496の領域；あるいは、（d）保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して+2e～+1, 912eの領域。いくつかの実施形態において、標的タンパク質はPC-2である。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体は、SEQ ID NO: 2に少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体は、SEQ ID NO: 1に少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%の配列同一性を備えた遺伝子配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、SEQ ID NO: 281の少なくとも8つの隣接する核酸を含む領域に少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む。いくつかの実施形態において、ASOは、SEQ ID NO: 3-280のいずれか1つに少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%相補的な配列を含む。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、保持されたイントロン5の5'スプライス部位に対して-204e～+497までの領域内、あるいは保持されたイントロン5の3'スプライス部位に対して-496～+212eの領域内にある。いくつかの実施形態において、ASOは、SEQ ID NO: 3-280のいずれか1つに少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%相補的な配列を含む。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、保持されたイントロン5の5'スプライス部位に対して-204e～-4eの領域内のエクソン5にある。いくつかの実施形態において、ASOは、SEQ ID NO: 3-43のいずれか1つに少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%相補的な配列を含む。いくつかの実施形態において、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して+6～+497の領域内の保持されたイントロン5にある。いくつかの実施形態において、ASOは、SEQ ID NO: 44-140のいずれか1つに少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%相補的な配列を含む。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して-16～-496の領域内の保持されたイントロン5にある。いくつかの実施形態において、ASOは、SEQ ID NO: 141-237のいずれか1つに少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%相補的な配列を含む。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、保持されたイントロン5の3'スプライス部位に対して+2e～+212eの領域内のエクソン6にある。いくつかの実施形態において、ASOは、SEQ ID NO: 238-280のいずれか1つに少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、あるいは100%相補的な配列を含む。

#### 【0022】

前述の組成物のいずれかのいくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能的RNAをコードする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を調節することにより、標的タンパク質または機能的RNAの量を

増加させない。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能的RNAをコードする遺伝子の突然変異に起因する異常なスプライシングを調節することにより、機能的RNAまたは機能的タンパク質の量を増加させない。いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体は、全長のmRNA前駆体、あるいは野生型のmRNA前駆体の部分的なスプライシングによって生成された。いくつかの実施形態において、標的タンパク質または機能的RNAをコードするmRNAは、全長の成熟mRNA、あるいは野生型の成熟mRNAである。いくつかの実施形態において、生成された標的タンパク質は全長のタンパク質あるいは野生型のタンパク質である。いくつかの実施形態において、保持されたイントロンは律速イントロンである。いくつかの実施形態において、保持されたイントロンは前記RIC mRNA前駆体で最も豊富な保持されたイントロンである。いくつかの実施形態において、保持されたイントロンは前記RIC mRNA前駆体で2番目に豊富な保持されたイントロンである。

10

#### 【0023】

前述の組成物のいずれかのいくつかの実施形態において、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ロジアミデート結合を含む骨格修飾を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーはアンチセンスオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、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、あるいは2'-O-メトキシエチル部分を含む。いくつかの実施形態において、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分を含む。いくつかの実施形態において、それぞれの糖部分は修飾された糖部分である。いくつかの実施形態において、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、あるいは12~15の核酸塩基からなる。

20

30

#### 【0024】

いくつかの実施形態では、前述のアンチセンスオリゴマーのいずれかと賦形剤を含む医薬組成物が本明細書で開示される。いくつかの実施形態では、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、あるいは静脈内注射によって前述の医薬組成物を投与することにより、必要としている被験体を処置する方法が本明細書で開示される。

#### 【0025】

いくつかの実施形態において、医薬組成物が本明細書に開示され、該医薬組成物は、不足しているPKD2 mRNA転写産物の標的配列にハイブリダイズされるアンチセンスオリゴマーであって、不足しているPKD2 mRNA転写産物が保持されたイントロンを含み、アンチセンスオリゴマーが不足しているPKD2 mRNA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、アンチセンスオリゴマーと、薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。いくつかの実施形態において、不足しているPKD2 mRNA転写産物はPKD2 RIC mRNA前駆体転写産物である。いくつかの実施形態において、PKD2 RIC mRNA前駆体転写産物の標的部分は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して+500~保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して-500までの領域内の保持されたイントロンにある。いくつかの実施形態において、PKD2 RIC mRNA前駆体転写産物は、SEQ ID NO: 1に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を備えた遺伝子配列によってコードされる。いくつかの

40

50

実施形態において、PKD2 RIC mRNA前駆体転写産物は、SEQ ID NO : 2に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む。いくつかの実施形態において、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ロジアミデート結合を含む骨格修飾を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーはアンチセンスオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、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、あるいは2'-O-メトキシエチル部分を含む。いくつかの実施形態において、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分を含む。いくつかの実施形態において、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、あるいは12~15の核酸塩基を含む。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、PKD2 RIC mRNA前駆体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%、あるいは100%相補的である。いくつかの実施形態において、PKD2 RIC mRNA前駆体転写産物の標的部分は、SEQ ID NO : 281内にある。いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、SEQ ID NO : 3-280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%、あるいは99%の配列同一性であるヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、SEQ ID NO : 3-280から選択されたヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、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、あるいは静脈内注射のために製剤される。

#### 【0026】

いくつかの実施形態では、PC-2タンパク質の機能的な形態をコードする十分に処理されたPKD2 mRNA転写産物を生成するべく、保持されたイントロンの除去を促すために不足しているPKD2 mRNA転写産物の処理を誘発する方法が本明細書で開示され、該方法は：(a)被験体の標的細胞へアンチセンスオリゴマーを接触させる工程と、(b)不足しているPKD2 mRNA転写産物へアンチセンスオリゴマーをハイブリダイズする工程であって、不足しているPKD2 mRNA転写産物が、PC-2タンパク質の機能的な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、工程と、(c)PC-2タンパク質の機能的な形態をコードする十分に処理されたPKD2 mRNA転写産物を生成するために不足しているPKD2 mRNA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と、(d)十分に処理されたPKD2 mRNA転写産物からPC-2タンパク質の機能的な形態を翻訳する工程を含む。いくつかの実施形態において、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。いくつかの実施形態において、不足しているPKD2 mRNA転写産物はPKD2 mRNA前駆体転写産物である。

#### 【0027】

いくつかの実施形態では、PC2タンパク質の量と活性の不足によって引き起こされた疾病を抱える被験体を処置する方法が本明細書で開示され、該方法は、SEQ ID NO : 3-280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%、あるいは99%の配列同一性を備えた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。

#### 【0028】

< 参照による組み込み >

本明細書で言及される出願公開、特許、および特許出願はすべて、あたかも個々の出願公開、特許、あるいは特許出願がそれぞれ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かのような同じ程度、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0029】

本発明の新規な特徴は、とりわけ添付の特許請求の範囲において説明される。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】保持されたイントロン含有(RIC)mRNA前駆体の転写産物の例示的概略図を示す。図1では、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」と標識された数字はエクソンであり、標識され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」と標識された数字はエクソンであり、標識され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、イントロンの標的領域は、保持されたイントロンの5'スプライス部位(左の矢印)に対する+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)に対する-16のヌクレオチドを含む。実施形態では、ASOスクリーニングの、イントロンの標的領域は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して+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して-16から-100のヌクレオチドを含む。エクソンの標的領域は、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エクソンの+2eから-4eのヌクレオチドを含む。「n」あるいは「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一致させる必要はない。

【図2A】核内遺伝子出力の標的とされた増強(TANGO)アプローチの概略図を示す。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(接続ライン)から成る標的遺伝子のmRNA前駆体の転写産物は、mRNAを産生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(RIC)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産生に至ることなく劣化する。

【図2B】核内遺伝子出力の標的とされた増強(TANGO)アプローチの概略図を示す。図2Bは、核と細胞質区画に分割された同じ細胞の例を示す。アンチセンスオリゴマー(ASO)による処置は、イントロン1のスプライシングを促進し、mRNAの増加をもたらす、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】イントロン5をもつPKD2遺伝子におけるイントロン保持を詳細に示す。RNA配列決定(RNAseq)を用いた、PKD2遺伝子におけるイントロン保持事象の特定は、UCSCゲノムブラウザで視覚化されて示される。上パネルは、腎臓の上皮細胞内に発現し、細胞質(上部)あるいは核分画(底部)のいずれかに局在するPKD2転写産物に相当する読み取り密度を示す。このパネルの下部に、PKD2遺伝子を図示したものが、スケールに合わせて示される。読み取り密度は、ピークで示される。最も高い読み取り密度は、エクソン(ブラックボックス)に相当する。一方、いずれの細胞分画においてもイントロンの大半で読み取りは観察されない。細胞質分画と比較してより高い読み取り

10

20

30

40

50

密度は、核分画のイントロン5（矢印が示す部分）に対して検知され、これはイントロン5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、核内に保持され、細胞質には輸送されない。腎臓の上皮細胞内のイントロン5の読み取り密度は、下パネルに詳細に示される。

【図4】例示的PKD2遺伝子イントロン5（IVS 5）ASOウォーク（walk）を示す。2'-O-Me ASO、PS骨格を使用して、5'スプライス部位のすぐ下流、あるいは3'スプライス部位の上流にある配列を標的とする、PKD2 IVS 5に対して行われたASOウォークが図示される。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。PKD2エクソン-イントロン構造はスケールに合わせて示される。

【図5】NM\_000297に相応するPKD2のRefSeq Geneの概略を図示する。イントロン5のイントロン保持率（PIR）が詳述される。

【発明を実施するための形態】

【0030】

1つを超える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に含まれる個々のイントロンは、異なる効率性で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mRNAだけが、続く細胞質での翻訳のために核膜孔を通して輸送される。スプライシングされていない、あるいは部分的にスプライシングされた転写産物は、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ることもある、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、細胞質での翻訳に先立ち、遺伝子発現における律速的な転写後の工程である。

【0031】

遺伝病である多発性嚢胞腎で不足しているPC-2タンパク質をコードする、かなりのレベルの部分的にスプライシングされたPKD2遺伝子の転写産物が、ヒト細胞の核内で発見されている。これらのPKD2 mRNA前駆体種は少なくとも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の定常状態の産生と翻訳されたPC-2タンパク質レベルを増加させるための、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PKD2イントロンのスプライシングを増加させ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PKD2 mRNA前駆体のイントロスプライス部位における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、PC-2欠損症に起因する疾病を処置するために、本発明の方法を用いてPC-2タンパク質を増加させる。

