

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7677628号
(P7677628)

(45)発行日 令和7年5月15日(2025.5.15)

(24)登録日 令和7年5月7日(2025.5.7)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113
C 1 2 N	5/0787 (2010.01)	C 1 2 N	5/0787
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76
請求項の数 17 (全51頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-511621(P2021-511621)	(73)特許権者	517366013
(86)(22)出願日	令和1年8月27日(2019.8.27)		ノース カロライナ ステート ユニバー シティ NORTH CAROLINA STAT E UNIVERSITY
(65)公表番号	特表2021-534799(P2021-534799 A)		アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 2 7 6 0 6、ラレー、セカンド フロア ー、メイン キャンパス ドライブ 1 0 2 1
(43)公表日	令和3年12月16日(2021.12.16)	(74)代理人	110002077
(86)国際出願番号	PCT/US2019/048400		園田・小林弁理士法人
(87)国際公開番号	WO2020/046985	(72)発明者	グレン ビー クルース
(87)国際公開日	令和2年3月5日(2020.3.5)		アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 2 7 5 0 2、アベックス、チャーリオン ダウンズ レーン 1 6 9 6
審査請求日	令和4年8月26日(2022.8.26)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	62/723,326		
(32)優先日	平成30年8月27日(2018.8.27)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 肥満細胞のアポトーシスを誘導するためにスプライススイッチングオリゴヌクレオチドを用いてK i tを標的とする方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】
1 0 ～ 5 0 個の連結ヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴマーであって、該アンチセンスオリゴマーが、エキソン／イントロン境界又はイントロン／エキソン境界に広がるK i tをコードするプレmRNAのある領域を標的とし、該標的領域がK i tをコードするプレmRNAのスプライシングに関与する配列を含む、アンチセンスオリゴマー。

【請求項2】
前記アンチセンスオリゴマーの前記K i tをコードするプレmRNAへのハイブリダイゼーションが、該プレmRNAのスプライシングを変化させ、c－K i t転写物が、配列番号8、1 0、1 2、1 4及び1 6のいずれか、又はその中に存在するオープンリーディングフレームを含み、該アンチセンスオリゴマーの該K i tをコードするプレmRNAへのハイブリダイゼーションが、K i tタンパク質の発現を低下させ、該発現が低下せられるK i tタンパク質が、野生型K i tタンパク質又は変異型K i tタンパク質である、請求項1に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項3】
前記標的領域が、イントロン配列、エキソン配列、イントロン/エキソンジャンクションを含む配列、スプライスドナー配列、スライスアクセプター配列、スプライスエンハンサー配列、スプライス分岐点配列、又はポリピリミジントラクトから成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部を含み、該ポリヌクレオチド配列が、K i tエキソン2～2 0から成る群から選択されるK i tエキソンに関連する、請求項1又は2に記

載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 4】

前記 K i t をコードする プレ m R N A が、 c - K i t 遺伝子から転写され、前記アンチセンスオリゴマーの c - K i t プレ m R N A へのハイブリダイゼーションが、エキソン 4 の少なくとも一部を欠く成熟 c - K i t m R N A 分子の生成をもたらす、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 5】

K i t タンパク質が、ヒト K i t タンパク質、マウス K i t タンパク質、イヌ K i t タンパク質、ネコ K i t タンパク質、及びウマ K i t タンパク質から成る群から選択され、前記アンチセンスオリゴマーの c - K i t プレ m R N A へのハイブリダイゼーションが、短縮型 K i t タンパク質をコードする m R N A 分子の生成をもたらす、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

10

【請求項 6】

オリゴヌクレオチドが標的配列に特異的にハイブリダイズするように、前記 10 ～ 50 個の連結ヌクレオチドが、前記 K i t をコードする プレ m R N A 中の標的核酸配列に十分に相補的な、標的に向く核酸配列を含む、請求項 1 に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 7】

前記アンチセンスオリゴマーの前記 K i t をコードする プレ m R N A へのハイブリダイゼーションが、該 プレ m R N A のスプライシングを変化させ、又は前記アンチセンスオリゴマーの前記 K i t をコードする プレ m R N A へのハイブリダイゼーションが、 K i t タンパク質の発現を低下させ、該発現が低下させられる K i t タンパク質が、野生型 K i t タンパク質又は変異型 K i t タンパク質であり、又は前記標的に向く配列が、標的配列中の少なくとも 6 つの連続する核酸塩基に完全に相補的な少なくとも 6 つの連続する核酸塩基を含み、又は前記標的に向く配列が、その全長にわたって、標的配列中の同様のサイズの連続する核酸塩基のつながりに対して少なくとも 80 % 相補的である、請求項 6 に記載のアンチセンスオリゴマー。

20

【請求項 8】

前記標的領域が、イントロン配列、エキソン配列、イントロン/エキソンジャンクションを含む配列、スプライスドナー配列、スライスアクセプター配列、スプライスエンハンサー配列、スプライス分岐点配列、又はポリピリミジントラクトから成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部を含み、該ポリヌクレオチド配列が、 K i t エキソン 2 ～ 20 から成る群から選択される K i t エキソンに関連する、請求項 6 又は 7 に記載のアンチセンスオリゴマー。

30

【請求項 9】

前記 K i t をコードする プレ m R N A が、 c - K i t 遺伝子から転写される、請求項 6 ～ 8 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項 10】

K i t タンパク質が、ヒト K i t タンパク質、マウス K i t タンパク質、イヌ K i t タンパク質、ネコ K i t タンパク質、及びウマ K i t タンパク質から成る群から選択される、請求項 6 ～ 9 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

40

【請求項 11】

前記標的配列が、配列番号 18 ～ 22 から成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部を含み、該標的配列が、配列番号 23 ～ 60 から成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部を含み、該一部が、少なくとも 10 個の連続するヌクレオチドであり、又は前記標的配列が、配列番号 18 ～ 22 の部分配列と少なくとも 90 % 同一の配列を含み、該標的配列が、配列番号 23 ～ 60 のうちの 1 つと少なくとも 90 % 同一の配列を含み、又は前記標的配列が、配列番号 1、2 及び 23 ～ 60 から成る群から選択される配列に優先的にハイブリダイズする、又は

前記標的に向く配列が、その配列中に、配列番号 1、2 及び配列番号 23 ～ 60 のうちの 1 つの逆相補体から成る群から選択される配列中の少なくとも 10 個の連続する核酸塩

50

基と配列が同一である少なくとも10個の連続する核酸塩基を含み、又は

前記標的に向く配列が、配列番号18～60の部分配列の少なくとも一部の逆相補体に対して少なくとも80%相補的な配列を含み、又は

前記標的に向く配列が、配列番号1、2及び配列番号23～60のうちの1つの逆相補体から成る群から選択される配列の全長にわたって少なくとも80%同一であり、又は前記標的に向く配列が、配列番号1、2及び配列番号23～60のうちの1つの逆相補体から成る群から選択される、請求項10に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項12】

前記アンチセンスオリゴマーがアンチセンスRNA分子であり、該アンチセンスRNA分子が、ヌクレオチド修飾、ヌクレオチド間修飾、糖修飾、糖-ヌクレオチド間結合修飾、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される修飾を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項13】

請求項1～12のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマーをコードする発現ベクター。

【請求項14】

前記アンチセンスオリゴマーがモルホリノオリゴマーである、請求項1～12のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー。

【請求項15】

請求項1～12のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項13に記載の発現ベクター、又は請求項14に記載のモルホリノオリゴマーを含む医薬組成物。

【請求項16】

個体におけるKit発現に関連する疾患、障害又は病状を治療するための医薬であって、請求項1～12のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー、請求項13に記載の発現ベクター、又は請求項14に記載のアンチセンスオリゴマーを含む、医薬。

【請求項17】

前記Kit発現に関連する疾患、障害又は病状が、癌又は肥満細胞症であり、前記癌が胃腸間質腫瘍又は白血病であり、前記個体が、ヒト、マウス、イヌ、ネコ又はウマである、請求項16に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本発明は、2018年8月27日に出願された米国仮特許出願第62/723,326号の優先権を主張し、本明細書にはその全体が参照により組み込まれる。

本発明は、国立衛生研究所によって付与された助成金番号ES025128の下での米国政府の支援によってなされた。そのため米国政府は本発明に一定の権利を有する。

【技術分野】

【0002】

この発明は、いくつかの実施態様において、肥満細胞のアポトーシスを誘導するためにスプライススイッチングオリゴヌクレオチドを用いて、Kitゲノム遺伝子座から転写されたRNA転写物を含む、但し、これらに限定されない、Kit遺伝子産物を標的とすることに関する。本発明は、いくつかの実施態様において、肥満細胞及びKit関連腫瘍性疾患を選択的に標的とするための応用に関する。

【背景技術】

【0003】

c-Kitは、様々な種の間で高度に保存されている癌原遺伝子であり、受容体型チロシンキナーゼであるKit (CD117として、及び/又は肥満/幹細胞成長因子受容体 (SCFR) としても知られている) をコードする。Kitは、肥満細胞 (MC) 前駆細胞を含む、骨髄由来の造血幹細胞の増殖、生存及び分化において一定の役割を果たす (Pittoni et al., 2011によるレビュー)。ほとんどの造血細胞におけるKitの発現は分化中に失われる

10

20

30

40

50

が、肥満細胞（MC）はその生涯を通じてK i tの発現を保持し、K i tのシグナル伝達は肥満細胞（MC）の生存と増殖に不可欠なものである(Tsai M et al., 1991; Mekori et al., 1993; Iemura et al., 1994; Galli et al., 1995)。c-Kitに発癌可能性があることは、そのウイルスの対応物であるv-KitがHardy-Zuckerman IVネコ肉腫ウイルスの形質転換活性に関与していることが判明したときに最初に認識された(Besmer et al., 1986)。これに続いて、機能獲得型c-Kit変異の活性化は、いくつかのヒト悪性腫瘍の開始と進行に関連しており、消化管間質腫瘍（GIST）や、肥満細胞症や肥満細胞（MC）白血病などの肥満細胞（MC）増殖性疾患で特に高い発生率を示している（Cruse et al., 2014によるレビュー）。

【0004】

肥満細胞症(Mastocytosis)は、肥満細胞（MC）の異常な拡大と蓄積を特徴とする、まれで不均一な腫瘍性症状のグループである(Valent et al., 2017)。この疾患は、肥満細胞症サブタイプの広範な生物学的不均一性のために、治療が難しく、これらはすべて、肥満細胞（MC）の腫瘍性増殖を特徴とするが、明確な臨床症状と治療反応を示す(Valent et al., 2017)。肥満細胞症及びK i t駆動型腫瘍の現在の最前線の治療には、化学療法及びチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)が含まれる（Gleixner et al., 2006; Gotlib et al., 2016）。しかし、これらの治療は、進行した疾患には常に有効とは限らず、完全鎮静又は予後の改善はまれである。さらに、化学療法及びチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)の非特異的な性質により、オフターゲット毒性のリスクが高い(Jensen et al., 2008)。その結果、当技術分野において、より良い安全性プロファイルを持つ、K i t特異的な治療アプローチの開発が依然として必要とされている。