【0032】

他の実施形態では、必要とする被験体の疾病を処置するために、本発明の方法を使用してPC-2産生を増加させる。実施形態では、被験体は、PC-2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PC-2の増加が疾病を緩和する疾病を有する。実施形態では、疾病はPC-2ハプロ不全によって引き起こされる。

多発性嚢胞腎

【0033】

多発性嚢胞腎（PKD）は、腎嚢胞の発達および様々な腎外の症状発現に特徴づけられる常染色体優性多系統障害である（Torres and Harris, 2009）。主たる臨床的および病理的所見は、腎嚢胞の発達および腫脹に起因する腎疾患であり、それは結果として嚢腫体積の増加と直接関連する腎臓体積の増加のような、腎臓の症状発現をもたらす。他のPKD発現は、高血圧症、内皮の血管拡張、収縮性の一酸化窒素合成酵素活性、多発性肝嚢胞症、頭蓋内動脈瘤、胸部大動脈解離、および冠動脈瘤を含む脈管の症状発現、年齢70までに末期腎疾患（ESRD）へと至る進行性の腎不全を含む。胎

児の超音波検査を用いることで、子宮内で、あるいは出生時に、PKDを診断することができるが、PKDは一般的に腎臓の超音波によって判定される腎嚢胞の検出により老年期に診断される。世界的なPKD有病率は、～1.2男女比率で、1:400から1:1000の間にあると推測される(Torres and Harris, 2009)。

#### 【0034】

PKD1あるいはPKD2遺伝子いずれかの突然変異は、PKDを引き起こすと報告されている。PKD1の突然変異は典型的に、PKD2よりも若年期に発現し(ESRD時の年齢はそれぞれ、PKD1は54.3、PKD2は74.0)、結果として、典型的により若年期の嚢腫発現に起因するより重篤な疾病状態をもたらす(Torres and Harris, 2009)。病態生理学におけるこの違いゆえに、PKDの遅発性の形態は、一般的にPKD2遺伝子中の突然変異から発生する。PKD2は、PC-2タンパク質、纖毛モチーフのある短いN末端細胞質領域を含む968アミノ酸タンパク質、6つの膜貫通領域、および短いC末端部分をコードする。PKD2遺伝子のヒトゲノム配列は、NCBI Gene ID 5311に明らかにされており、タンパク質はUniProtKB/Swiss-Prot:Q13563-1に明らかにされており、例えば、Motchizuki T, et al., 1996, "PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein," Science 272:1339-1342に記載され、参照により本明細書に組み込まれる。PKD2 mRNA配列は、NCBI Reference Sequence:NM\_000297.3.2に明らかにされており、Yang Y, et al., 2015, "Oligomerization of the polycystin-2 C-terminal tail and effects on its Ca<sup>2+</sup> binding properties," J. Bio Chem. 290(16), 10544-10554に記載され、いずれの文献も参照により本明細書に組み込まれる。PKD2における突然変異は、最も蔓延している遺伝性の嚢胞性腎疾患である遅発性常染色体優性PKD(ADPKD)をもたらす。

#### 【0035】

PKD2遺伝子は、15のエクソンから成り、染色体4p22.1に位置する。PKDにおけるPKD2の突然変異はADPKD Mutation Database(PKD Foundantion, 8330 Ward Parkway, Suite 510, Kansas City, MO 64114により管理)で報告されたように、PKD2の95の短縮型変異を伴い、全タンパク質に広がる。PKD2におけるホモ接合の不足は、出生と適合しないと予測されるため、ハプロ不全はADPKD疾患の発現をもたらすもっとも有力なメカニズムである(Torres and Harris, 2009)。ナンセンスおよび挿入/欠失などの突然変異は、一般的なADPKD2表現型表示機能ハプロ不全に関連する。結果としてPC-2-D511Vタンパク質発現をもたらすPKDミスセンス変異は、安定性の観点から、野生型PC-2と判別不能であると予測された(Reynolds, et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10:2342-2351)。PC-2-D511V変異体は、その安定性にもかかわらず、イオンチャネルとして作用する能力の予測された崩壊が原因で、機能不全を示した。したがって、初期活性が崩壊させられた場合、安定した変異体であっても表現型を引き起こす場合がある。その疾患は、例えば、参照により本明細書に組み込まれるOMIM#613095(Online Mendelian Inheritance in Man, Johns Hopkins University, 1966-2015)に記載されている。

保持されたイントロン含有mRNA前駆体(RIC mRNA前駆体)

#### 【0036】

実施形態では、本明細書に開示される方法は、細胞核内でPKD2遺伝子から転写され、PC-2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

10

20

30

40

50



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PKD2 mRNAを産生するための、特定されたPKD2 RIC mRNA前駆体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を用いて誘発される。結果としてもたらされる成熟PKD2 mRNAは、細胞質に輸送され翻訳される。それによって被験体の細胞中のPC-2タンパク質量を増加させ、多発性嚢胞腎疾患の症状を緩和する。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とされた増強(TANGO)として知られる。

PKD2核の転写産物

【0037】

本明細書の実施例に記載されるように、PKD2遺伝子はイントロン保持事象に対して分析を施され、イントロン5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、腎臓の上皮細胞に発現したPKD2転写産物を示し、細胞質あるいは核分画のいずれかに局在した。いずれの分画においても、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み取り密度が、核分画のイントロン5に対して検知され、これはイントロン5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す。保持されたイントロン含有mRNA前駆体の転写産物は、主として核内に蓄積し、PC-2タンパク質に翻訳されない。イントロン5の読み取り密度は、18%のイントロン保持を示した(図5)。イントロン5のイントロン保持率(PIR)の値は、4つの値(23、13、22および14)を平均化することにより得られた。それぞれの値は、4つの異なるアルゴリズムのうちの1つを使用して、腎臓の上皮細胞において決定された。イントロン保持事象を特定するための、ENCODEデータの分析(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)は、イントロン5を保持されたものとして判定しなかった。

【0038】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるASOは、PKD2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5を含むPKD2のゲノム配列からの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5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、PKD2 RIC mRNA前駆体配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン5を含むPKD2 RIC mRNA前駆体配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ ID NO:2で示されるPKD2 RIC mRNA前駆体配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン5を含むSEQ ID NO:2で示されるPKD2 RIC mRNA前駆体配列を標的とする。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるASOは、SEQ ID NO:281を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ ID NO:3-280で示されるいずれか1つの配列を有する。

【0039】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン5を含むPKD2 RIC mRNA前駆体のエクソン5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5を含むPKD2 RIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも上流(あるいは5')のエクソン5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5を含むPKD2 RIC mRNA前駆体の5'スプライ

ス部位よりも約4から約204のヌクレオチド上流（あるいは5'）のエクソン配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ ID NO: 3-43で示されるいずれか1つの配列を有する。

【0040】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン5を含むPKD2 RIC mRNA前駆体内のイントロン5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5を含むPKD2 RIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも下流（あるいは3'）のイントロン5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5を含むPKD2 RIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも約6から約497のヌクレオチド下流（あるいは3'）の、イントロン5配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ ID NO: 44-140で示されるいずれか1つの配列を有する。

10

【0041】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン5を含むPKD2 RIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも上流（あるいは5'）のイントロン5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5を含むPKD2 RIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも約16から約496のヌクレオチド上流（あるいは5'）のイントロン5配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ ID NO: 141-237で示されるいずれか1つの配列を有する。

20

【0042】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン5を含むPKD2 RIC mRNA前駆体内のエクソン6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5を含むPKD2 RIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも下流（あるいは3'）のエクソン6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5を含むPKD2 RIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも約2から約212のヌクレオチド下流（あるいは3'）のエクソン6配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ ID NO: 238-280で示されるいずれか1つの配列を有する。

【0043】

30

実施形態では、PKD2 RIC mRNA前駆体の標的部分はイントロン5にある。本明細書で使用されるPKD2イントロンの番号付けは、NM\_000297.3におけるmRNA配列に相当する。実施形態では、RIC mRNA前駆体の標的部分へのASOのハイブリダイゼーションは、結果として、保持されたイントロン5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）におけるスプライシングの増強と、その後のPC-2タンパク質産生の増加をもたらす。異なるPKD2 mRNAアイソフォーム配列を参照することで、イントロンの番号付けは変更しうると解される。当業者は、本明細書で提供されるイントロン配列に基づき、あるいはNM\_000297.3におけるmRNA配列を参照して得られるイントロン番号を使用することで、任意のPKD2アイソフォームにおいて対応するイントロン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、あるいはNM\_000297.3におけるmRNA配列を参照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とする任意のPKD2アイソフォームの隣接するエクソンの配列を判定することができる。実施形態では、本発明の組成物および方法は、例えば参照により本明細書に組み込まれた、Gene ID 5311でのNCBI Gene IDデータベース（生体および科学の情報のNCBI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）に記載される等の、任意の既知のPKD2アイソフォームの発現を増加させるために使用される。

40

50

## P C - 2 タンパク質発現

## 【 0 0 4 4 】

上述したように、A D P K D における P C - 2 突然変異は A D P K D M u t a t i o n D a t a b a s e ( P K D F o u n d a t i o n ) で報告されたように、9 5 P C - 2 短縮型変異を伴い、全タンパク質に広がる。

## 【 0 0 4 5 】

実施形態では、本明細書において記載される方法は、機能的 P C - 2 タンパク質産生を増加させるために使用される。本明細書において使用される用語「機能的」は、例えば多発性嚢胞腎のような、処置される疾病の 1 つ以上の症状を除去するのに必要な活性または量未満の、P C - 2 タンパク質の活性あるいは機能の量を指す。実施形態では、部分的機能的 P C - 2 タンパク質産生を増加させるために、前記方法は使用される。本明細書において使用される「部分的機能的」の用語は、疾患または疾病の 1 つ以上の症状を除去あるいは予防するために必要な P C - 2 タンパク質の活性あるいは機能の量を指す。いくつかの実施形態では、部分的機能的タンパク質あるいは R N A は、完全な機能的タンパク質あるいは R N A に比して、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 %、あるいは少なくとも 9 5 % 少ない活性を持つだろう。

10

## 【 0 0 4 6 】

実施形態では、該方法は、P C - 2 タンパク質をコードする R I C m R N A 前駆体を有する被験体の細胞によって、P C - 2 タンパク質の発現を増加させる方法であり、該被験体は、P C - 2 タンパク質活性の量の不足に起因する多発性嚢胞腎を有し、および該 P C - 2 タンパク質量の不足は、P C - 2 タンパク質のハプロ不全に起因する。そのような実施形態では、被験体は、機能的 P C - 2 タンパク質をコードする第 1 の対立遺伝子と、P C - 2 タンパク質が産生されない第 2 の対立遺伝子を有する。別のそのような実施形態では、被験体は、機能的 P C - 2 タンパク質をコードする第 1 の対立遺伝子と、非機能的 P C - 2 タンパク質をコードする第 2 の対立遺伝子を有する。別のそのような実施形態では、被験体は、機能的 P C - 2 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 P C - 2 タンパク質をコードする第 2 の対立遺伝子を有する。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 P C - 2 タンパク質をコードする）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し、それによって、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、機能的 P C - 2 タンパク質をコードする成熟 m R N A レベルの増加と、被験体の細胞中の P C - 2 タンパク質発現の増加をもたらす。

20

30

## 【 0 0 4 7 】

実施形態では、被験体は、機能的 P C - 2 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 P C - 2 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（機能的 P C - 2 タンパク質をコードする）から転写された R I C m R N A 前駆体の標的部分、または第 2 の対立遺伝子（部分的機能的 P C - 2 タンパク質をコードする）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し、それによって、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、機能的 P C - 2 タンパク質をコードする成熟 m R N A 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 P C - 2 タンパク質発現の増加をもたらす。

40

## 【 0 0 4 8 】

関連する実施形態では、該方法は、タンパク質あるいは機能的 R N A の発現を増加させるために A S O を用いる方法である。実施形態では、A S O は、P C - 2 タンパク質をコードする R I C m R N A 前駆体を有する被験体の細胞中の P C - 2 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、P C - 2 タンパク質の量または機能の不足、例えば多発性嚢胞腎を有する。

50

## 【0049】

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 R I C m R N A 前駆体の転写産物は、本明細書に記載される A S O 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 R I C m R N A 前駆体の転写産物は、A S O 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 R I C m R N A 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 のタンパク質の機能は、第 1 のタンパク質の突然変異または不足を補うことができる。

## 【0050】

10

実施形態では、被験体は：

(a) (i) P C - 2 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、

(i i) P C - 2 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、あるいは

(i i i) P C - 2 タンパク質または機能的 R N A が産生されない、第 1 の変異対立遺伝子；および

(b) (i) P C - 2 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、

(i i) P C - 2 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、あるいは

20

(i i i) P C - 2 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、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、P C - 2 タンパク質をコードする m R N A レベルの増加を引き起こし、被験体の細胞中の標的タンパク質または機能的 R N A の発現の増加をもたらす。

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。

30

## 【0051】

実施形態では、P C - 2 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 P K D 2 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、対照細胞内で産生された P C - 2 をコードする m R N A の量と比較した場合、1 . 1 倍から 1 0 倍に増加する。

## 【0052】

40

実施形態では、P C - 2 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、P C - 2 タンパク質の量あるいは活性の不足に起因する疾病は、P C - 2 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、m R N A 前駆体内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。

## 【0053】

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

50

分的機能的 P C - 2 タンパク質を発現し、その部分的機能的 P C - 2 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 P C - 2 タンパク質を発現し、その非機能的 P C - 2 タンパク質は、1つの対立遺伝子中の、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、本発明の方法を用いて処置された被験体は、1つの対立遺伝子に P K D 2 全遺伝子欠失を有する。

#### 【0054】

実施形態では、被験体は、M 1 K、P 2 4 L、R 2 8 P、A 3 5 D、R 6 0 N、S 8 0 L、Q 1 0 7 D、R 1 1 9 H、G 1 2 1 A、G 1 3 5 V、A 1 4 7 V、A 1 9 0 T、V 2 6 2 M、W 2 9 2 C、R 3 0 6 Q、L 3 1 4 V、R 3 2 2 W、R 3 2 2 Q、R 3 2 5 P、R 3 2 5 Q、C 3 3 1 S、S 3 3 2 A、Y 3 2 4 C、S 3 4 9 P、A 3 5 6 P、A 3 8 4 P、G 3 9 0 S、W 4 1 4 G、G 4 1 8 V、T 4 1 9 A、R 4 2 0 G、A 4 2 1 S、R 4 4 0 S、T 4 4 8 K、I 4 5 2 V、F 4 8 2 C、Y 4 8 7 H、D 5 1 1 V、V 5 1 6 L、L 5 1 7 R、V 5 1 9 M、A 5 5 2 P、I 5 5 6 V、N 5 7 8 D、N 5 8 0 K、M 5 8 3 I、A 6 1 5 T、F 6 2 9 S、C 6 3 2 R、R 6 3 8 C、L 6 5 6 W、L 7 1 5 I、I 7 5 8 V、R 7 9 8 C、M 8 0 0 L、S 8 0 4 N、R 8 0 7 Q、R 8 4 8 Q、D 8 8 6 G、R 8 9 3 G、V 9 0 9 I、D 9 1 9 N、T 9 3 1 M、R 9 4 5 H、あるいは S 9 4 9 F から選択された P C - 2 ミスセンス変異を有する。実施形態では、被験体は、E X 1 \_\_ E X 1 3 d e l、I V S 2 \_\_ 3 ' ( A B C G 2 ) d e l 8 0 k b \*、I V S 2 \_\_ 3 ' ( A B C G 2 ) d e l 9 8 k b、I V S 4 + 1 4 5 2 \_\_ I V S 5 - 9 6 5 d e l 5 7 2 2、S 3 7 8 d e l、F 6 0 5 d e l、I V S 9 \_\_ 3 ' d e l 2 8 k b、2 1 8 2 \_\_ 2 1 8 3 d e l A G、L 7 3 6 \_\_ N 7 3 7 d e l 2、または R 8 7 8 d e l から選択された P C - 2 欠失突然変異を有する。実施形態では、被験体は P C - 2 重複突然変異 E x 3 d u p \* を有する。実施形態では、当技術分野において既知の、あるいは、例えば C h a n g , e t a l . , 2 0 0 5 , R e n F a i l 2 7 : 9 5 - 1 0 0 の文献に記載された任意の P C - 2 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。

P C - 2 タンパク質発現を増加させるための T A N G O の使用

#### 【0055】

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 ( T A N G O ) は、P C - 2 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、P C - 2 タンパク質をコードする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 ) は、細胞の核内にある。P C - 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 P K D 2 R I C m R N A 前駆体を有する細胞を、R I C m R N A 前駆体の標的部分に対して相補的な、アンチセンスオリゴマー ( A S O ) と接触させる。R I C m R N A 前駆体の標的部分への A S O 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。

#### 【0056】

用語「m R N A 前駆体」および「m R N A 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 m R N A 前駆体種を指す。実施形態では、m R N A 前駆体または m R N A 前駆体の転写産物は、5 ' - 7 - メチルグアノシンキャップ、および / またはポリ A 末端を含む。実施形態では、m R N A 前駆体または m R N A 前駆体の転写産物は、5 ' - 7 - メチルグアノシンキャップおよびポリ A 末端の両方を含む。いくつかの実施形態では、m R N A 前駆体の転写産物は、5 ' - 7 - メチルグアノシンキャップ、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 )、m R N A 前駆体の転写産物は非生産的メッセンジャー R N A ( m R N A ) 分子である。

#### 【0057】

10

20

30

40

50

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、当該RIC 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、PC-2タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体に最も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。実施形態では、PC-2タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体に最も保持されたイントロンは、イントロン5である。

#### 【0058】

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15%から約100%、約15%から約95%、約15%から約90%、約15%から約85%、約15%から約80%、約15%から約75%、約15%から約70%、約15%から約65%、約15%から約60%、約15%から約55%、約15%から約50%、約15%から約45%、約15%から約40%、約15%から約35%、約15%から約30%、約15%から約25%、約20%から約100%、約20%から約95%、約20%から約90%、約20%から約85%、約20%から約80%、約20%から約75%、約20%から約70%、約20%から約65%、約20%から約60%、約20%から約55%、約20%から約50%、約20%から約45%、約20%から約40%、約20%から約35%

10

20

30

40

50

、約20%から約30%、約25%から約100%、約25%から約95%、約25%から約90%、約25%から約85%、約25%から約80%、約25%から約75%、約25%から約70%、約25%から約65%、約25%から約60%、約25%から約55%、約25%から約50%、約25%から約45%、約25%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。

#### 【0059】

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。

10

#### 【0060】

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。「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 사용되는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)。

20

#### 【0061】

実施形態では、ASOは、RIC mRNA前駆体において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して+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して-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して+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して-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、位置+6および+100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。

30

#### 【0062】

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 사용되는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た、保持されたイントロンに隣接しているスプライス部位 (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比較的低い頻度を指し得る。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、ここで、「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され得るかまたは除去され得る。

40

#### 【0063】

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-ヌクレオチド配列は、対応する野生型配列

50

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しているエクソンの + 1 e での 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 リポジトリに寄託された公開された参照ゲノムにおける P K D 2 遺伝子に対するヌクレオチド配列を指す。本明細書に使用されるように、「野生型配列」は、N C B I G e n e I D 5 3 1 1 で見られる P K D 2 遺伝子に対する標準配列を指す。また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しているエクソンまたは 3 ' スプライス部位に隣接しているエクソン）の配列中に存在することを示す。

#### 【0064】

該方法は、細胞を、P C - 2 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 P C - 2 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、「接触させる工程」または細胞に投与する工程は、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または輸送する。該方法は、疾病または疾患に関係するまたは疾病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 と疾病または疾患に関係するまたは疾病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）。

#### 【0065】

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、細胞において 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あり得る。

#### 【0066】

実施形態では、P K D 2 R I C m R N A 前駆体を発現する細胞を P K D 2 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、m R N A 前駆体によってコードされた P C - 2 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。

#### 【0067】

実施形態では、細胞を P K D 2 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 / 処置の欠如下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 P C - 2 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 P C - 2 タンパク質の合計量は、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。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あり得る。