【0005】

癌の発生と異常な肥満細胞（MC）の成長に強く関係するK i t遺伝子産物は、有望だが困難な治療標的である。ヒト染色体4q12にあるヒトc-Kit (Giebel et al., 1992)は、21個のエキソンを含み、一連の変異の影響を受けやすい。これらの中で最も臨床的に重要なものは、その受容体のコンフォメーション変化を与え、K i tリガンドである幹細胞因子（SCF）から独立したチロシンキナーゼ活性を可能にする、機能獲得型変異である(Cruse et al., 2014; Arock et al., 2015によるレビュー)。野生型K i tは、SCF結合細胞外ドメインを含む別個の複数のドメイン、膜貫通ドメイン、自己抑制性膜近傍ドメイン、及び自己リン酸化が可能な2つの細胞内チロシンキナーゼドメインで構成されている(Cruse et al., 2014; Arock et al., 2015)。通常状況では、肥満細胞（MC）の生存、増殖及び分化にはKit-SCF相互作用が必要であるが、活性化変異が存在すると、SCF依存性が失われ、発癌性のKitシグナル伝達が腫瘍性肥満細胞（MC）の成長を促進する。

【0006】

K i t遺伝子全体にわたって突然変異が発生することが知られているが、その多くはホットスポットに集まっており、様々な病気に関連している(Cruse et al., 2014)。たとえば、K i tの膜近傍ドメインをコードするエキソン11の変異は、通常消化管間質腫瘍（GIST）で発生するが(Taniguchi et al., 1999; Miettinen et al., 2002)、第2キナーゼドメインをコードするエキソン17のD816V地点の変異は、全身性肥満細胞症の患者の大多数で検出されている(Arock et al., 2015)。突然変異のタイプと更なる突然変異の発生がK i t関連悪性腫瘍の治療の成功を決定するので、疾患の予後を評価し、患者の突然変異を特定することは、治療アプローチを決定するために重要である。特に、成人の全身性肥満細胞症の症例の80%以上に見られるミスセンス変異D816V (Arock et al., 2015)は、K i tのコンフォメーション変化を引き起こし、これにより、K i tの不活性なATP結合部位コンフォメーションを標的とするメシル酸イマチニブ(Gleevec; Ma et al., 2002; Pardanani et al., 2003)などのチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)に耐性を示す。

【0007】

K i t関連悪性腫瘍におけるc-K i t突然変異の不均一性、及びいくつかの実施態様において本発明のTKIに対する耐性を付与する突然変異の発生のために、いくつかの実施形態において本明細書には、治療へのアプローチとして、K i t発現を標的化するため

10

20

30

40

50

の組成物及び方法が開示される。標準的なsiRNAアプローチはK i tのサイレンシングにおいて非効率的（特にインビボにおいて）であるため(Wu et al., 2012; Yang et al., 2015)、本発明のいくつかの実施態様において、プレmRNAの異常なスプライシング（エキソンスキッピングなど）を誘導する化学的に安定なアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を、c-Kit遺伝子産物の発現を変化させるために採用する。本発明の例示的な実施態様において、K i t S o pと呼ばれるエキソンスキッピングオリゴヌクレオチド（ESO）は、成熟c - K i t m R N A転写物にフレームシフトを導入することによりc - K i t発現を標的とする。その結果、即時の停止コドンと機能喪失が生じる。KitStopは、インビトロで、肥満細胞（MC）における野生型と変異型の両方のKit発現をダウンレギュレートし、これにより、増殖が防止され、急速な細胞死が誘導される。KitStop ESOを腹腔又は皮膚に投与すると、インビボで、これらの組織における肥満細胞（MC）数が大幅に減少する。これらのデータは、KitStop ESOが動物の体内の肥満細胞（MC）を枯渇させることができ、K i t関連の悪性腫瘍における治療的有用性の原理実証として機能することを示している。最近、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD; Dowling, 2016; Syed, 2016)の治療のために、ESOエテプリルセン(etepirsen)が、食品医薬品局により承認されたことを考慮すると、本発明はK i tを標的とする治療法を提供する。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

当技術分野において、従来より良い安全性プロファイルを持つ、K i t特異的な治療アプローチの開発が依然として必要とされている。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

この明細書では、本発明のいくつかの実施態様を列挙し、多くの場合、これらの実施態様の変形及び順列を列挙する。この明細書で示すのは、多数の多様な実施態様の単なる例示である。所与の実施態様の1又はそれ以上の代表的な特徴の言及も同様に例示的である。このような実施態様は、通常、言及された特徴の有無にかかわらず存在することができる。同様に、これらの特徴は、この明細書に記載されているかどうかにかかわらず、本発明の他の実施態様に適用することができる。過度の繰り返しを避けるために、この明細書では、このような機能の全ての可能な組み合わせを示し又は提案しているわけではない。

30

【0010】

いくつかの実施態様において、本発明は、10～50個の連結ヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴマーであって、該アンチセンスオリゴマーがK i tをコードするプレmRNAのある領域を標的とし、更に該標的領域がK i tをコードするプレmRNAのスプライシングに関与する配列を含む、アンチセンスオリゴマーを提供する。いくつかの実施態様において、前記アンチセンスオリゴマーの前記K i tをコードするプレmRNAへのハイブリダイゼーションは、該プレmRNAのスプライシングを変化させる。いくつかの実施態様において、前記アンチセンスオリゴマーの前記K i tをコードするプレmRNAへのハイブリダイゼーションは、K i tタンパク質の発現を低下させる。いくつかの実施態様において、前記発現が低下させられるK i tタンパク質は、野生型K i tタンパク質又は変異型K i tタンパク質である。いくつかの実施態様において、前記標的領域は、イントロン配列、エキソン配列、イントロン/エキソンジャンクションを含む配列、スプライスドナー配列、スライスクセプター配列、スプライスエンハンサー配列、スプライス分岐点配列、又はポリピリミジントラクトから成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部を含む。いくつかの実施態様において、前記ポリヌクレオチド配列は、エキソン4スプライスドナー配列から成る群から選択される。いくつかの実施態様において、前記K i tをコードするプレmRNAは、c - K i t遺伝子から転写される。いくつかの実施態様において、前記K i tタンパク質は、ヒトK i tタンパク質、マウスK i tタンパク質、イヌK i tタンパク質、ネコK i tタンパク質、及びウマタンパク質から成る群から選択される。いくつかの実施態様において、前記アンチセンスオリゴマーのc - K

40

50

i t プレ m R N A へのハイブリダイゼーションは、エキソン 4 の少なくとも一部を欠く成熟 c - K i t m R N A 分子の生成をもたらす。いくつかの実施態様において、前記アンチセンスオリゴマーの c - K i t プレ m R N A へのハイブリダイゼーションは、短縮型 K i t タンパク質をコードする m R N A 分子の生成をもたらす。いくつかの実施態様において、前記オリゴヌクレオチドが前記標的配列に特異的にハイブリダイズするように、前記 10 ~ 50 個の連結ヌクレオチドは、前記 K i t をコードするプレ m R N A 中の標的核酸配列に十分に相補的な、標的に向く核酸配列を含む。いくつかの実施態様において、前記アンチセンスオリゴマーの前記 K i t をコードするプレ m R N A へのハイブリダイゼーションは、該プレ m R N A のスプライシングを変化させる。いくつかの実施態様において、前記アンチセンスオリゴマーの前記 K i t をコードするプレ m R N A へのハイブリダイゼーションは、K i t タンパク質の発現を低下させる。いくつかの実施態様において、前記発現が低下させられた K i t タンパク質は、野生型 K i t タンパク質又は変異型 K i t タンパク質である。

【0011】

いくつかの実施態様において、前記標的に向く配列は、前記標的配列中の少なくとも 6 つの連続する核酸塩基に完全に相補的な少なくとも 6 つの連続する核酸塩基を含む。いくつかの実施態様において、前記標的に向く配列は、その全長にわたって、前記標的配列中の同様のサイズの連続する核酸塩基のつながりに対して少なくとも 80 % 相補的である。いくつかの実施態様において、前記標的領域は、イントロン配列、エキソン配列、イントロン/エキソンジャンクションを含む配列、スプライスドナー配列、スライスアクセプター配列、スプライスエンハンサー配列、スプライス分岐点配列、又はポリピリミジントラクトから成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部を含む。いくつかの実施態様において、前記ポリヌクレオチド配列は、(エキソン 4 スプライスドナー配列などであるがこれに限定されない) K i t エキソン 2 ~ 20 から成る群から選択される K i t エキソンに関連する。いくつかの実施態様において、前記 K i t をコードするプレ m R N A は、c - K i t 遺伝子から転写される。いくつかの実施態様において、前記 K i t タンパク質は、ヒト K i t タンパク質、マウス K i t タンパク質、イヌ K i t タンパク質、ネコ K i t タンパク質、及びウマタンパク質から成る群から選択される。

【0012】

いくつかの実施態様において、前記標的配列は、配列番号 18 ~ 22 (任意に、配列番号 23 ~ 60) から成る群から選択されるポリヌクレオチド配列の少なくとも一部を含む。いくつかの実施態様において、前記一部は、少なくとも 10 個の連続するヌクレオチドである。いくつかの実施態様において、前記標的配列は、配列番号 18 ~ 22 (任意に、配列番号 23 ~ 60) の部分配列と少なくとも 90 % 同一の配列を含む。いくつかの実施態様において、前記標的配列は、配列番号 1、2 及び 23 ~ 60 の逆相補体から成る群から選択される配列を含む。いくつかの実施態様において、前記標的に向く配列は、その配列中に、配列番号 1、2 及び配列番号 23 ~ 60 のうちの 1 つの逆相補体から成る群から選択される配列中の少なくとも 10 個の連続する核酸塩基と配列が同一である少なくとも 10 個の連続する核酸塩基を含む。いくつかの実施態様において、前記標的に向く配列は、配列番号 18 ~ 22 (任意に、配列番号 23 ~ 60) の部分配列の少なくとも一部の逆相補体に対して少なくとも 80 % 相補的な配列を含む。いくつかの実施態様において、前記標的に向く配列は、配列番号 1、2 及び配列番号 23 ~ 60 のうちの 1 つの逆相補体から成る群から選択される配列の全長にわたって少なくとも 80 % 同一である。いくつかの実施態様において、前記標的に向く配列は、配列番号 1、2 及び配列番号 23 ~ 60 のうちの 1 つの逆相補体から成る群から選択される。

【0013】

いくつかの実施態様において、前記 c - K i t 転写物は、配列番号 8、10、12、14 及び 16 のいずれか、又はその中に存在するオープンリーディングフレームを含む。

いくつかの実施態様において、前記アンチセンスオリゴマーは、アンチセンス R N A 分子である。いくつかの実施態様において、前記アンチセンス R N A 分子は、ヌクレオチド

10

20

30

40

50

修飾、ヌクレオチド間修飾、糖修飾、糖-ヌクレオチド間結合修飾、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される修飾を含む。いくつかの実施態様において、前記アンチセンスオリゴマーはモルホリノオリゴマーである。

いくつかの実施態様において、本発明は、ここに開示のアンチセンスオリゴマーをコードする発現ベクターを提供する。いくつかの実施態様において、本発明は、ここに開示のアンチセンスオリゴマー、ここに開示の発現ベクター、及び/又はここに開示のモルホリノオリゴマーを含む医薬組成物を提供する。

いくつかの実施態様において、本発明は、細胞及び/又は組織におけるK i tをコードするプレRNAのスプライシングを調節するための方法を提供する。いくつかの実施態様において、本発明は、該細胞及び/又は組織を、ここに開示のアンチセンスオリゴマー、ここに開示の発現ベクター、及び/又はここに開示のモルホリノオリゴマーと接触させる段階を含む方法を提供する。

【0014】

いくつかの実施態様において、本発明は、肥満細胞においてアポトーシスを誘導するための方法を提供する。いくつかの実施態様において、本発明は、該肥満細胞を、ここに開示のアンチセンスオリゴマー、ここに開示の発現ベクター、及び/又はここに開示のモルホリノオリゴマーと接触させる段階を含む方法を提供する。