#### 【0068】



いくつかの実施形態では、細胞を P K D 2 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、P C - 2 をコードする m R N A の量の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、P C - 2 タンパク質をコードする m R N A、または P C - 2 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産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 % 増加される。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産生された P C - 2 タンパク質をコードする m R N A、または P C - 2 タンパク質をコードする成熟 m R N A の合計量は、未処理の細胞、例えば、未処理の細胞または対照化合物で処理された細胞において産生された成熟 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、または少なくとも約 10 倍増加される。対照化合物は、例えば、P K D 2 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あり得る。

10

20

#### 【0069】

< 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 >

本明細書に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、P C - 2 タンパク質をコードする m R N A、または P C - 2 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、P C - 2 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多発性嚢胞腎を有している被験体において細胞における P C - 2 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、P C - 2 タンパク質をコードする P K D 2 R I C m R N A 前駆体の転写産物から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、P C - 2 タンパク質をコードする m R N A、または P C - 2 タンパク質をコードする成熟 m R N A のレベルが増大し、P C - 2 タンパク質の発現が増大する。

30

#### 【0070】

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か、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性 R N A の発現が増加される。

40

#### 【0071】

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 P K D 2 R I C m R N A 前駆体から正しく除去し、ここで P K D 2 R I C m R N A 前駆体は、完全に機能的な標的タンパク質または機能性 R N A をコードする、野生型遺伝子または対立遺伝子あるいは多形性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。

50

## 【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態では、P C - 2 タンパク質をコードする P K D 2 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、P C - 2 タンパク質をコードする P K D 2 R I C m R N A 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 P K D 2 R I C m R N A 前駆体は、遺伝子または対立遺伝子から転写され、そこから、標的遺伝子または機能性 R N A 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、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した保持されたイントロンの正しい除去は、結果として、等価な野生型タンパク質または機能性 R N A 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性 R N A の産生をもたらす。

10

## 【 0 0 7 3 】

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 P K D 2 R I C m R N A 前駆体から正しく除去し、ここで P K D 2 R I C m R N A 前駆体は、等価な野生型タンパク質または機能性 R N A と比較して低下した機能を有する形態で産生された標的タンパク質または機能性 R N A 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し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、または等価な野生型タンパク質または機能性 R N A と比較したときに部分的に機能的である機能性 R N A の産生をもたらす。

20

## 【 0 0 7 4 】

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、エクソンの部分の除去がない、全イントロンの除去を指す。

## 【 0 0 7 5 】

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、P C - 2 タンパク質をコードする m R N A の量または P K D 2 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調節することによる P C - 2 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、R N A 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、R T - P C R 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、少なくとも 1 0 % または 1 . 1 倍の対象のスプライシングされた種の量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 P C - 2 タンパク質をコードする m R N A 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 1 0 % から 1 0 0 % または 1 . 1 倍から 1 0 倍であるレベルでの増加または減少に基づいて判定される。

30

## 【 0 0 7 6 】

実施形態では、本明細書に記載される方法は、P K D 2 R I C m R N A 前駆体が、野生型 P K D 2 m R N A 前駆体の部分的スプライシングによって産生された方法である。

40

実施形態では、該方法は、P K D 2 R I C m R N A 前駆体が、全長野生型 P K D 2 m R N A 前駆体の部分的スプライシングによって産生された方法である。実施形態では、P K D 2 R I C m R N A 前駆体は、全長 P K D 2 m R N A 前駆体の部分的スプライシングによって産生された。これらの実施形態では、全長 P K D 2 m R N A 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性を有し得る。

## 【 0 0 7 7 】

実施形態では、P C - 2 タンパク質をコードする 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。これらの実施形態では、全長成熟 m R N A は、野生型成熟 m

50

R N A によってコードされた P C - 2 タンパク質の活性と比較して、成熟 m R N A によってコードされた標的タンパク質または機能性 R N A の活性に影響しない多型性を有し得る。

#### 【 0 0 7 8 】

##### < アンチセンスオリゴマー >

本開示の一態様は、P K D 2 R I C m R N A 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。本明細書で用されるように、用語「A S O」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、P K D 2 R I C m R N A 前駆体 ) の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。A S O は、標的配列に相補的なまたはほぼ相補性的である ( 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 ) 正確な配列を有し得る。A S O は、標的核酸 ( 例えば、m R N A 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、A S O 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。A S O の設計は、m R N A 前駆体の転写産物の標的部分の核酸配列、またはゲノムまたは細胞 m R N A 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類似した核酸配列の発生を考慮に入れることができ、その結果、A S O 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「R e d u c i n g N o n s e n s e - M e d i a t e d m R N A D e c a y」の W O 2 0 1 5 / 0 3 5 0 9 1 として公開された P C T 国際出願番号 P C T / U S 2 0 1 4 / 0 5 4 1 5 1 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。

10

20

#### 【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態では、A S O は、標的核酸または R I C m R N A 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、3 7 より実質的に高い融解温度 ( T m ) で、好ましくは少なくとも 5 0 で、および典型的に 6 0 からおよそ 9 0 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、ストリンジェントな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 p H で、T m は、標的配列の 5 0 % 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。

30

#### 【 0 0 8 0 】

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 つと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 ( A S O ) の配列は、ハイブリダイズするその標的核酸の配列に 1 0 0 % 相補的である必要はない。特定の実施形態では、A S O は、標的とされる標的核酸配列内の標的部位に対して、少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、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 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、または少なくとも 9 9 % 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 2 0 の核酸塩基のうちの 1 8 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 A S O は、9 0 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 ( i n t e r s p e r s e d ) 、互いにまたは相補的な核酸塩基に隣接

40

50

している必要はない。A S Oの標的核酸の領域とのパーセント相補性は、当該技術分野で既知のB L A S T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P o w e r B L A S Tプログラム（A l t s c h u l e t a l . , J . M o l . B i o l . , 1990, 215, 403-410; Z h a n g a n d M a d d e n , G e n o m e R e s . , 1997, 7, 649-656）を慣例的に使用して判定され得る。

#### 【0081】

A S O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、隣接しているかまたは隣接していないかもしれない。A S Oは、m R N A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、介在するまた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、A S Oは、標的m R N A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、A S Oは、A S O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、m R N A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。

10

#### 【0082】

本明細書に記載されるA S Oは、R I C m R N A前駆体の標的部分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「A S O」は、オリゴヌクレオチド、および標的m R N A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（P N A）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。A S O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つまたは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、修飾されたまたは置換された糖類および/または修飾された骨格を有するヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、A S O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A S Oの化学修飾およびのA S O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D i a s a n d S t e i n , M o l . C a n c e r T h e r . 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。

20

30

#### 【0083】

A S O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m R N A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。

#### 【0084】

40

本明細書に記載されるA S O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「オリゴマー連鎖」は、交換可能に使用され、A S O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'ホスホジエステル連鎖を含む。本明細書に記載されるA S Oの骨格構造またはオリゴマー連鎖は、（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、ホスホロセレノエート、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（p h o s p h o r a n i l a d a t e）、ホスホラミデート（p h o s p h o r a m i d a t e）などを含む。例えば、L a P l a n c h e , e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s . 14:9081 (1986); S t e c , e t a l . , J . A m . C h e m . S o c . 106:6077 (1984), S t e

50

in, 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。いく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。いくつかの実施形態では、骨格修飾は、ホスホロチオエート連鎖である。いくつかの実施形態では、骨格修飾は、ホスホラミデート連鎖である。

#### 【0085】

実施形態では、ASO骨格のリンヌクレオチド間の連鎖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連鎖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利き手(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、本開示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連鎖を有する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ASTE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%ある、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%含む、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ASTEレオマー純度を有するASOを含む。

#### 【0086】

実施形態では、ASOは、そのリンヌクレオチド間の連鎖で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Rp、少なくとも約55%のRp、少なくとも約60%のRp、少なくとも約65%のRp、少なくとも約70%のRp、少なくとも約75%のRp、少なくとも約80%のRp、少なくとも約85%のRp、少なくとも約90%のRp、または少なくとも約95%のRpと、残りのSp、あるいは約100%のRp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ASOのいずれかを含む、本発明の方法に使用されるASOは、約10%

から約 100% の R p、約 15% から約 100% の R p、約 20% から約 100% の R p、約 25% から約 100% の R p、約 30% から約 100% の R p、約 35% から約 100% の R p、約 40% から約 100% の R p、約 45% から約 100% の R p、約 50% から約 100% の R p、約 55% から約 100% の R p、約 60% から約 100% の R p、約 65% から約 100% の R p、約 70% から約 100% の R p、約 75% から約 100% の R p、約 80% から約 100% の R p、約 85% から約 100% の R p、約 90% から約 100% の R p、または約 95% から約 100% の R p、約 20% から約 80% の R p、約 25% から約 75% の R p、約 30% から約 70% の R p、約 40% から約 60% の R p、または約 45% から約 55% の R p と、残りの S p を含む。

#### 【0087】

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 - 100% の S p、少なくとも約 5% の S p、少なくとも約 10% の S p、少なくとも約 15% の S p、少なくとも約 20% の S p、少なくとも約 25% の S p、少なくとも約 30% の S p、少なくとも約 35% の S p、少なくとも約 40% の S p、少なくとも約 45% の S p、少なくとも約 50% の S p、少なくとも約 55% の S p、少なくとも約 60% の S p、少なくとも約 65% の S p、少なくとも約 70% の S p、少なくとも約 75% の S p、少なくとも約 80% の S p、少なくとも約 85% の S p、少なくとも約 90% の S p、または少なくとも約 95% の S p と、残りの R p、あるいは約 100% 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 10% から約 100% の S p、約 15% から約 100% の S p、約 20% から約 100% の S p、約 25% から約 100% の S p、約 30% から約 100% の S p、約 35% から約 100% の S p、約 40% から約 100% の S p、約 45% から約 100% の S p、約 50% から約 100% の S p、約 55% から約 100% の S p、約 60% から約 100% の S p、約 65% から約 100% の S p、約 70% から約 100% の S p、約 75% から約 100% の S p、約 80% から約 100% の S p、約 85% から約 100% の S p、約 90% から約 100% の S p、または約 95% から約 100% の S p、約 20% から約 80% の S p、約 25% から約 75% の S p、約 30% から約 70% の S p、約 40% から約 60% の S p、または約 45% から約 55% の S p と、残りの R p を含む。

#### 【0088】

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、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としては、2' - O - メチル (2' - O - Me)、2' - O - メトキシエチル (2' MOE)、2' - O - アミノエチル、2' F; N3' - > P5' 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 (guanidinium)、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。いくつかの実施形態では、糖部修飾は、2' - O - Me、2' F、および 2' MOE から選択される。いくつかの実施形態では、糖部修飾は、ロックド核酸 (LNA) におけるような追加の架橋結合である。いくつかの実施形態では、糖アナログは、ホスホロジアミデートモルホリノ (PMO) などのモルホリン環を含有している。いくつかの実施形態では、糖部は、リボフラノシルまたは 2' デオキシリボフラノシルの修飾を含む。いくつかの実施形態では、糖部は、2' 4' 抑制された (constrained) 2' O - メチルオキシエチル (cMOE) 修飾を含む。いくつかの実施形態では、糖部は、cEt 2' , 4' 抑制された 2' - O エチル BNA 修飾を含む。いくつかの実施形態では、糖部は、トリシクロ DNA (tcDNA) 修飾を含む。いくつかの実施形態では、糖部は、エチレン核酸 (ENA) 修飾を含む。いく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 Re

10

20

30

40

50

lated 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。

【0089】

いくつかの例では、ASOの各単量体は、同じ方法で修飾され、例えば、ASOの骨格の各連鎖はホスホロチオエート連鎖を含む、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。いくつかの例では、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連鎖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。

10

【0090】

いくつかの実施形態では、ASOは、1つ以上の骨格修飾を含む。いくつかの実施形態では、ASOは、1つ以上の糖部修飾を含む。いく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。いく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。いく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。いく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のいずれかまたは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または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または任意の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；細胞および/または細胞の核への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。

20

【0091】

いくつかの実施形態では、ASOは、2'-O-（2-メトキシエチル）（MOE）の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いく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、Geary, et al., J Pharmacol Exp Ther. 2001; 296(3): 890-7; Geary, et al., J Pharmacol Exp Ther. 2001; 296(3): 898-904を参照。

30

【0092】

ASOを合成する方法は当業者に既知である。代替的にまたは加えて、ASOは商用源から得られ得る。

【0093】

40

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。いくつかの態様では、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

50

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。

#### 【0094】

いくつかの実施形態において、ASOは、PKD2 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PKD2 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り、その部分に結合する(図1)。いくつかの実施形態において、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して、約+6から約+500の領域内にあるPKD2 RIC mRNA前駆体の標的部分に対して相補的である。いくつかの実施形態において、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。いくつかの実施形態において、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して、約+6から約+497の間の領域内にあるPKD2 RIC mRNA前駆体の標的部分に対して相補的であることもある。いくつかの態様では、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、約+6から約+500、約+6から約+490、約+6から約+480、約+6から約+470、約+6から約+460、約+6から約+450、約+6から約+440、約+6から約+430、約+6から約+420、約+6から約+410、約+6から約+400、約+6から約+390、約+6から約+380、約+6から約+370、約+6から約+360、約+6から約+350、約+6から約+340、約+6から約+330、約+6から約+320、約+6から約+310、約+6から約+300、約+6から約+290、約+6から約+280、約+6から約+270、約+6から約+260、約+6から約+250、約+6から約+240、約+6から約+230、約+6から約+220、約+6から約+210、約+6から約+200、約+6から約+190、約+6から約+180、約+6から約+170、約+6から約+160、約+6から約+150、約+6から約+140、約+6から約+130、約+6から約+120、約+6から約+110、約+6から約+100、約+6から約+90、約+6から約+80、約+6から約+70、約+6から約+60、約+6から約+50、約+6から約+40、約+6から約+30、または約+6から約+20の領域内の標的部分に対して相補的である。

#### 【0095】

いくつかの実施形態において、ASOは、PKD2 RIC mRNA前駆体において保持されたイントロンの5'スプライス部位の上流(5'の方向)であるPKD2 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、負の数で示された方向)に対して相補的であり、その部分に結合する(図1)。いくつかの実施形態において、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して、約-4eから約-210eの領域内にあるPKD2 RIC mRNA前駆体の標的部分に対して相補的である。いくつかの実施形態において、ASOは、5'スプライス部位に対して、-1eから-3eまでのヌクレオチド(5'スプライス部位の上流に位置付けられた最初の5つのヌクレオチド)には相補的ではない。いくつかの実施形態において、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して、約-4eから約-204eの間の領域内にあるPKD2 RIC mRNA前駆体の標的部分に対して相補的であることもある。いくつかの態様では、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、約-4eから約-210e、約-4eから約-200e、約-4eから約-190e、約-4eから約-180e、約-4eから約-170e、約-4eから約-160e、約-4eから約-150e、約-4eから約-140e、約-4eから約-130e、約-4eから約-120e、約-4eから約-110e、約-4eから約-100e、約-4eから約-90e、約-4eから約-80e、約-4eから約-70e、約-4eから約-60e、約-4eから約-50e、約-4eから約-40e、約-4eから約-30e、または



約 - 4 e から約 - 2 0 e の領域内にある標的部分に対して相補的である。

【 0 0 9 6 】

いくつかの実施形態において、A S O は、P K D 2 R I C m R N A 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 ) である P K D 2 R I C m R N A 前駆体の標的領域 ( 例えば負の数で示された方向 ) に対して相補的である ( 図 1 ) 。いくつかの実施形態において、A S O は、保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対して、約 - 1 6 から約 - 5 0 0 の領域内にある P K D 2 R I C m R N A 前駆体の標的部分に対して相補的である。いくつかの実施形態において、A S O は、3 ' スプライス部位に対して、- 1 から - 1 5 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 1 5 のヌクレオチド ) には相補的ではない。いくつかの実施形態において、A S O は、保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対して、- 1 6 から - 4 9 6 の領域内にある P K D 2 R I C m R N A 前駆体の標的部分に対して相補的である。いくつかの態様では、A S O は、保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対する、約 - 1 6 から約 - 5 0 0 、約 - 1 6 から約 - 4 9 0 、約 - 1 6 から約 - 4 8 0 、約 - 1 6 から約 - 4 7 0 、約 - 1 6 から約 - 4 6 0 、約 - 1 6 から約 - 4 5 0 、約 - 1 6 から約 - 4 4 0 、約 - 1 6 から約 - 4 3 0 、約 - 1 6 から約 - 4 2 0 、約 - 1 6 から約 - 4 1 0 、約 - 1 6 から約 - 4 0 0 、約 - 1 6 から約 - 3 9 0 、約 - 1 6 から約 - 3 8 0 、約 - 1 6 から約 - 3 7 0 、約 - 1 6 から約 - 3 6 0 、約 - 1 6 から約 - 3 5 0 、約 - 1 6 から約 - 3 4 0 、約 - 1 6 から約 - 3 3 0 、約 - 1 6 から約 - 3 2 0 、約 - 1 6 から約 - 3 1 0 、約 - 1 6 から約 - 3 0 0 、約 - 1 6 から約 - 2 9 0 、約 - 1 6 から約 - 2 8 0 、約 - 1 6 から約 - 2 7 0 、約 - 1 6 から約 - 2 6 0 、約 - 1 6 から約 - 2 5 0 、約 - 1 6 から約 - 2 4 0 、約 - 1 6 から約 - 2 3 0 、約 - 1 6 から約 - 2 2 0 、約 - 1 6 から約 - 2 1 0 、約 - 1 6 から約 - 2 0 0 、約 - 1 6 から約 - 1 9 0 、約 - 1 6 から約 - 1 8 0 、約 - 1 6 から約 - 1 7 0 、約 - 1 6 から約 - 1 6 0 、約 - 1 6 から約 - 1 5 0 、約 - 1 6 から約 - 1 4 0 、約 - 1 6 から約 - 1 3 0 、約 - 1 6 から約 - 1 2 0 、約 - 1 6 から約 - 1 1 0 、約 - 1 6 から約 - 1 0 0 、約 - 1 6 から約 - 9 0 、約 - 1 6 から約 - 8 0 、約 - 1 6 から約 - 7 0 、約 - 1 6 から約 - 6 0 、約 - 1 6 から約 - 5 0 、約 - 1 6 から約 - 4 0 、または約 - 1 6 から約 - 3 0 の領域内にある標的部分に対して相補的である。

【 0 0 9 7 】

いくつかの実施形態において、A S O は、P K D 2 R I C m R N A 前駆体において保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位の下流 ( 3 ' の方向 ) である P K D 2 R I C m R N A 前駆体の標的領域 ( 例えば正の数で示された方向 ) に対して相補的である ( 図 1 ) 。いくつかの実施形態において、A S O は、保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対して、約 + 2 e から約 + 2 2 0 e の領域内にある P K D 2 R I C m R N A 前駆体の標的部分に対して相補的である。いくつかの実施形態において、A S O は、3 ' スプライス部位に対して、+ 1 e のヌクレオチド ( 3 ' 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 ) には相補的ではない。いくつかの実施形態において、A S O は、保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対して、約 + 2 e から約 + 2 1 2 e の間の領域内にある P K D 2 R I C m R N A 前駆体の標的部分に対して相補的であることもある。いくつかの態様では、A S O は、保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対する、約 + 2 e から約 + 2 2 0 e 、約 + 2 e から約 + 2 1 0 e 、約 + 2 e から約 + 2 0 0 e 、約 + 2 e から約 + 1 9 0 e 、約 + 2 e から約 + 1 8 0 e 、約 + 2 e から約 + 1 7 0 e 、約 + 2 e から約 + 1 6 0 e 、約 + 2 e から約 + 1 5 0 e 、約 + 2 e から約 + 1 4 0 e 、約 + 2 e から約 + 1 3 0 e 、約 + 2 e から約 + 1 2 0 e 、約 + 2 e から約 + 1 1 0 e 、約 + 2 e から約 + 1 0 0 e 、約 + 2 e から約 + 9 0 e 、約 + 2 e から約 + 8 0 e 、約 + 2 e から約 + 7 0 e 、約 + 2 e から約 + 6 0 e 、約 + 2 e から約 + 5 0 e 、約 + 2 e から約 + 4 0 e 、約 + 2 e から約 + 3 0 e 、約 + 2 e から約 + 2 0 e 、または約 + 2 e から約 + 1 0 e の領域内にある標的部分に対して相補的である。