本発明のいくつかの実施態様において、前記方法は個体において実施される。

いくつかの実施態様において、本発明は、個体におけるK i t発現に関連する疾患、障害又は病状を治療するための方法を提供する。いくつかの実施態様において、この方法は、該個体に、ここに開示のアンチセンスオリゴマー、ここに開示の発現ベクター、及び/又はここに開示のモルホリノオリゴマーを投与する段階を含む。いくつかの実施態様において、前記K i t発現に関連する疾患、障害又は病状は、癌又は肥満細胞症である。いくつかの実施態様において、前記癌は胃腸間質腫瘍又は白血病である。いくつかの実施態様において、前記個体は動物であり、任意に哺乳動物である。いくつかの実施態様において、前記個体は、ヒト、マウス、イヌ、ネコ又はウマである。

従って、本発明の目的は、肥満細胞のアポトーシスを誘導するためのスプライススイッチングオリゴヌクレオチドを用いてK i t遺伝子産物を標的とする方法、並びに肥満細胞及びK i t関連腫瘍性疾患を選択的に標的化する方法を提供することである。

本発明の目的は、上記に記載され、本明細書に開示された組成物及び方法によって全体的又は部分的に達成され、以下に最もよく説明されている添付の図に関連して説明が進むにつれて明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

参照により本明細書に組み込まれ、本明細書の一部を構成する添付図面は、開示されている組成物及び方法を例証する記載と共に、本発明のいくつかの代表的な実施態様を例証する。

【図1】 c-KitプレmRNAにおけるエキソン4のエキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)を介した選択的スプライシングを示す図である。図1Aにおいて、KitStop ESOは、エキソン4のドナースプライス部位を標的とするように設計されており、これはスプライセオソームによるエキソン4の排除を導く。これは、KitStopの標的部位の下流に位置するG560V及びD816V活性化変異の存在下でさえ、未成熟終止コドンを導入し、トランケートされたmRNA転写物をもたらすと予測されている。図中の四角はエキソンを表し、太くて黒いバーはイントロンを表す。「FL-c-Kit」は全長c-Kitを示し、「t-c-Kit」はトランケートされたc-Kitを示す。図1BCは、RT-PCRによる全RNAの分析によって評価された、それぞれHMC-1.2 (図1B) 及びLAD2細胞 (図1C) における、標準対照アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) (Stdndcon) と比較した、KitStopESOによる野生型及び変異型c-Kitのスプライススイッチングを示すゲル電気泳動データを示す。黒い矢印は全長c-Kitを示し、灰色の矢印は選択的スプライシングされたc-K i tを示す。

【図2】 KitStop ESOのトランスフェクションにより、野生型Kitの発現が失われること

を示す図である。LAD2細胞に10 μ Mの標準対照ASO (Stdcon) 又はKitStop ESOをトランスフェクトした後、フローサイトメトリーでK i tの発現を評価した。図2 A Bは、KitStop ESOによるトランスフェクションの2日後(上のパネル)と7日後(下のパネル)の表面(A)及び全体(B)の野生型K i t発現のフローサイトメトリーヒストグラムを示す。図2 C Dは、幾何学的MFIから計算され、標準対照アンチセンスオリゴヌクレオチド(Stdcon)に対する割合(%)として表された、表面(C)及び全体(D)のK i tの発現の平均フローサイトメトリーデータを示す。データは、3回の独立した実験からの平均 $\pm$ SEMである。*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 、分散分析(ANOVA)とSidakの事後テストによる。図2 E Fは、抗ヒトCD117抗体で標識されたLAD2細胞の、代表的なフローサイトメトリーゲーティング戦略及びプロットを示す。LAD2細胞に10 μ M KitStop ESOをトランスフェクトした後、フローサイトメトリーでLAD2細胞のK i t発現を評価した。APC結合抗ヒトCD117抗体で標識された、生存(E)並びに固定及び透過処理(F) LAD2細胞の代表的な密度プロットとゲートを示す。図中、「Stdcon」は標準対照ASOを示し、「I」はアイソタイプを示し、「S」はStdconを示し、「K」はKit Stopを示す。

【図3】KitStop ESOのトランスフェクションにより、変異型Kitの発現が失われることを示す図である。HMC-1.2細胞に10 μ Mの標準対照ASO (Stdcon) 又はKitStop ESOをトランスフェクトした後、フローサイトメトリーでK i tの発現を評価した。図3Aは、KitStop ESOによるトランスフェクションの24時間後(上図) 48時間後(中央図)及び72時間後(下図)におけるK i tの総発現のフローサイトメトリーヒストグラムを示す。図3Bは、幾何平均蛍光強度(MFI)から計算されたK i t全体の発現の平均フローサイトメトリーデータを示し、図3Cは、標準対照(Stdcon) ASOに対する割合(%)として表されたK i t全体の発現の平均フローサイトメトリーデータを示す。データは、3回の独立した実験からの平均 $\pm$ SEMである。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、分散分析(ANOVA)とSidakの事後検定による。図3 D E Fは、抗ヒトCD117抗体で標識されたHMC-1.2細胞の代表的なフローサイトメトリーゲーティング戦略とプロットを示す。図3 D E Fは、10 μ M KitStop ESOでトランスフェクトされ、24時間後(D)、48時間後(E)及び72時間後(F)にAPC結合抗ヒトCD117抗体で標識された固定及び透過処理HMC-1.2細胞の代表的な密度プロットとゲートを示す。KitStopで処理された細胞は、K i tの発現が減少し、前方散乱が減少し、細胞の収縮を示す。「Stdcon」は標準対照ASOを示し、「I」はアイソタイプを示し、「S」はStdconを示し、「K」はKit Stopを示す。

【図4】KitStopがHMC-1.2細胞の構成的KITシグナル伝達を低減することを示す図である。図4Aは、KitStop処理の24時間後のHMC-1.2細胞におけるKIT及びERKの構成的リン酸化のイムノプロットを示し、左から右に3つの独立した実験からのデータである。図4B及び4Cは、それぞれ β -アクチン又は総ERKに対する補正後のpKIT (B)及びpERK (C)についての、対照細胞のリン酸化に対して正規化された、組み合わせリン酸化データを示す。データは、3回の独立した実験からの平均 $\pm$ SEMである。*スチューデントの対応のあるt検定を使用して $p < 0.05$ であった。

【図5】KitStop ESOのトランスフェクションが、HMC-1.2細胞のアポトーシスを増加させることを示す図である。HMC-1.2細胞に10 μ Mの標準対照ASO (Stdcon) 又はKitStop ESOをトランスフェクトした後、アネキシンV-FITCで染色してフローサイトメトリーでHMC-1.2細胞のアポトーシスを評価した。図5Aは、Stdcon及び未染色細胞と比較した、KitStopトランスフェクト細胞のアネキシンV陽性染色のシフトを示すヒストグラムである。図5Bは、幾何学的MFIとして表されたアネキシンVのフローサイトメトリーの結合データである。図5C~Dは、HMC-1.2細胞の、各時点における、非アポトーシス(C)、初期アポトーシス(D)及び後期アポトーシス(E)ゲート内の割合(%)である。データは、3回の独立した実験からの平均 $\pm$ SEMである。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、分散分析(ANOVA)とSidakの事後検定による。図5 F Gは、アネキシンV-FITCで染色されたHMC-1.2細胞の代表的なフローサイトメトリーゲーティング戦略とプロットを示す。図5Fは、未染色又はアネキシンV-FITCで染色された生存未処理のHMC-1.2細胞のゲーティング戦略と代表的な密度プロットを示す。図5Gは、標準対照ASO (Stdcon) 又はKi

10

20

30

40

50

tStopESOでトランスフェクションされた後の、各時点におけるHMC-1.2細胞のアネキシンV染色強度のフローサイトメトリー密度プロットを示す。アポトーシス細胞は、前方散乱（X軸）で測定するとより小さくなり、アネキシンV陽性（Y軸）になる。「U」はラベルなし、「S」はStndcon、「K」はKit Stopを示す。

【図6】KitStop エキソスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)のトランスフェクションが、HMC-1.2細胞の生存率を低下させることを示す図である。HMC-1.2細胞に10 μ Mの標準対照ASO (Stndcon) 又はKitStop ESOをトランスフェクトした後、ヨウ化プロピジウム (PI) で染色してフローサイトメトリーによってHMC-1.2細胞の生存率を評価した。図A~Dは、24時間後 (A)、48時間後 (B) 及び72時間後 (C, D) におけるPI陰性及び陽性細胞の割合(%)を示す。図6Eは、LIVE/DEAD Green Dead Cell染色で染色されたHMC-1.2細胞の24時間後 (左)、48時間後 (中央) 及び72時間後 (右) のフローサイトメトリーヒストグラムを示す。各時点におけるHMC-1.2細胞のLIVE/DEAD染色の組み合わせ幾何学的MFIを示す。データは、3回の独立した実験からの平均 $\pm$ SEMである。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、分散分析(ANOVA)とSidakの事後検定による。図6Fは、ヨウ化プロピジウムで染色されたHMC-1.2細胞の代表的なフローサイトメトリーゲーティング戦略とプロットを示す。図6Gは、ヨウ化プロピジウム (PI) で染色されたHMC-1.2細胞の代表的な密度プロットを示す。図6GHは、標準対照ASO (Stndcon) (G) 又はKitStop ESO (H) でトランスフェクションした後の各時点でのHMC-1.2細胞のPI染色強度のフローサイトメトリー密度プロットを示す。図6IJは、LIVE/DEAD染色によるHMC-1.2細胞のフローサイトメトリーゲーティング戦略を示す。図は、生存HMC-1.2細胞と単一細胞集団のゲーティング (I) 及びLIVE/DEAD Green Dead Cell染色後の未処理細胞のゲーティング (J) を示す代表的な密度プロットを示す。「U」はラベルなし、「S」はStndcon、「K」はKit Stopを示す。

【図7】KitStop ESOのトランスフェクションが、HMC-1.2細胞の増殖を減少させることを示す図である。HMC-1.2細胞に10 μ Mの標準対照ASO (Stndcon) 又はKitStop ESOをトランスフェクトした後、細胞数の計測とフローサイトメトリーによりHMC-1.2細胞の増殖を評価した。図7Aは、トリパンプルーカウントによって評価された通常の条件下で培養された生存可能なHMC-1.2細胞の総数である。図7Bは、Stndcon ASO (上のパネル) 又はKitStop ESO (下のパネル) でトランスフェクションする前に、CellTraceをロードし、LIVE/DEAD Green Dead Cell染色で染色したHMC-1.2細胞の24時間後 (左)、48時間後 (中央) 及び72時間後 (右) の代表的な密度プロットである。Stndconでトランスフェクトされた細胞は、娘細胞間の色素希釈によるCellTrace蛍光強度の喪失を示し、細胞増殖を示している。これとは対照的に、KitStopをトランスフェクトした細胞は、72時間後の小集団を除いて、CellTraceの蛍光を保持し、LIVE/DEAD染色強度の増加を示した。図7Cは、増殖中の細胞に対応する、左下の象限 (CellTrace^{low}; LIVE/DEAD^{negative}) の細胞総数の割合(%)を示す。図7Dは、非増殖細胞 (CellTrace^{high}) に対応する、右上及び右下の象限の細胞総数の割合(%)を示す。図7Eは、非生存細胞に対応する、左上及び右上の象限 (LIVE/DEAD⁺) の細胞総数の割合(%)を示す。データは、3回の独立した実験からの平均 $\pm$ SEMである。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 、ANOVAとSidakの事後検定による。