【 0 0 9 8 】

実施形態において、P K D 2 R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイント

10

20

30

40

50

ロンの 5' スプライス部位に対する +100 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 -100 までの領域内に存在する。

【0099】

A S O 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ありうる。いくつかの実施形態において、A S O は 8 から 50 の核酸塩基から成る。例えば、A S O 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。いくつかの実施形態において、A S O は 50 よりも多い核酸塩基から成る。いくつかの実施形態において、A S O は長さが、8 から 50 の核酸塩基、8 から 40 の核酸塩基、8 から 35 の核酸塩基、8 から 30 の核酸塩基、8 から 25 の核酸塩基、8 から 20 の核酸塩基、8 から 15 の核酸塩基、9 から 50 の核酸塩基、9 から 40 の核酸塩基、9 から 35 の核酸塩基、9 から 30 の核酸塩基、9 から 25 の核酸塩基、9 から 20 の核酸塩基、9 から 15 の核酸塩基、10 から 50 の核酸塩基、10 から 40 の核酸塩基、10 から 35 の核酸塩基、10 から 30 の核酸塩基、10 から 25 の核酸塩基、10 から 20 の核酸塩基、10 から 15 の核酸塩基、11 から 50 の核酸塩基、11 から 40 の核酸塩基、11 から 35 の核酸塩基、11 から 30 の核酸塩基、11 から 25 の核酸塩基、11 から 20 の核酸塩基、11 から 15 の核酸塩基、12 から 50 の核酸塩基、12 から 40 の核酸塩基、12 から 35 の核酸塩基、12 から 30 の核酸塩基、12 から 25 の核酸塩基、12 から 20 の核酸塩基、12 から 15 の核酸塩基、13 から 50 の核酸塩基、13 から 40 の核酸塩基、13 から 35 の核酸塩基、13 から 30 の核酸塩基、13 から 25 の核酸塩基、13 から 20 の核酸塩基、14 から 50 の核酸塩基、14 から 40 の核酸塩基、14 から 35 の核酸塩基、14 から 30 の核酸塩基、14 から 25 の核酸塩基、14 から 20 の核酸塩基、15 から 50 の核酸塩基、15 から 40 の核酸塩基、15 から 35 の核酸塩基、15 から 30 の核酸塩基、15 から 25 の核酸塩基、15 から 20 の核酸塩基、20 から 50 の核酸塩基、20 から 40 の核酸塩基、20 から 35 の核酸塩基、20 から 30 の核酸塩基、20 から 25 の核酸塩基、25 から 50 の核酸塩基、25 から 40 の核酸塩基、25 から 35 の核酸塩基、または 25 から 30 の核酸塩基である。いくつかの実施形態において、A S O は長さが 18 ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、A S O は長さが 15 ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、A S O は長さが 25 ヌクレオチドである。

10

20

30

【0100】

いくつかの実施形態において、異なる化学的性質を有するが、R I C m R N A 前駆体の同じ標的部分に対して相補的である 2 つ以上の A S O が使用される。いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体の異なる標的部分に対して相補的である 2 つ以上の A S O が使用される。

【0101】

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、公開文献において述べられている。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、例えば N - アセチルガラクトサミン ( G l u N A c )、N - A c グルコサミン ( G a l N A c ) などの炭水化物、もしくはマンノース (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

40

50

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岐したリンカーを含むことができる。実施形態において、抱合体はアンチセンスオリゴヌクレオチドの3'末端に付いている。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号の「Carbohydrate conjugates as delivery agents for oligonucleotides」に記載されており、引用することで本明細書に組み込まれる。

#### 【0102】

いくつかの実施形態において、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PKD2 RIC mRNA前駆体である。いくつかの実施形態において、用語「細胞」は、細胞の集団を指すこともある。いくつかの実施形態において、細胞は被験体内に存在する。いくつかの実施形態において、細胞は被験体から単離されている。いくつかの実施形態において、細胞はエキスピボである。いくつかの実施形態において、細胞は疾病もしくは疾患関連細胞、または細胞株である。いくつかの実施形態において、細胞はインビトロである（例えば細胞培養液中）。

10

#### 【0103】

##### < 医薬組成物 >

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製剤は、医薬品産業において周知の従来の技術に従って調製することができ、か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製剤は、上記のような任意のアンチセンスオリゴマーの有効量を含むか、または薬学的に許容可能な塩、溶媒和物、それらの水和物もしくはエステル、および薬学的に許容可能な希釈液を含む。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、希釈液または担体を含むこともある。

20

#### 【0104】

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・リスク比に見合う。（例えば、本発明の目的のために引用によって本明細書に組み込まれたS. M. Berge, et al., J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977)を参照）。その塩は、化合物の最終的な単離および精製中に、または遊離塩基の官能基を適切な有機酸と個別に反応させることにより、インサイチュで調製されうる。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、シクロペン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、ヘプタン酸塩、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、ラクチン酸塩、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、チオシアン酸塩、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。

30

40

50

## 【0105】

実施形態において、組成物は、限定されないが、錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、液体シロップ剤、ソフトゲル剤、坐薬および浣腸剤などの多くの可能な剤形いずれかへと製剤される。実施形態において、組成物は、水性媒体、非水性媒体、または混合媒体状の懸濁液として製剤される。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。

10

## 【0106】

本発明の医薬組成物または製剤は、適切で当業者に周知なように、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つ以上の親油性高分子を用いて誘導される。実施形態において、界面活性剤は医薬製剤または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。実施形態において、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成し遂げるために透過促進剤を利用し、例えば、細胞膜を介する拡散を補助する、および/または親油性薬物の浸透性を高める。実施形態において、透過促進剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁塩、キレート剤、または非キレート非界面活性剤である。

20

## 【0107】

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へ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、黒質へのベクターの直接的な送達は、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 brain」に記載されている。

30

## 【0108】

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ために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に対する抗体に連結される。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、アンチセンス組成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

40

50

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(+)メリピオース、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高める方法および材料は、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。

10

20

30

#### 【0109】

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結合される。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、コレステリル部分などの脂質部分、例えばドデカンジオールまたはウンデシルの残基、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖などの脂肪族鎖、または、アダマンタン酢酸が含まれる。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(GluNAc)、またはマンノース(例えばマンノース6-リン酸)、脂質、ポリ炭化水素化合物)を含む部分と結合する。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、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'末端に付いている。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。

#### 【0110】

##### 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」と交換可能に使用されてもよい。個体は哺乳動物でもよく、例えば人間、または、人類以外の霊長類、げっ歯類、ウサギ、ラット、マウス、馬、ロバ、ヤギ、猫、犬、雌牛、ブタ、あるいは羊などの動物である。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であってもよい。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キスピボで投与される。

40

#### 【0111】

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、疾患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疾患のいずれか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疾患のいずれかなどの疾患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患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

50

十分な活性のタンパク質により引き起こされる疾患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、その疾患の家族健康歴のために、そのような疾患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、そのような疾患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、疾患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。

#### 【0112】

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多発性嚢胞腎によって影響を受け、腎臓が最も著しく影響を受ける組織である。本発明のASOは、例えば、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、患者に非経口的に投与されてもよい。

10

#### 【0113】

被験体は、任意の適切なマーカーを使用して、処置への反応について評価される。実施形態では、腎臓病の被験者は、クレアチニン、クレアチニークリアランス、血圧、24時間の尿量、24時間の尿タンパク、vWAgおよびアラキドン酸による血小板凝集を含む、腎臓病についての特定のマーカーを測定することにより、処置への反応について評価される。

#### 【0114】

スプライシングを増強する追加のASOを特定する方法

本発明の範囲内にはまた、特に標的イントロンでのPKD2 RIC mRNA前駆体のスプライシングを増強する追加のASOを特定する（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に特異的にハイブリダイズする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を特定する（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をブロックまたは妨害することがある。当該技術分野において既知の任意の方法が、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的RNA産生の増強）をもたらすASOを特定する（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の特定のの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。

20

30

#### 【0115】

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、一ラウンドのスクリーニングを行う。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'スプライス部位のおよそ100ヌクレオチド上流（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'スプライス部位のおよそ100ヌクレオチド下流まで、および/または、保持されたイントロンの3'スプライス部位のおよそ100ヌクレオチド上流から、標的とされた/保持されたイントロンの3'スプライス部位のおよそ100ヌクレオチド下流（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つのヌクレオチドごとに敷き詰められ得る。例えば、15ヌクレオチドの長さの第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しヌクレオチド+6から+20に特異的にハイブリダイズするように設計され得る。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に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つのヌクレオチドごとに敷き詰められ得る。さらに、ASOは、5'スプライス部位の100ヌクレオチド下流から、3'スプライス部位の100ヌクレオチド上流まで敷き詰められ得る。いくつかの実施形態では、ASOは、5'スプライス部位の

40

50

約 210 ヌクレオチド上流から、5' スプライス部位の約 500 ヌクレオチド下流まで敷き詰められ得る。いくつかの実施形態では、ASO は、3' スプライス部位の約 500 ヌクレオチド上流から、3' スプライス部位の約 220 ヌクレオチド下流まで敷き詰められ得る。

#### 【0116】

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 RIC mRNA 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 によって評価され得る ( 「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得る。標的 mRNA 前駆体によってコードされるタンパク質または機能的 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得る。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。

10

20

#### 【0117】

ASO 「マイクロウォーク」 ( 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得る。ASO マイクロウォークに使用される ASO は、ASO で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る mRNA 前駆体のヌクレオチド酸配列をさらに改良する ( refine ) ために、1 つのヌクレオチドごとに敷き詰められる。

30

#### 【0118】

標的イントロンのスプライシングを促進する ASO によって定義される領域は、1 - nt 工程 ( 1 - nt steps ) で配置された ASO、ならびに、典型的には 18 - 25 nt である、より長い ASO を含む、ASO 「マイクロウォーク」によって、より詳細に調査される。

#### 【0119】

上記で 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り、ASO マイ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 によって評価され得る ( 「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することは、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 前駆体の割合、スプライシングの速度、またはスプライシングの程度は、本明細書に記載される ASO を使用して改善され得る。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的 RNA の量も、各 ASO が所望の効果 (

40

50

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得る。ウェスタンブロットティング、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しおよび/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。