【図8】KitStopESOが、インビトロ及びインビボでマウス肥満細胞の野生型Kitの発現を低下させることを示す図である。図8Aは、骨髓由来肥満細胞 (BMMC) における、マウスKitStop ESOによる野生型c-Kitのスプライススイッチングを示すRT-PCRであり、標準対照ASO (Stndcon) と比較した。黒い矢印は全長c-Kit、灰色の矢印は選択的スプライシングされたc-Kitを示す。図8Bは、KitStopESOでトランスフェクションした後の骨髓由来肥満細胞(BMMC)における表面野生型Kit発現のフローサイトメトリーヒストグラムである。データは、別々のマウスの3つの独立した実験の代表を示す。図8Cは、幾何学的MFIから計算された表面Kit発現の平均フローサイトメトリーデータであり、StndconASOの割合(%)として表す。データは、別々のマウスでの3回の独立した実験からの平均 $\pm$ SEMである。* $p < 0.01$ 、対応のあるt検定による。図8Dは、KitStop VivoMorpholinosの

10

20

30

40

50

腹腔内送達タイムラインを示す。図8Eは、腹膜洗浄によって収集された細胞におけるc-Kit発現のRT-PCRを示し、スプライススイッチングの証拠を伴う。黒い矢印は全長c-Kit、灰色の矢印=選択的スプライシングされたc-Kitを示す。図8FGは、Stndcon ASO (F) 又はKitStop ESO (G) VivoMorpholinosで処理されたマウスから採取された腹膜細胞の代表的なフローサイトメトリー密度プロットを示す。図8Hは、StndconASO又はKitStop ESO Vivo Morpholinosで処理した後、腹膜洗浄によって採取された、Kit及びFcεRI二重陽性細胞(図8F及び図8Gの右上の象限)として識別される肥満細胞の割合(%)を示す。各データポイントは異なるマウスを表し、データは2つの独立した実験を結合した(unpaired t検定からのp値)。「I」はアイソタイプ、「S」はStndcon、「K」はKit Stopを示す。

10

【図9】KitStop ESOがインビボでマウスの皮膚肥満細胞数を減少させることを示す図である。図9Aは、KitStop VivoMorpholinosの皮膚注射のタイムラインを示す。図9Bにおいて、標準対照ASO (Stndcon) 及びKitStop ESO処理グループの代表的なセクションでは、濃い紫色の色相を与える陽性染色の異染色性顆粒の存在により(矢印の先端を参照されたい)、肥満細胞を簡単に識別できた。図9Cにおいて、StndconASO及びKitStopESO処理マウスからのヘマトキシリン及びエオシン(H&E)染色による皮膚組織学によれば、正常な形態を示し、病理の兆候はなかった。図9Dは、StndconASO又はKitStopESOで処理された皮膚から採取され、トルイジンブルー染色された皮膚切片から得た1mm²あたりの真皮肥満細胞数のプロットを示す。図9Eは、付属器構造を取り巻く真皮及び皮下脂肪組織を含む全層皮膚切片から得た1mm²あたりの肥満細胞数のプロットを示す。各ドットは、標本全体の平均肥満細胞数を表す。P値は、unpaired-t検定のものである。

20

【図10】ヒト化異種移植肥満細胞腫瘍モデルにおいて、KitStop ESOの全身送達が増殖を阻害することを示す図である。図10Aは、使用した異種移植モデルのプロトコルの概略図を示す。図10Bは、治療中の経時的な腫瘍体積の測定値を示す。矢印は、KitStop又はビヒクル対照を投与した日を示す。図10Cは、14日目にマウスを安楽死させた後に切除された腫瘍の重量を示す。図10Dは、14日目にマウスを安楽死させた後の腫瘍の写真を示す。測定値の単位はセンチメートルである。図10Eは、実験終了時の脾臓重量を示す。図10Fは、実験終了時の肝臓重量を示す。図10Gは、実験の過程でマウスの体重をモニターしたことを示す。実験の過程で有意差は観察されなかった。データは、グループあたり5匹のマウスからの平均±SEMである。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001。分散分析(ANOVA)では、Dunnett事後検定(図10B)又はunpaired t検定(図10C及び10E)を使用した。

30

【配列の簡単な説明】

【0016】

配列番号1は、例示的なヒトc-Kit遺伝子産物(GENBANK(R)バイオ配列データベースのアクセッション番号NM_000222.2)のエキソン4を標的とするように設計されたKitStop ESOのヌクレオチド配列であり、スプライシングドナーサイト内の領域を標的にする。配列番号1は、GENBANK(R)バイオ配列データベースのアクセッション番号NM_000222.2で表されるヒトKIT遺伝子産物のエキソン4の3'端の6ヌクレオチド及び下流イントロンの19ヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするように設計されている。従って、配列番号1は、配列番号18のヌクレオチド41,835~41,859の逆相補体に対応する。

40

配列番号2は、例示的なマウスc-Kit遺伝子産物(GENBANK(R)バイオ配列データベースのアクセッション番号NM_001122733.1)のエキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)のヌクレオチド配列である。配列番号2は、GENBANK(R)バイオ配列データベースのアクセッション番号NM_001122733.1で表されるハツカネズミKit遺伝子産物のエキソン4の3'端の6ヌクレオチド及び下流イントロンの19ヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするように設計されている。従って、配列番号2は、配列番号19のヌクレオチド35,953~35,977の逆相補体に対応する。

【0017】

配列番号3は、KitSop ESOと同一の化学的性質を有するが、既知の如何なる遺伝子の

50

エキソンスキッピングをも誘導しない、標準的な対照アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) のヌクレオチド配列である。

配列番号 4 及び 5 は、ヒト c-KIT mRNA のエキソン 4 を増幅するために一緒に使用することができる順方向及び逆方向プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 6 及び 7 は、マウス c-kit mRNA のエキソン 4 を増幅するために一緒に使用できる順方向及び逆方向プライマーのヌクレオチド配列である。

配列番号 8 及び 9 は、それぞれ、例示的なヒト c-KIT 遺伝子産物のヌクレオチド及びアミノ酸配列である。このヌクレオチド配列は、GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NM_000222.2 に対応し、このアミノ酸配列は、GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NP_000213.1 に対応する。例示的なヒト c-KIT 遺伝子産物の膜貫通ドメインは、配列番号 9 のアミノ酸 525~545 に対応し、エキソン 10 内にコードされている。これより前の任意の短縮は、欠陥タンパク質におけるいくつかの実施態様及びいくつかの実施態様をもたらすはずであり、その結果、タンパク質の生成及び/又は細胞膜への局在化が失敗するはずである。

【0018】

配列番号 10 及び 11 は、それぞれ、例示的なマウス c-Kit 遺伝子産物のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列である。このヌクレオチド配列は、GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NM_001122733.1 に対応し、このアミノ酸配列は、GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NP_001116205.1 に対応する。

配列番号 12 及び 13 は、それぞれ、例示的なネコ c-Kit 遺伝子産物のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列である。このヌクレオチド配列は、GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NM_001009837.3 に対応し、このアミノ酸配列は、GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NP_001009837.3 に対応する。

配列番号 14 及び 15 は、それぞれ、例示的なイヌ c-Kit 遺伝子産物のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列である。このヌクレオチド配列は GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NM_001003181.1 に対応し、このアミノ酸配列は GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NP_001003181.1 に対応する。

配列番号 16 及び 17 は、それぞれ、例示的なウマ c-Kit 遺伝子産物のヌクレオチド及びアミノ酸配列である。このヌクレオチド配列は GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NM_001163866.2 に対応し、このアミノ酸配列は GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NP_001157338.2 に対応する。

【0019】

配列番号 18 は、ヒト c-Kit 遺伝子座の例示的なゲノム配列である。これは、GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NC_000004.12 のヌクレオチド 54,657,928~54,740,715 に対応する。

配列番号 19 は、マウス c-kit 遺伝子座の例示的なゲノム配列である。これは、GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NC_000071.6 のヌクレオチド 75,574,987~75,656,745 に対応する。

配列番号 20 は、ネコ c-Kit 遺伝子座の例示的なゲノム配列である。これは、GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NC_018726.3 のヌクレオチド 163,952,966-164,039,337 の逆相補体に対応する。

配列番号 21 は、イヌ c-Kit 遺伝子座の例示的なゲノム配列である。これは、GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NC_006595.3 のヌクレオチド 47,108,504~47,190,020 に対応する。

配列番号 22 は、ウマ c-Kit 遺伝子座の例示的なゲノム配列である。これは、GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NC_009146.3 のヌクレオチド 79,538,697~79,618,653 の逆相補体に対応する。

【0020】

配列番号 23~60 は、例示的なヒト c-KIT 遺伝子産物 (GENBANK(R) バイオ配列データベースのアクセッション番号 NM_000222.2) のエキソン 2~20 のうちの 1 つを標的と

10

20

30

40

50

するように設計された追加的例示的なエキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)のための標的ヌクレオチド配列であり、スプライスドナー部位又はスプライスアクセプター部位を含む領域を標的にすることができる。表3を参照されたい。特に、配列番号23及び24を使用して、エキソン2をスキップすることができ、その結果、配列番号61をコードするインフレーム欠失ヌクレオチド配列が得られる。配列番号25及び26を使用して、エキソン3をスキップすることができ、その結果、配列番号62をコードするインフレーム欠失ヌクレオチド配列が得られる。配列番号27及び28を使用して、エキソン4をスキップすることができ、その結果、配列番号63をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られる。配列番号29及び30を使用して、エキソン5をスキップすることができ、その結果、配列番号64をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られる。配列番号31及び32を使用して、エキソン6をスキップすることができ、その結果、配列番号65をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られる。配列番号33及び34を使用して、エキソン7をスキップすることができ、その結果、配列番号66をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られる。配列番号35及び36を使用して、エキソン8をスキップすることができ、その結果、配列番号67をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られる。配列番号37及び38を使用して、エキソン9をスキップすることができ、その結果、配列番号68をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られる。配列番号39及び40を使用してエキソン10をスキップすることができ、その結果、配列番号69をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られ、エキソン10が膜貫通ドメインをコードするため、いくつかの実施態様において、シグナル伝達ができない可溶性受容体を生成することができる。配列番号41及び42を使用してエキソン11をスキップすることができ、その結果、配列番号70をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られ、エキソン11は膜貫通ドメインのちょうどC末端のアミノ酸をコードするので、いくつかの実施形態ではキナーゼの死とドミナントネガティブなタンパク質を生成することができる。配列番号43及び44を使用して、エキソン12をスキップすることができ、その結果、配列番号71をコードするインフレーム欠失ヌクレオチド配列が得られる。配列番号45及び46を使用してエキソン13をスキップすることができ、その結果、配列番号72をコードするインフレーム欠失ヌクレオチド配列が得られる。配列番号47及び48を使用して、エキソン14をスキップすることができ、その結果、配列番号73をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られる。配列番号49及び50を使用して、エキソン15をスキップすることができ、その結果、配列番号74をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られる。配列番号51及び52を使用して、エキソン16をスキップすることができ、その結果、配列番号75をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られる。配列番号53及び54を使用してエキソン17をスキップすることができ、その結果、配列番号76をコードするインフレーム欠失ヌクレオチド配列が得られる。配列番号55及び56を使用してエキソン18をスキップすることができ、その結果、配列番号77をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られる。配列番号57及び58を使用してエキソン19をスキップすることができ、その結果、配列番号78をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られる。そして、配列番号59及び60を使用してエキソン20をスキップすることができ、その結果、配列番号79をコードするフレームシフトヌクレオチド配列が得られる。

【0021】

配列番号61～79は、配列番号23～60のエキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)を使用したエキソンスキッピングから生じるヒトKitポリペプチドのアミノ酸配列である。特に、配列番号61は、エキソン2スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号62は、エキソン3スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号63は、重度に短縮されたエキソン4スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号64は、重度に短縮されたエキソン5スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号65は、重度に短縮されたエキソン6スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号66は、重度に短縮されたエキソン7スキップタンパク質の予測ア

ミノ酸配列であり、配列番号67は、重度に短縮されたエキソン8スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号68は、重度に短縮されたエキソン9スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号69は、重度に短縮されたエキソン10スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号70は、重度に短縮されたエキソン11スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号71は、エキソン12スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号72は、エキソン13スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号73は、エキソン14スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号74は、エキソン15スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号75は、エキソン16スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号76は、エキソン17スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号77は、エキソン18スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、配列番号78は、エキソン19スキップタンパク質の予測アミノ酸配列であり、そして配列番号79は、エキソン20スキップタンパク質の予測アミノ酸配列である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

癌原遺伝子c-Kitの活性化変異は、全身性肥満細胞症や肥満細胞（MC）白血病などの悪性腫瘍に関連している。c-Kitは、肥満細胞（MC）の増殖に関与し、肥満細胞（MC）の生存に必要な受容体型チロシンキナーゼであるKit（CD117；肥満/幹細胞成長因子受容体（SCFR））をコードする。従って、Kitのシグナル伝達をブロックする治療法は、肥満細胞（MC）増殖性疾患を治療するための主要な戦略である。

しかし、ある程度の成功にもかかわらず、現在の治療法はオフターゲット効果を有し、一部の患者では、完全鎮静又は生存期間の改善を達成することができない。これは、部分的には、チロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性を付与するc-kit変異によるものである。本発明のいくつかの実施態様において、本明細書に開示されているのは、野生型又は変異型c-Kitのいずれかの成熟mRNAにフレームシフトを導入して、エキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)を用いて、Kit発現を特異的に標的として、Kit発現のダウンレギュレーション、腫瘍性肥満細胞（MC）増殖の抑制、及び肥満細胞（MC）アポトーシスの誘導をもたらす革新的なアプローチである。さらに、ESOの投与はインビボで組織肥満細胞（MC）を枯渇させ、治療の可能性を示す。

エキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)を用いた治療の可能性は、安定性と生物学的利用能を改善する化学修飾によって大幅に強化されている。現在、ESOは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーなどの機能喪失型フレームシフト変異に起因する遺伝病において明確な臨床応用があり、ESOは成熟mRNA転写産物のリーディングフレームを修復し、選択的スプライシングされているが部分的に機能するタンパク質の翻訳をもたらす。いくつかの実施態様において、本発明は、その反対を達成する、成熟mRNAにおける機能喪失フレームシフトをもたらす発癌性転写物のオープンリーディングフレームを破壊する、エキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)を提供する。本発明のいくつかの実施態様において、Kitを標的とすることは、インビボで迅速かつ効率的な肥満細胞（MC）の死及び肥満細胞（MC）数の減少をもたらし、Kit関連悪性腫瘍の満たされていない臨床的必要性に対処するためのKit標的治療法を示す。

【0023】

I. 定義

本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、以下で別途定義されない限り、当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を持つように意図されている。本明細書で使用される技術への言及は、それらの技術の変形又は当業者に明らかな同等技術の置換を含む、当技術分野で一般に理解される技術を指すものとする。以下の用語は、当業者によって十分に理解されると考えられるが、本発明の説明を容易にするために、以下の定義を示す。

以下の用語は、当業者によって十分に理解されると考えられるが、本発明の説明を容易にするために、以下の定義が示されている。

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「a (1つの)」、「an」及び「the (その)」は、文脈が明確に別段の指示をしない限り、複数の指示対象を含む。例えば、1つの核酸分子は、1又は複数の核酸分子を指す。そのため、「a (1つの)」、「an」、「1又はそれ以上」及び「少なくとも1つ」という用語は同じ意味で使用される。同様に、「comprising (から成る)」、「including (含む)」及び「having (有する)」という用語は、交互的に使用することができる。さらに、特許請求の範囲は、任意要素を除外して記載される場合があることに留意されたい。従って、この声明は、クレーム要素の列挙又は「負の」制限の使用に関連して、「単独で」、「のみ」などの排他的な用語を使用するための予めの宣言として機能することを意図している。

【0024】

本明細書では、範囲を、「約」ある特定の値から「約」別の特定の値までとして表すことができる。このような範囲が表現される場合、いくつかの実施態様は、1つの特定の値から及び／又は他の特定の値までを含む。同様に、値が先行詞「約」を使用することにより近似値として表される場合、この特定の値が実施態様を形成していることを理解されたい。さらに、範囲の各エンドポイントは、他のエンドポイントに関して、及び他のエンドポイントとは独立して、顕著であることを理解されたい。本発明の多くの値が開示され、各値がまた、その値自体に加えて、その特定の値について「約」として本明細書に開示されることを理解されたい。例えば、値「10」が開示されている場合、「約10」も開示されている。また、当業者が適切に理解するように、ある値がその値「以下」と示されている場合、「その値以上」及びそれらの値間の可能な範囲も開示されることも理解されたい。たとえば、値「10」が開示されている場合、「10以下」及び「10以上」も開示されている。本出願全体を通して、データはいくつかの異なるフォーマットで提供され、これらのデータは、いくつかの実施態様においてエンドポイント及び開始点を表し、いくつかの実施態様においてデータポイントの任意の組み合わせの範囲を表すことも理解されたい。例えば、特定のデータポイント「10」と特定のデータポイント「15」が開示される場合、10と15の間と同様に、10及び15より大きい、同等又はそれ以上、より小さい、同等又はそれ以下、及びこれらに等しいものも開示されていると考えられることを理解されたい。また、2つの特定のユニットの間の各ユニットも開示されていることを理解されたい。たとえば、10と15が開示されている場合、11、12、13及び14も開示されている。

【0025】

「及び/又は」という用語は、複数の事象のリストの文脈で使用される場合、それらの事象が単独で又は組み合わせて存在することを指す。

本明細書で使用される「任意」及び「任意に」という用語は、その後に説明されるイベント、状況、要素、及び／又は方法、工程が発生する場合もしない場合もあり、及び／又は存在する場合があり、その記載が前記イベント、状況、要素、又は方法、工程が発生するか、存在するか、存在しない例を含むことを示す。

本発明の化合物、組成物、物品、器具、及び／又は方法が開示及び説明される前に、これらは、別段の指定がない限り、特定の合成方法若しくは特定の組換え生物学的方法、又は別段の指定がない限り特定の試薬に限定されず、もちろん、それらは変化してもよいことを理解されたい。本明細書で使用される用語は、特定の実施態様を説明することのみを目的としており、限定することを意図するものではないことも理解されたい。

【0026】

II. 一般的考察

c-KIT変異の活性化に関連するヒトの悪性腫瘍には、肥満細胞増殖性疾患、消化管間質腫瘍 (GIST)、そしてまれに黒色腫と急性骨髄性白血病 (AML) が含まれる。正常なc-KITの発現の増加は、通常はKITを発現せず、幹細胞因子 (SCF) が豊富な環境にさらされている小さな肺細胞から固形肺がんの腫瘍が形成されることにも寄与する可能性がある。消化管間質腫瘍 (GIST) は、カハール介在細胞に由来すると考えられており、散発性GISTの最大80%で、c-Kitのエキソン8、11、13又は17が関与する少なくとも17の異なる活

10

20

30

40

50

性化変異が報告されている。同様に、異常な肥満細胞増殖（肥満細胞症）の疾患を持つ成人の約90%は、少なくとも、c-KIT（D816V）の触媒ドメインにおいてアスパラギン酸のバリンへの置換からなり、それを構成的に活性にする及び/又はc-KITにおける他の変異をもたらす、点突然変異を有する。

【0027】

従って、KIT活性を遮断する治療法は、これらの患者集団を治療するための主要なアプローチであり、これらの悪性腫瘍の一部を単独又は組み合わせて治療することである程度成功しているが、この他では、完全鎮静又は生存期間の改善はまれである。この治療の成功は、突然変異の種類及び/又はc-KIT又は他の癌原遺伝子における追加の突然変異の存在に関連している。KIT触媒活性を薬理的標的とすることは、KITを介した応答をブロックするための主要な戦略である。KIT関連の悪性腫瘍の治療における制限要因は、メシル酸イマチニブ（イマチニブ、STI571、グリーベック又はグリベック）及びその誘導体（ニロチニブ（AMN107）やPD180970など）などの、KITの不活性なATP結合部位コンフォメーションを標的とする阻害剤が、KITの活性で拡張されたコンフォメーションを阻害することに失敗していることであった。従って、最も攻撃的な肥満細胞症患者に見られるような、活性なコンフォメーションを安定化させる変異（主に、一般的なD816V変異を含むキナーゼドメイン変異）は、この薬剤に耐性がある。イマチニブの更なる欠点は、明らかにイマチニブに非感受性である受容体のキナーゼドメインにおける他の突然変異の獲得（又は濃縮）に部分的に起因する、薬物に対する二次耐性が一部の患者において発生することであった。従って、患者、は最初にイマチニブ感受性細胞を排除するイマチニブに反応する可能性があるが、イマチニブ耐性のクローン増殖が再発する可能性がある。

【0028】

KITに関連する腫瘍性疾患は、しばしば、特異性がなく、従って多くのオフターゲット効果を持つ薬剤によって治療される。イマチニブは、KITのキナーゼポケットに収まるので、他の薬剤よりもKITシグナル伝達に特異的であるため、最適な薬剤である。しかし、多くの患者、特に最も重篤な疾患の患者はイマチニブに耐性があり、広範囲でしばしば重篤な副作用を持つより一般的な阻害剤が使用される。

いくつかの実施態様において、本発明は、KITを標的とするので、一般的に使用される既存のキナーゼ阻害剤と比較して、オフターゲット効果は最小である。

ダサチニブ（BMS-354825）などの他の化合物は、D816V及び他のKD変異に関連する触媒活性を標的とすることがわかっている。ダサチニブは、KITの自己リン酸化を阻害し、かつそれぞれV560G変異又はV560GとD816V変異を発現する、ヒト肥満細胞株（HMC）-1.1及びHMC-1.2ヒト肥満細胞株の両方の増殖を阻害することが報告された。従って、HMC1.2肥満細胞株は、イマチニブ及び他の阻害剤に対する耐性を付与するキナーゼドメインの変異を抱えている。しかし、ダサチニブとその誘導体は、より広い特異性を持ち、Srcキナーゼ、Tecキナーゼ、ブルトン型チロシンキナーゼ（Btk）、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ、AKTなどの複数のキナーゼ、及び肥満細胞及び他のタイプの細胞において成長やその他の機能に重要なその他の受容体キナーゼに影響を及ぼす。従って、さまざまな経路に作用することで潜在的により効果的である一方で、患者によってそれらの明確な副作用も考慮に入れる必要がある。

【0029】

本発明は、肥満細胞におけるKITの発現を排除するKIT媒介応答の治療法であって、V560G及びD816V変異を抱える形質転換されたHMC1.2肥満細胞白血病細胞の増殖の喪失、アポトーシスの誘導、及び急速な細胞死をもたらす。治療法を提供する。これらの細胞は、肥満細胞症のための新薬を試験するために使用され、それらが発現する構成的に活性なKITのコンフォメーションにより、多くのキナーゼ阻害剤に耐性である。本発明は、これらの細胞を数時間以内に殺し、如何なる活性化KIT変異を抱える細胞を効果的に殺すと予測されている。いくつかの実施態様において、本発明は、化学的に安定なスプライススイッチングオリゴヌクレオチドを利用して、エキソン4（mRNAの非常に初期のエキソン）のエキソンスキッピングを誘導するKITプレmRNAのスプライシン