#### 【0120】

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、インビボで試験され得る。ASOの投与に適した経路は、ASOの送達が望まれる疾患および/または細胞型に応じて変化し得る。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得る。投与後に、モデル動物の細胞、組織、および/または臓器は、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得る。動物モデルはまた、疾患または疾患重症度の表現型の徴候または行動的な徴候であり得る。

#### 【0121】

##### <実施例>

以下の実施例は本発明の例証的な実施形態を提供する。当業者であれば、本開示の精神または範囲を変更することなく実行され得る多数の修正および変更を認識するであろう。こうした修正と変更は本開示の範囲内に包含される。実施例はいかなる意味でも本明細書中に記載される開示を限定するものではない。

#### 【0122】

実施例1：次世代配列決定を用いたRNAseqによるPKD2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PKD2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のショットガン配列決定を実行した。このために、腎上皮細胞の核および細胞質の分画からのpolyA<sup>+</sup> RNAを分離し、IlluminaのTruSeq Stranded mRNAライブラリPrepキットを用いてcDNAライブラリを構築した。ライブラリを対末端配列決定(pair-end sequenced)し、結果として、ヒトゲノム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(2009年2月、GRCh37/hg19アセンブリ)。PKD2についての配列決定の結果を、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Rosenbloom, et al., 2015, "The UCSC Genome Browser database: 2015 update," 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た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得る。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。ピークをPKD2エクソン領域およびイントロン領域に一致させられるように、(読み取りシグナルの下に)UCSCゲノムブラウザによってPKD2の模式図(縮尺通りに描かれている)が提供される。このディスプレイに基づいて、HCNの核分画において高い読み取り密度を有するが、(図3の下ダイアグラム中のイントロン5について示されるように)これらの細胞の細胞質分画においては読み取りが非常に低いまたは無い、一つのイントロン(示されるように、イントロン5)を特定した。これは、イントロン5が保持され、イントロン5含有転写産物が核内に残っていることを示し、この保持さ



れたPKD2 RIC mRNA前駆体が、細胞質に排出されないので、非生産的であることを示唆している。

#### 【0123】

実施例2：PKD2のASOウォーク標的イントロン5の設計

ASOウォークは、本明細書中（図4；表1、SEQ ID NOS：3～280）に記載された方法を使用して、イントロン5を標的とするよう設計された。ヌクレオチド+497から-204eにおよびイントロン5の5'スプライス部位のすぐ上流および下流の領域、および、およびヌクレオチド-496から212eに及ぶイントロン5の3'スプライス部位のすぐ上流および下流の領域が、保持されたイントロン5 PKD2 RIC mRNA前駆体を標的とするようにASOを設計するために利用される。表1は、設計された例示的なASOおよびそれらの標的配列を列挙する。この設計から、5ヌクレオチド間隔だけシフトした2'-O-MeRNA、PS骨格、18量体ASOを産生し、PC-2タンパク質産生を増加させるために、PKD2 RIC mRNA前駆体を標的化するように利用することができる。

#### 【0124】

##### 【表1】

表1. ASOが標的とするPKD2遺伝子のリスト

遺伝子 SEQ ID NO:	mRNA 前駆体 SEQ ID NO:	ASOs	保持される イントロン	標的配列 SEQ ID NO:
PKD2 SEQ ID NO: 1	PKD2:NM_000297 SEQ ID NO: 2	SEQ ID NOS: 3-280	イントロン 5	SEQ ID NO: 281

#### 【0125】

実施例3：PKD2イントロン5のASO標的化による改善したスプライシング効率は転写レベルを増加させる

ASOを使用してPKD2イントロン5のスプライシング効率を改善することにより、PKD2発現における増加を達成しうかどうかを判断するために、本明細書に記述された方法が使用されう。対象の細胞株（例えばARPE-19細胞、すなわちヒトの網膜の上皮細胞株（American Type Culture Collection（ATCC），USA）、またはHuh-7、すなわちヒトの肝細胞腫細胞株（NIBIOHN，Japan）、またはSK-N-AS、すなわちヒトの神経芽細胞腫細胞株（ATCC））は、偽トランスフェクト（mock-transfect）されるか、または表1に記載の標的ASOでトランスフェクトされる。細胞を、製造業者の仕様書に従って、Lipofectamine RNAiMaxトランスフェクション試薬（Thermo Fisher）を用いてトランスフェクトする。簡潔に述べると、ASOを96ウェル組織培養プレートに播種し、Opti-MEMで希釈したRNAiMaxと組み合わせる。トリプシンを用いて細胞を剥離し、完全培地に再懸濁し、約25,000個の細胞をASO-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三通りのプレート複製において実行される。最終的なASO濃度は80nMである。製造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Cells-to-Ct溶解試薬を用い、DNase（Thermo Fisher）で試薬を補充し、24時間で採取する。製造業者の仕様書に従い、cDNAをCells-to-Ct RT試薬（Thermo Fisher）で生成する。対象のイントロンでのスプライシングの量を定量化するために、表1に列挙した、対応するエクソン-エクソンジャンクションに及ぶプローブでTaqmanアッセイ（Thermo Fisher）を用いて、定量

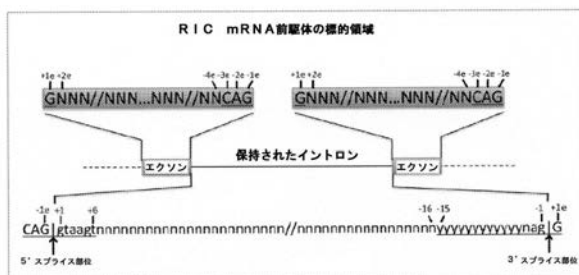
PCRが実行される。Taqmanアッセイは、QuantStudio 7 Flex Real-Time PCRシステム(Thermo Fisher)上で製造業者の仕様書に従い実行される。標的遺伝子アッセイ値を、RPL32(delta Ct)およびプレート適合偽トランスフェクションサンプル(delta-delta Ct)に対して正規化し、モック定量( $2^{-(\text{delta-delta Ct})}$ )に対して倍率変化を生成する。3つのプレート複製のモック(mock)に対する平均倍率変化をプロットする。標的遺伝子発現を閾値量の分増加させるものと特定されたASOは、その標的イントロンでのスプライシングの増加を示唆する。標的イントロン(図3)の保持を確認する全トランスクリプトームデータと共に、これらの結果は、ASOが律速のイントロンのスプライシング効率を改善し得ることを確認する。

10

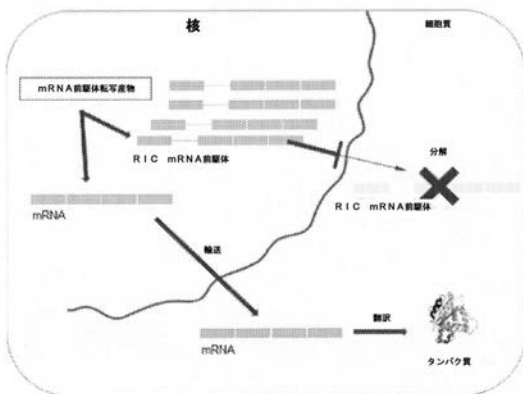
#### 【0126】

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、当業者の心に思い浮かぶであろう。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かもしれないことを理解されたい。以下の請求項は本発明の範囲を定義するものであり、この請求項とその均等物の範囲内の方法および構造体がそれによって包含されるものであるということが意図されている。

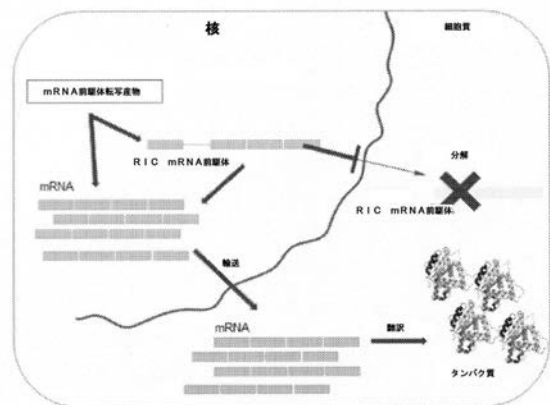
【図1】



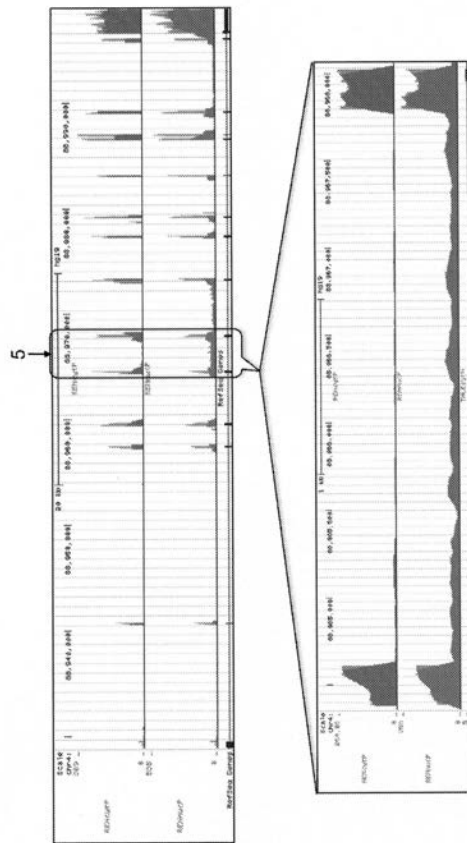
【図2A】



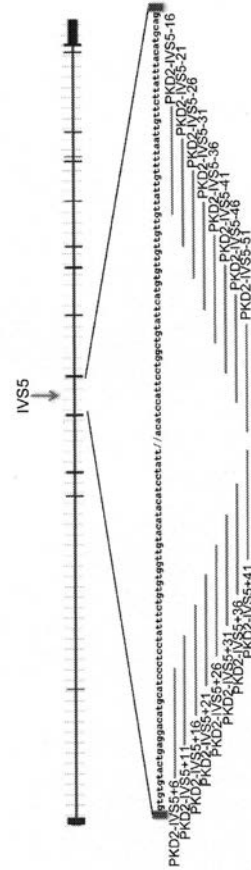
【図2B】



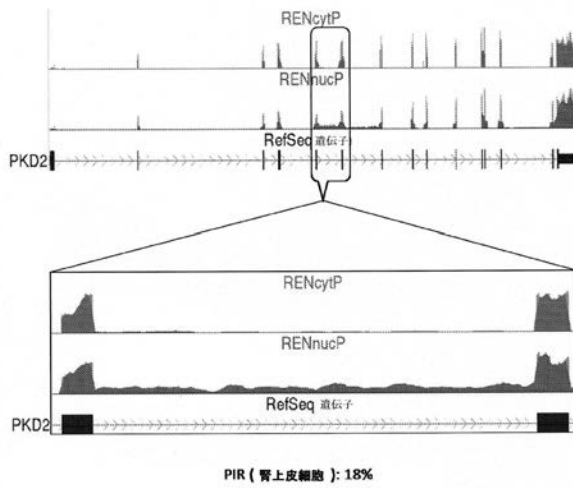
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

2018538287000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/066417

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:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ 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.