グを変更して、即時のSTOPコドンをもたらし、従って受容体の発現を排除するオープンリーディングにフレームシフトを導入する。

【0030】

本発明は、K i t 関連の癌及び腫瘍性疾患に利用することができ、この薬物を投与すると組織内の肥満細胞を特異的に枯渇させるため、肥満細胞関連疾患にも適用できる。肥満細胞を枯渇させると、過敏になる可能性のある肥満細胞によって引き起こされるアレルギーのような症状を和らげることができる。また、アレルギー患者の組織では肥満細胞の数が増加するが、この投与によってこれらの細胞が枯渇する可能性がある。骨髄外でのK i t の発現はいくつかの細胞タイプに限定されているので、本発明が標的となる。組織内の肥満細胞の枯渇は研究ツールとしても利用可能であり、肥満細胞を含む組織の間で、肥満細胞が不足している組織との比較が可能であれば、肥満細胞機能の研究が可能になる。これらの研究にK i t 欠損マウスが使用されてきたが、これらのマウスは、骨髄にK i t の機能に関連する他の免疫問題を有している。最後に、本発明は、犬（及びある程度は猫も）で最も一般的な腫瘍である肥満細胞腫の治療法を提供する。本発明は、ヒト肥満細胞白血球細胞におけるその高い効力を考えると、肥満細胞腫瘍細胞を殺すために使用することができる。

10

【0031】

III. オリゴヌクレオチド及び関連する方法

アンチセンス技術は、遺伝子産物の発現レベルを改変する効果的な方法であることが実証された（例えば、米国特許第8,765,703号、米国特許第8,946,183号及び米国特許公開第2015/0376615号を参照されたい。これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。）。アンチセンス技術は、mRNAの通常のプロセス中のよく知られた工程を妨害することによって機能する。簡単に言うと、細胞の核内でRNA分子はゲノムDNAから転写される。これらの新しく合成されたmRNA分子は、一次mRNA又はプレmRNAと呼ばれ、リボソームでタンパク質に翻訳するために細胞質に輸送される前に処理されなければならない。この処理には、5'メチル化キャップの追加とmRNAの3'末端へのポリ（A）テールの追加が含まれる。

20

【0032】

そして哺乳類のmRNAの90～95%の成熟が、mRNAのスプライシングを伴って起こる。イントロン（又は介在配列）は、成熟mRNAのコード配列中には含まれない、一次転写産物（又はそれをコードするDNA）の領域である。一方、エキソン（発現配列）は、細胞質に到達したときに成熟mRNA中に残る、一次転写産物（又はそれをコードするDNA）の領域である。スプライシングのプロセス中に、プレmRNA分子中の複数のエキソンは一緒にスプライシングされて成熟mRNA配列が形成される。スプライス部位とも呼ばれるスプライスジャンクションは、細胞装置によって、どの配列が除去されるか、及び結合される末端がどこで開始及び停止するかを決定するために、利用される。

30

このジャンクションの5'側の配列は、5'スプライス部位又はスプライスドナー部位と呼ばれ、このジャンクションの3'側の配列は、「3'スプライス部位」又は「スプライスアクセプター部位」と呼ばれる。スプライシング中に、上流のエキソンの3'末端が下流のエキソンの5'末端に結合される。従って、スプライシングされていないRNA（又はプレmRNA）は、イントロンの5'末端にエキソン/イントロンジャンクションと、イントロンの3'末端にイントロン/エキソンジャンクションを持つ。イントロンが除去された後、成熟したmRNAのエキソン/エキソンジャンクション又は境界と呼ばれることもある場所で、複数のエキソンが隣接する。潜在スプライス部位は、あまり使用されないが、通常のスプライス部位がブロックされているか利用できない場合には使用される可能性がある。細胞により複数のエキソンの異なる組み合わせが使用されることは、単一の遺伝子からの複数のmRNA転写物をもたらす可能性がある。

40

【0033】

アンチセンス技術の1つの用途において、アンチセンスオリゴヌクレオチド(AON)は、目的の遺伝子から転写されたmRNA分子に結合し、その分解を増加させることによって

50

、及び／又は立体障害によってmRNAの翻訳又は転座を防止することによって、mRNAを不活性化（オフ）する。最終結果は、対応する遺伝子の発現（即ち、対応する遺伝子によってコードされるタンパク質の最終的な生成）が減少又は排除されることである。代替として、アンチセンス技術を、遺伝子転写物のスプライシングに影響を与えるために用いることができる。この用途において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、プレスプライシングされたRNA分子（プレメッセンジャーRNA又はプレmRNAともいう）に結合して、細胞のスプライシング装置を再指導し、その結果スプライシングされたmRNA分子のエクソン含有量の改変をもたらす。従って、改変されたmRNAによってコードされるタンパク質の全体配列は、mRNAから翻訳されたスプライシングが変更されなかったタンパク質（即ち、完全長の野生型タンパク質）とは異なる。この変更されたmRNAから翻訳されるタンパク質は、短縮されているか、又は適切な機能に必要な重要な配列が欠落している可能性がある。典型的には、スプライシングに影響を与えるために使用される化合物は、標的とされるmRNAに相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであるか、又はこれを含んでいる。本明細書では、このようなオリゴヌクレオチドを「アンチセンスオリゴヌクレオチド」（AON）と呼ぶ。

10

本発明は、Kitタンパク質をコードするプレmRNAのスプライシングを調節するためのアンチセンス技術であって、それにより細胞によって発現されるKitタンパク質の量又は「レベル」の減少を引き起こす技術を提供する。従って、本発明の方法は、一般的に、Kit転写物を発現する細胞を、KitプレmRNAの領域を標的とするアンチセンスオリゴマーと接触させることによって達成することができる。このような接触は、その細胞によるアンチセンスオリゴマーの取り込み、Kit mRNAへのオリゴマーのハイブリダイゼーション、及びその後のKitプレmRNAのスプライシングの調節をもたらす。本発明の方法のいくつかの実施態様において、このようなKit mRNAのスプライシングの調節が、Kitの発現を減少させる。

20

【0034】

本発明は、本明細書に記載された特定の実施態様に限定されず、それ自体が変化することができる。さらに、本明細書で使用される用語は、特定の実施態様を説明することのみを目的としており、本発明を限定することを意図するものではない。

本明細書で使用される場合、用語「Kit」は、動物（例えば、哺乳類）において、癌原遺伝子c-Kit、チロシンプロテインキナーゼKit、及びCD117としても知られる、肥満/幹細胞成長因子受容体(SCFR)をコードする遺伝子遺伝子座を指す。Kitタンパク質は受容体型チロシンキナーゼである。Kit遺伝子及び遺伝子産物は多くの種で同定されており、特定の種においては、一般に、Kit遺伝子座によってコードされる複数の異なる遺伝子産物（RNAなど）がある。

30

GENBANK(R)バイオ配列データベースに存在するKit遺伝子産物の例示的で非限定的な要約を表1に示す。表1は、GENBANK(R)バイオ配列データベース中の特定の例示的な複数のKit遺伝子産物についてのアクセッション番号のみを含むのであって、他の種もKit遺伝子産物をコード及び発現するのであり、本発明の範囲にはこれらすべてが含まれることを理解されたい。更に、リストされた種及び他の種は、明示的にリストされていない追加のKit遺伝子産物を持つことができ、これらの追加のKit遺伝子産物のもまたすべて本発明の範囲内にある。従って、すべてのKitオルソログが、本発明の組成物及び方法の範疇に含まれることを明確に述べておく。

40

【0035】

50

【表 1】

表 1 例示的Kit遺伝子産物

遺伝子産物名	ヌクレオチドアクセッション番号	タンパク質アクセッション番号
ヒト		
アイソフォーム 1 前駆体	NM_000222.2	NP_000213.1
アイソフォーム 2 前駆体	NM_001093772.1	NP_001087241.1
アイソフォーム X1	XM_005265740.1	XP_005265797.1
アイソフォーム X2	XM_005265741.1	XP_005265798.1
アイソフォーム X3	XM_017008178.1	XP_016863667.1
アイソフォーム X4	XM_005265742.3	XP_005265799.1
アイソフォーム X5	XM_017008179.1	XP_016863668.1
アイソフォーム X6	XM_017008180.1	XP_016863669.1
Mus musculus		
アイソフォーム 1 前駆体	NM_001122733.1	NP_001116205.1
アイソフォーム 2 前駆体	NM_021099.3	NP_066922.2
アイソフォーム X1	XM_017320687.1	XP_017176176.1
Felis catus		
Kit 前駆体	NM_001009837.3	NP_001009837.3
Canis lupus familiaris		
Kit 前駆体	NM_001003181.1	NP_001003181.1
アイソフォーム X1	XM_005627968.3	XP_005628025.1
アイソフォーム X2	XM_005627969.3	XP_005628026.1
アイソフォーム X3	XM_005627970.3	XP_005628027.1
Equus caballus		
Kit 前駆体	NM_001163866.2	NP_001157338.2
アイソフォーム X1	XM_014738507.2	XP_014593993.2
アイソフォーム X2	XM_005608574.3	XP_005608631.2
アイソフォーム X3	XM_005608573.3	XP_005608630.2
他の生物種		
Pan paniscus アイソフォーム X1	XM_008954177.1	XP_008952425.1
Gorilla gorilla gorilla アイソフォーム X1	XM_019025974.1	XP_018881519.1
Macaca mulatta Kit 前駆体	NM_001266095.1	NP_001253024.1
Pongo abelii アイソフォーム X1	XM_024246425.1	XP_024102193.1
Macaca fascicularis アイソフォーム X1	XM_005555272.2	XP_005555329.1
Sus scrofa Kit 前駆体	NM_001044525.1	NP_001037990.1
Rattus norvegicus Kit 前駆体	NM_022264.1	NP_071600.1
Bos Taurus Kit 前駆体	NM_001166484.1	NP_001159956.1
Gallus gallus Kit 前駆体	NM_204361.1	NP_989692.1
Ovis aries Kit 前駆体	NM_001308594.1	NP_001295523.1

【0036】

同様に、Kitコード配列は、Kitタンパク質の少なくとも一部をコードする核酸配列を指す。この一部とは、タンパク質の断片（例えば、このタンパク質全体の任意の部分からの10、20、30、40、50、60、70、80、90又は100個の連続するアミノ酸セグメント）、エキソン若しくはドメイン（例えば、膜貫通ドメイン）であってもよく、又は如何なるスプライシングバリエーションを含むこのタンパク質全体を指してもよい。本発明のc-Kit遺伝子又はコード配列は、この遺伝子又はコード配列を有する如何なる哺乳動物に由来してもよい。限定ではなく例として、c-Kit遺伝子、コード配列、及び／又は遺伝子産物は、ヒト、マウス、イヌ、ネコ、ウマ、又は別の哺乳動物に由来してもよい。本明細書で使用され

る場合、c-Kit転写物は、c-Kit遺伝子座から転写されたRNA分子である。いくつかの実施態様において、本発明のオリゴマーによって標的とされるc-Kit転写物は、一次転写物又はプレmRNA分子である。本明細書で使用される場合、一次mRNA又はプレmRNAは、まだスプライシングを受けていないmRNA転写物である。一方、成熟mRNA分子は、スプライシングを受けたmRNA分子である。