3. Additional comments:

SEQ ID NO:3 was searched.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/066417

**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.: 10-55, 57, 58, 65, 69-99, 114  
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. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-9, 56, 59-64, 66-68, 100-113, and 115-118 restricted to an antisense oligomer of SEQ ID NO:3.

**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 SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/066417

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61P 13/12; C12N 15/113; C12Q 1/68 (2017.01)

CPC - C07K 14/47; C07K 14/4702; C07K 14/4736; C07K 14/805; C12N 15/111; C12N 15/113; C12N 15/1137; C12N 2310/11; C12N 2310/315; C12N 2310/3341; C12N 2320/11; C12N 2320/33; C12Q 1/6883; C12Q 2600/136; C12Q 2600/158; C12Y 101/01205; C12Y 304/24087 (2017.02)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

USPC - 435/6.11; 435/91.1; 536/23.1 (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2008/0269123 A1 (LI et al) 30 October 2008 (30.10.2008) entire document	1-9, 56, 59-64, 66-68, 100-113
Y	SAHASHI et al. "TSUNAMI: an Antisense Method to Phenocopy Splicing-Associated Diseases in Animals," Genes & Development, 15 August 2012 (15.08.2012), Vol. 26, Pgs. 1874-1884. entire document	1-9, 59-64, 66-68, 100-113, 115-118
Y	US 2014/0349290 A1 (ATHENA DIAGNOSTICS INC. et al) 27 November 2014 (27.11.2014) entire document	56, 64, 66-68, 102-104, 110-113, 115-118
P, X	US 2016/0298121 A1 (COLD SPRING HARBOR LABORATORY) 13 October 2016 (13.10.2016) entire document	1-9, 56, 59-64, 66-68, 100-113, 115-118
A	WO 2015/035091 A1 (COLD SPRING HARBOR LABORATORY et al) 12 March 2015 (12.03.2015) entire document	1-9, 56, 59-64, 66-68, 100-113, 115-118
A	SAHASHI et al. "Pathological Impact of SMN2 Mis-Splicing in Adult SMA Mice," EMBO Molecular Medicine, 02 October 2013 (02.10.2013), Vol. 5, Pgs. 1586-1601. entire document	1-9, 56, 59-64, 66-68, 100-113, 115-118
A	STAROPOLI et al. "Rescue of Gene-Expression Changes in an Induced Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy by an Antisense Oligonucleotide that Promotes Inclusion of SMN2 exon 7," Genomics, 30 April 2015 (30.04.2015), Vol. 105, Pgs. 220-228. entire document	1-9, 56, 59-64, 66-68, 100-113, 115-118



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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 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/US2016/066417

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WU et al. "AT-AC pre-mRNA Splicing Mechanisms and Conservation of Minor Introns in Voltage-Gated Ion Channel Genes," Molecular and Cellular Biology, 01 May 1999 (01.05.1999), Vol. 19, Pgs. 3225-3236. entire document	1-9, 56, 59-64, 66-68, 100-113, 115-118



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/066417

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, 56, 59-64, 66-68, 100-113, and 115-118 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, 56, 59-64, 66-68, 100-113, and 115-118 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on an antisense oligomer of 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 an 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 treating Polycystic Kidney Disease in a subject in need thereof, requiring the selection of alternatives for the antisense oligomers, where "the ASO comprises a sequence that is at least about 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, or 100% complementary to any one of SEQ ID NOs: 3-280".

The Groups I+ share the technical features of a method of treating Polycystic Kidney Disease 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, whereby the retained intron is constitutively spliced from 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 PC-2, 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 PC-2 protein, the method comprising contacting the cells with an antisense oligomer (ASO) complementary to a targeted portion of the RIC pre-mRNA encoding PC-2 protein, whereby the retained intron is constitutively spliced from the RIC pre-mRNA encoding PC-2 protein, thereby increasing the level of mRNA encoding PC-2 protein, and increasing the expression of PC-2 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 Polycystic Kidney Disease 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: (c) the deficient RNA; or (d) 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 PC-2 protein in a subject in need thereof, the method comprising the step of increasing expression of PC-2 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 PC-2 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 PC-2 protein, thereby increasing the level of mRNA encoding the PC-2 protein, and increasing the expression of PC-2 protein, in the cells of the subject; a pharmaceutical composition comprising: an antisense oligomer that hybridizes to a target sequence of a deficient PKD2 mRNA transcript, wherein the deficient PKD2 mRNA transcript comprises a retained intron, wherein the antisense oligomer induces splicing out of the retained intron from the deficient PKD2 mRNA transcript; and a pharmaceutically acceptable excipient, diluent, or carrier; a method of inducing processing of a deficient PKD2 mRNA transcript to facilitate removal of a retained intron to produce a fully processed PKD2 mRNA transcript that encodes a functional form of a PC-2 protein, the method comprising: (a) contacting an antisense oligomer to a target cell of a subject; (b) hybridizing the antisense oligomer to the deficient PKD2 mRNA transcript, wherein the deficient PKD2 mRNA transcript is capable of encoding the functional form of a PC-2 protein and comprises at least one retained intron; (c) removing the at least one retained intron from the deficient PKD2 mRNA transcript to produce the fully processed PKD2 mRNA transcript that encodes the functional form of PC-2 protein; and (d) translating the functional form of PC-2 protein from the fully processed PKD2 mRNA transcript; a method of treating a subject having a condition caused by a deficient amount or activity of PC-2 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 disease 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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/066417

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), the RIC pre-mRNA comprising a retained intron (mRNA splicing defects that cause retention of an intron (or part of an intron) that alters the reading frame, Pg. 18, Lns. 9-10), 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), thereby increasing the level of mRNA encoding the target protein or functional RNA (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 target protein or functional RNA in the 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); a method of increasing expression of a target protein by cells having a retained-intron-containing pre-mRNA (RIC pre-mRNA), the RIC pre-mRNA comprising a retained intron (mRNA splicing defects that cause retention of an intron (or part of an intron) that alters the reading frame, Pg. 18, Lns. 9-10), 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 the 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), thereby increasing the level of mRNA 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 (Inhibition of NMD results in an increase in levels of an mRNA...cytoplasmic levels of the PTC-containing mRNA, Pg. 26, Lns. 1-10); an antisense oligomer comprising a sequence (introducing into the eukaryotic cell an antisense oligonucleotide (ASO) specific to a region of the mRNA that is from about 1 to about 50 nucleotides upstream of the exon exon junction, Pg. 4, Lns. 15-17); 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 Polycystic Kidney 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 (specifically targeting a gene that is associated with a disease or a gene that contains a disease-causing mutation (e.g. a nonsense mutation). In some embodiments, the disease-causing mutation results in a premature termination codon (PTC), Pg. 1, Lns. 22-24), wherein the antisense oligomer enhances splicing of a retained intron-containing pre-mRNA (RIC pre-mRNA) encoding the target protein or the functional RNA (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 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 (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 wherein the functional RNA is: (c) the deficient RNA; or (d) a compensating functional RNA which functionally augments or replaces the deficient functional RNA in the subject (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); wherein the RIC pre-mRNA comprises a retained intron (mRNA splicing defects that cause retention of an intron (or part of an intron) that alters the reading frame, Pg. 18, Lns. 9-10), 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 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), thereby increasing production or activity of the target protein or the functional RNA in 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); a composition comprising an antisense oligomer for use in a method of treating a condition associated with the 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 the protein 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) 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 (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 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 protein, in the 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); 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 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 minigenes are constructed in a

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/086417

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 a pharmaceutically acceptable excipient, diluent, or carrier (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); 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 (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), 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 and comprises at least one retained intron (mRNA splicing defects that cause retention of an intron (or part of an intron) that alters the reading frame, Pg. 18, Lns. 9-10); (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 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 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 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), wherein the antisense oligomer enhances constitutive splicing (Thus, in some aspects it is beneficial to block or inhibit NMD of the 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).

Further, US 2014/0349290 A1 to Athena Diagnostics Inc. et al. discloses treating Polycystic Kidney Disease (Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), Para. [0004]; The identification of mutations associated with ADPKD provides conclusive diagnostic information...but also in the early detection for treatment with new agents that may be indicated for use early in the course of the disease, Para. [0010]), comprising a retained intron is constitutively spliced from a RIC pre-mRNA encoding a target protein or functional RNA (or changes nucleotide sequence involved in transcription or translation of the PKD1 or PKD2 nucleotide sequence; for example, a change that results in altered splicing of a PKD1 or PKD2 gene transcript into an mRNA, Para. [0032]), a PC-2 RIC pre-mRNA, and a PKD2 RIC pre-mRNA (Thirty participants had either an in-frame deletion or at least one amino acid substitution deemed likely to be pathogenic (Tables 5 and 6). A total of 8 unique in-frame deletions (6 in the PKD1 gene and 2 in PKD2 gene) were detected (Table 5). In each case, the deletion affected one or more residues fully or highly conserved between *Fugu rubripes* (*Fugu* fish) and *Mus musculus* (mouse) polycystin proteins, Para. [0053]).

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 1 2 N 15/12 (2006.01) C 1 2 N 15/12

(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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, 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 アズナレズ, イザベル  
 アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ マガジン・ストリート 5 5  
 アpartment 1 2 エー

(72)発明者 ナッシュ, ヒュー エム.  
 アメリカ合衆国 0 2 4 2 1 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) 4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA22 BA44 DC50 MA66 NA14 ZA811  
 ZC541  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA66 NA14 ZA81  
 ZC54