【0037】

本明細書で使用される場合、用語「アンチセンスオリゴマー」は、核酸塩基を含むポリマー分子を指し、これは、mRNA分子などの核酸分子の配列にハイブリダイズすることができる。本明細書で使用される用語「核酸塩基」は、ヌクレオシドの複素環式塩基部分を指す。一般に、核酸塩基は、1又はそれ以上の原子又は原子のグループを含む任意のグループであり、別のヌクレオシドの塩基に水素結合することができる。プリン核酸塩基アデニン（A）及びグアニン（G）、並びにピリミジン核酸塩基チミン（T）、シトシン（C）及びウラシル（U）などの「未修飾」又は「天然」核酸塩基に加えて、当業者に知られている修飾核酸塩基又は核酸塩基模倣物もまた本発明の範疇である。用語「修飾核酸塩基」は、親核酸塩基と構造が類似している核酸塩基を指し、例えば、7-デアザプリン、5-メチルシトシン、Gクランプ、又は三環系フェノキサジンなどの核酸塩基模倣物などである。これらの修飾核酸塩基を調製するための方法は当業者に公知である。当技術分野で知られているように、ヌクレオシドは塩基と糖の組み合わせである。このヌクレオシドの塩基部分は、通常、複素環式塩基（例えば、核酸塩基又は単に「塩基」）である。このような複素環式塩基の2つの最も一般的なクラスは、プリンとピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合したリン酸基をさらに含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドの場合、リン酸基は、この糖の2'、3'又は5'ヒドロキシル部分に結合することができる。オリゴヌクレオチドを形成する際に、このリン酸基は連続するヌクレオシドを互いに共有結合させて、線状高分子化合物を形成する。オリゴヌクレオチド内では、リン酸基は一般にオリゴヌクレオチドのヌクレオシド間骨格を形成すると言われる。RNAとDNAの通常の結合又は骨格は、3'から5'へのホスホジエステル結合である。

【0038】

当技術分野では、RNA分子はしばしば半減期が短く、治療薬としてのそれらの使用を問題にしていると理解されている。従って、それらの活性を変えるためにオリゴヌクレオチドの化学修飾がよく使われる。化学修飾は、例えば、その標的RNAに対するアンチセンスオリゴマーの親和性を増加させること、ヌクレアーゼ耐性（例えば、RNaseHなどのリボヌクレアーゼに対する耐性）を上げること、及び/またはそのオリゴマーの薬物動態（例えば、半減期）を変えること、などによって、オリゴマー活性を変えることができる。例えば、糖、核酸塩基、及び/又はヌクレオシド間結合を、オリゴマーがその標的配列にハイブリダイズする能力を維持しながら、オリゴマーに望ましい特性（例えば、分解に対する耐性、増加した半減期など）を与える基で置換することができる。このような基は、類似体（例えば、糖類似体、核酸塩基類似体など）と呼ばれることがある。一般に、糖又は糖-ヌクレオシド間結合の組み合わせの代わりに類似体を使用する際には、選択された標的へハイブリダイゼーションするためにその核酸塩基は維持される。糖模倣物の代表的な例には、シクロヘキセン又はモルホリノが含まれるが、これらに限定されない。糖-ヌクレオチド間結合の組み合わせの模倣物の代表的な例には、非荷電のアキラル結合によって連結されたペプチド核酸（PNA）及びモルホリノ基が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの場合には、核酸塩基の代わりにアナログ（類似体）が使用される。代表的な核酸塩基模倣物は当技術分野で周知であり、三環系フェノキサジン類似体やユニバーサル塩基が含まれるが、これらに限定されない（例えば、Berger et al., 2000,を参照されたい。これらは参照により本明細書に組み込まれる。）。このような糖、ヌクレオチド、及び核酸塩基模倣物の例は、米国特許第8,765,703号及び第8,946,183号に開示されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。糖、ヌクレオチド及び核酸塩基模倣物の合成方法、並びにオリゴヌクレオチドを生成するためのこのような模倣物の使用は、当業者に

よく知られている。

【0039】

用語「オリゴマー」は、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、オリゴヌクレオチド類似体、オリゴヌクレオチド模倣物、及びそれらのキメラ組み合わせ体を含む。このような分子は、一般に当業者に知られている。本発明のオリゴマーには、プライマー、プローブ、アンチセンス化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、外部ガイド配列(EGS)オリゴヌクレオチド、代替スプライサー、及びsiRNAが含まれるが、これらに限定されない。従って、これらの化合物は、一本鎖、二本鎖、円形、分岐又はヘアピンの形で導入することができ、内部又は末端のバルジ又はループなどの構造要素を含むことができる。本発明のオリゴマーは、mRNA分子のスプライシングを調節するために細胞又は個体に投与するのに適すれば、任意の長さであってよい。例えば、本発明のアンチセンスオリゴマーは、約10から約50のヌクレオシド（即ち、約10から約50の連結ヌクレオシド）を含むことができる。当業者は、これが0, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 又は50核酸塩基のアンチセンスオリゴマーを具体化していることを理解するであろう。いくつかの実施態様において、本発明のアンチセンスオリゴマーは、10～30個の核酸塩基、又は10～25個の核酸塩基を含む、又はそれらのみから成ることができる。本発明のアンチセンスオリゴマーの適切な長さを決定する方法は、本開示をレビューすることにより当業者に明らかであろう。

【0040】

本明細書で使用される場合、用語「を標的とする」や用語「標的に向く」などは、アンチセンスオリゴマーを設計して、それが所望のmRNA分子などの所望の核酸分子に特異的にハイブリダイズするようにするようなプロセスを指す。用語「ハイブリダイズする」、用語「ハイブリダイゼーション」、用語「にハイブリダイズする」などは、当技術分野の用語であって、複数のオリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンスオリゴマー及びmRNA分子の標的配列）の相補鎖における核酸塩基の対形成することをいう。特定のメカニズムに限定されないが、対形成の最も一般的なメカニズムは、相補的ヌクレオシド又はヌクレオチド塩基（核酸塩基）間の水素結合を含み、これは、ワトソンクリック、フーグステイーン又は逆フーグステイーン水素結合であってもよい。たとえば、天然塩基アデニンは、天然の核酸塩基であるチミジンとウラシルに相補的であり、水素結合の形成を通じて対を形成する。同様に、天然塩基グアニンは天然塩基シトシン及び5-メチルシトシンに相補的である。本発明の文脈において、句「特異的にハイブリダイズする」とは、本発明のアンチセンスオリゴマーが、Kitタンパク質の構造に関連しないタンパク質をコードするmRNAに結合するのではなく、Kitタンパク質をコードするmRNA（例えば、プレmRNA）に優先的に結合する能力を指す。さらに、標的配列に優先的に結合するアンチセンスオリゴマーは、Kitタンパク質をコードするmRNA（KitプレmRNA）とハイブリダイズするが、Kitタンパク質の構造に関連しないタンパク質をコードするmRNAとは有意なハイブリダイゼーションを示さないものである。この文脈における有意なハイブリダイゼーションとは、例えば、本発明のオリゴマーがKitタンパク質の構造に関連しないタンパク質をコードするmRNAに、アンチセンスオリゴマーが所望の効果を達成する能力を妨害するのに十分に高い親和性又は結合力で、結合することをいう。この所望の効果の例には、KitプレmRNAのスプライシングの調節、Kitタンパク質の発現レベルの低下、及び個人におけるKit関連症状の低下又は阻害が含まれるが、これらに限定されない。従って、本開示をレビューする際、特異的結合が望まれる条件下（即ち、インビボアッセイ又は治療的治療の場合には生理学的条件下、及びインビトロアッセイの場合にはアッセイが実施される条件下）における非標的核酸配列へのアンチセンスオリゴマーの有意な結合を回避するため、アンチセンスオリゴマー中の核酸塩基の線形配列と標的配列中の核酸塩基の線形配列との間に十分な程度の相補性がある場合、アンチセンスオリゴマーは標的配列に特異的（具体的には、ハイブリダイズ可能、具体的にハイブリダイズするなど）であると考えられる。

【0041】

本明細書で使用される場合、用語「相補的」、用語「相補性」、用語「相補」などは、オリゴマー中の核酸塩基と標的配列中の核酸塩基中との間で正確に対形成する能力をいう。従って、オリゴマーの特定の位置にある核酸塩基（例えば、アデニン）が、標的核酸中の標的配列の特定の位置にある核酸塩基（例えば、ウラシル）と水素結合することができる場合、このオリゴマーと標的核酸との間の水素結合の位置は、相補的な位置であると考えられる。通常、「用語「相補的」、用語「相補性」、用語「相補」などは、単一の塩基と塩基の間ではなく、第1の核酸分子（例えば、オリゴマー）中の定義された数の連続ヌクレオチドと、第2の核酸分子（例えば、mRNA分子）中の同様の数の連続ヌクレオチドとの間の比較の文脈で見られる。例えば、アンチセンスオリゴマーが25ヌクレオチドの長さである場合、標的配列との相補性は、通常、オリゴマー全体又はその定義された部分の配列を、mRNA分子内のある数の連続するヌクレオチドと比較することによって決定される。オリゴマー及び標的配列は、各分子内の十分な数の対応する位置が、互いに水素結合できる核酸塩基によって占められている場合、互いに相補的である。ある位置を占める塩基が、もし相補的であるならば塩基が水素結合を形成するように、空間的に配置されている場合、その位置は対応している。一例として、オリゴマーの配列を標的配列中の同様のサイズの配列と比較する場合、このオリゴマー中の最初のヌクレオチドが、標的配列の開始地点で選択されたヌクレオチドと比較される。次に、オリゴマーの2番目のヌクレオチド（最初のヌクレオチドに対する3'）が、選択した開始ヌクレオチドに対する3'のヌクレオチドと直接比較される。次に、このプロセスが、オリゴマーの長さに沿って各ヌクレオチドで継続される。従って、用語「特異的にハイブリダイズ可能」及び用語「相補的」は、アンチセンス化合物と標的核酸との間で安定で特異的な結合が起こるように、十分な数の連続核酸塩基にわたって、十分な程度の正確な対形成又は相補を示すために使用される。

【0042】

第1の核酸分子が第2の核酸分子と特異的にハイブリダイズするハイブリダイゼーション条件は、当技術分野では一般にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件と呼ばれている。当業者には、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、配列依存性であって、異なる状況では異なっている可能性があると理解されている。従って、本発明のオリゴマーが標的配列に特異的にハイブリダイズするストリンジェントな条件は、オリゴマー配列と標的配列の相補性及びそれらが調査されているアッセイの性質によって決定される。関連技術分野の当業者は、所与のアッセイ又は所与の用途のために、特定の標的配列に特異的にハイブリダイズする相補的配列を設計することができる。

【0043】

核酸分子を標的とするアンチセンスオリゴマーを設計するプロセスは、通常、その発現が調節されるべき標的核酸の同定、及び標的核酸分子の配列の決定から始まる。ここで使用される場合、用語「標的核酸」、用語「Kitタンパク質をコードする核酸」などは、例えば、Kitタンパク質をコードするDNA、そのようなDNAから転写されたRNA（プレmRNA及びmRNAを含む）、及びそのようなRNAに由来するcDNAを包含する。例えば、この標的核酸は、その発現が特定の疾患や病状に関連する細胞遺伝子（又はそこから転写されるプレmRNA又はmRNA）であってもよい。従って、いくつかの実施態様において、有用な標的核酸は、Kitタンパク質をコードする。いくつかの実施態様において、この標的核酸は、c-Kit転写物である。いくつかの実施態様において、この標的核酸は、c-KitプレmRNAである。

標的核酸が同定されると、この標的化プロセスは、アンチセンス相互作用が起こる少なくとも1つの標的領域を決定する段階と、それにより、この標的核酸のスプライシングを調節する段階を含む。ここで使用される場合、標的領域は、少なくとも1つの識別可能な構造、機能、又は特徴を有する標的核酸の一部として定義される。例示的な標的領域は、プレmRNA分子のスプライシングに関与する配列を含む領域である。このような識別可能な構造、機能、又は特徴の例には、イントロン又はエキソンの少なくとも一部、イントロ

ン/エキソン接合部、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、スプライス分岐点、又はスプライスエンハンサーサイトが含まれるが、これらに限定されない。従って、いくつかの実施態様において、この標的領域は、イントロン又はエキソンの少なくとも一部、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、スプライス分岐点、及び／又はスプライスエンハンサー部位を含む。いくつかの実施態様において、この標的領域は、イントロン又はエキソン、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、スプライス分岐点、及び／又はスプライスエンハンサー部位を含む。

【0044】

標的領域の同定に続いて、この標的領域内の標的配列を特定することができる。ここで使用される場合、標的配列は、本発明のアンチセンスオリゴマーが特異的にハイブリダイズする標的領域内の核酸配列である。例示的な標的配列は、プレmRNAのスプライシングに関与するものである。

標的配列が同定されると、アンチセンスオリゴマーを、アンチセンスオリゴマーが標的核酸に特異的にハイブリダイズするように、標的配列に十分に相補的な核酸塩基配列を含むように設計する。より具体的には、このアンチセンスオリゴマーのヌクレオチド配列は、アンチセンスオリゴマーが標的核酸に特異的にハイブリダイズするように、その標的配列に十分に相補的な連続ヌクレオチドの領域を含むように設計される。このオリゴマー中の連続する相補的ヌクレオチドのこのような領域は、「アンチセンス配列」又は「標的配列」と呼ばれる。

【0045】

2つの核酸配列間の相補性の程度が高いほど、ハイブリダイゼーション相互作用がより強く、より特異的であることが当技術分野でよく知られている。また、最も強力で最も特異的なハイブリダイゼーションは、完全に相補的な2つの核酸分子間で起こることもよく理解されている。ここで使用される場合、完全相補的という用語は、核酸配列中の各核酸塩基が、第2の核酸分子中の対応する位置の核酸塩基と水素結合することができる状況を指す。いくつかの実施態様において、この標的に向く配列は、標的配列に対して完全に相補的である。いくつかの実施態様において、この標的に向く配列は、標的配列中の少なくとも6つの連続する核酸塩基領域に完全に相補的である少なくとも6つの連続する核酸塩基領域を含む。いくつかの実施態様において、この標的に向く配列は、標的配列中の少なくとも8つの連続する核酸塩基配列に完全に相補的である少なくとも8つの連続する核酸塩基配列を含む。いくつかの実施態様において、この標的に向く配列は、標的配列中の少なくとも10個の連続する核酸塩基配列に完全に相補的である少なくとも10個の連続する核酸塩基配列を含む。いくつかの実施態様において、この標的に向く配列は、標的配列中の少なくとも12個の連続する核酸塩基配列に完全に相補的である少なくとも12個の連続する核酸塩基配列を含む。いくつかの実施態様において、この標的に向く配列は、標的配列中の少なくとも14個の連続する核酸塩基配列に完全に相補的である少なくとも14個の連続する核酸塩基配列を含む。いくつかの実施態様において、この標的に向く配列は、標的配列中の少なくとも16個の連続する核酸塩基配列に完全に相補的である少なくとも16個の連続する核酸塩基配列を含む。いくつかの実施態様において、この標的に向く配列は、標的配列中の少なくとも18個の連続する核酸塩基配列に完全に相補的である少なくとも18個の連続する核酸塩基配列を含む。いくつかの実施態様において、この標的に向く配列は、標的配列中の少なくとも20個の連続する核酸塩基配列に完全に相補的である少なくとも20個の連続する核酸塩基配列を含む。

【0046】

当業者は、この標的に向く配列が、本発明のアンチセンスオリゴマーの全体を構成することができる、又はこれが本発明のアンチセンスオリゴマーの一部を構成することができることを理解するであろう。例えば、30ヌクレオチドのうちの20からなるオリゴマーにおいて、30ヌクレオチドすべてが、30個の連続するヌクレオチド標的配列に相補的であることができる。あるいは、例えば、このオリゴマー中の20個の連続するヌクレオチドのみが、20個の連続するヌクレオチド標的配列に相補的であって、このオリゴマー

中の残りの10個のヌクレオチドは、標的配列の外側のヌクレオチドとミスマッチであってもよい。いくつかの実施態様において、本発明のオリゴマーは、少なくとも10個の核酸塩基、少なくとも11個の核酸塩基、少なくとも12個の核酸塩基、少なくとも13個の核酸塩基、少なくとも14個の核酸塩基、少なくとも15個の核酸塩基、少なくとも16個の核酸塩基、少なくとも17個の核酸塩基、少なくとも18個の核酸塩基、少なくとも19個の核酸塩基、少なくとも20個の核酸塩基、少なくとも21個の核酸塩基、少なくとも22個の核酸塩基、少なくとも23個の核酸塩基、少なくとも24個の核酸塩基、少なくとも25個の核酸塩基、少なくとも26個の核酸塩基、少なくとも27個の核酸塩基、少なくとも28個の核酸塩基、少なくとも29個の核酸塩基、又は少なくとも30個の核酸塩基の長さの標的に向く配列を有する。

【0047】

当業者は、標的に向く配列と標的配列との間にミスマッチが含まれることが、オリゴマーの活性（例えば、スプライシングの調節）を排除することなく可能であることを理解するであろう。さらに、このようなミスマッチは、アンチセンスオリゴマーが標的核酸分子に特異的にハイブリダイズすることができる限り、標的に向く配列と標的配列との間のアンチセンス相互作用内のどこでも起こり得る。従って、本発明の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配列に特異的にハイブリダイズする限り、アンチセンスオリゴマーの標的配列への塩基対形成を破壊するミスマッチであるヌクレオチドを最大約20%含むことができる。いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、ミスマッチを、20%以下、約15%以下、約10%以下、約5%以下、又は約3%以下、又はそれより少なく含む。いくつかの実施態様において、対形成に参与するアンチセンスオリゴマー中のヌクレオチドと相補的な標的配列との間にミスマッチはない。いくつかの実施態様において、ミスマッチは連続する位置では発生しない。例えば、3つのミスマッチ位置を含むアンチセンスオリゴマーにおいて、いくつかの実施態様において、これらのミスマッチ位置は、標的配列中の15ヌクレオチドと相補的である連続ヌクレオチド（例えば、3個、4個、5個など）の複数のつながりで分離されることができる。

【0048】

表現「パーセント同一である」の使用は、2つの核酸配列間のミスマッチの数を定義する一般的な方法である。たとえば、同じ核酸塩基の対形成能力を持つ2つの配列は、100%同一であると見なされる。さらに、ウラシルとチミジンの両方がアデニンと結合することを理解する必要がある。その結果、一方が位置xにウラシルを持ち、もう一方が対応する位置xにチミジンを持っていたとしても、他の点では配列が同一である2つの分子は同一であると見なされる。パーセント同一性は、オリゴマー化合物の全長にわたって、又はオリゴマーの一部のみにわたって計算されてもよい。例えば、標的配列を含む核酸分子に結合する標的に向く配列を含むオリゴマーの能力を決定するために、この標的配列に対するこの標的に向く配列のパーセント同一性を計算することができる。いくつかの実施態様において、標的に向く配列は、標的核酸分子中の標的配列の全長に、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、又は少なくとも99%同一である。いくつかの実施態様において、標的に向く配列は、その全長にわたって、標的核酸分子中の標的配列と同一である。当業者は、アンチセンスオリゴマーが、ここに記載のアンチセンスオリゴマーと同様に機能するためには、本発明のオリゴマー配列と完全に同一である必要はないことを理解するであろう。ここで教示されるアンチセンスオリゴマーの短縮バージョン、又はここで教示されるアンチセンスオリゴマーの非同バージョンも、本発明の範囲内である。この非同バージョンとは、各塩基が本発明のアンチセンスオリゴマーと100%同一性を持たないバージョンのことである。あるいは、非同バージョンは、異なる対形成活性を持つ異なる塩基に置き換えられた少なくとも1つの塩基を含めることができる（たとえば、GをC、A又はTに置き換える）。

【0049】

パーセント同一性は、比較対象のオリゴマーに対応する同一の塩基対を持つ塩基の数に

従って計算される。同一でない塩基は、互いに隣接しているか、オリゴマー全体に分散しているか、又はその両方であってもよい。たとえば、20-merのうち核酸塩基2-17と同じ配列を持つ16-merは、20-merと80%同一である。あるいは、20-merと同一ではない4つの核酸塩基を含む20-merも、20-merと80%同一である。18-merのうち核酸塩基1-14と同じ配列を有する14-merは、18-merと78%同一である。このような計算は、当業者の能力の範囲内である。従って、本発明のアンチセンスオリゴマーは、このアンチセンスオリゴマーが所望のmRNA分子のスプライシングを調節することができる限り、ここに開示する配列に対して、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも92%同一、少なくとも94%同一、少なくとも96%同一、又は少なくとも98%同一のオリゴヌクレオチド配列を含む。

【0050】

本発明のアンチセンスオリゴマーは、mRNA分子のスプライシングを調節することができる。ここで使用される場合、スプライシングの「調節」とは、エキソンスキッピング（又はエキソン包含）、1又はそれ以上のエキソンの欠失、又はスプライシングされたmRNAには通常見られない配列の追加（例えば、イントロン配列）の結果、得られたスプライシングされたmRNA分子が複数のエキソンの所望の組み合わせを含むように、プレmRNA転写物のプロセッシングに影響を与えるアンチセンスオリゴマーの能力をいう。例えば、スプライシングの調節は、スプライシングされたmRNA（成熟mRNA）が1つのエキソンの少なくとも一部又は全体を欠くように、KitプレmRNAのスプライシングに影響を与えることといえることができる。いくつかの実施態様において、スプライシングされたmRNAは、エキソン4の少なくとも一部を欠く。Kitタンパク質の短縮されたアイソフォームが細胞に存在し、このような短縮が、Kitタンパク質をコードするmRNAのエキソン4における短縮によるものである場合がある可能性がある。従って、本発明を説明する目的で、短縮型Kitタンパク質をコードする短縮型mRNAを生成するための、アンチセンスオリゴマーの影響によるKitプレmRNAのスプライシングは、選択的スプライシングと呼ぶことができる。さらに、アンチセンスオリゴマーの影響による、エキソン4の少なくとも一部又は全体を欠くKit mRNA転写産物は、選択的スプライシングの産物である。従って、本発明の文脈において、スプライシングの調節は、KitプレmRNA分子の選択的スプライシングを誘導し、それにより、エキソン4全体を含むmRNA分子のレベルを低下させ、エキソン4の少なくとも一部を欠くmRNA分子のレベルを上昇させることを指すことができる。

【0051】

本開示は、ヒト又はネズミのKit遺伝子のエキソン4を標的とすることに関する組成物及び方法を例示するが、ヒト又はネズミのKit遺伝子両方の他のエキソンもまた、ヒト及びマウスにおいて標的にされることができると理解されたい。さらに、ネコ、イヌ、ウマ、又は他の動物において、エキソン4又は他の任意のエキソンもまた標的とすることができ、従って、ここに開示する標的戦略の特定の例は、例示にすぎないと理解されたい。特定の例示的動物におけるKit遺伝子座のゲノム構成の要約を表2に示す。

【0052】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2 例示的動物におけるKit遺伝子座のゲノム構成

動物種	遺伝子座 SEQ ID NO:	遺伝子座中のエキソンのヌクレオチド位置
ヒト	18	1-154; 37585-37854; 40357-40638; 41703-41839; 45797-45965; 49171-49360; 51497-51612; 65657-65771; 67930-68123; 69291-69397; 69489-69615; 69896-70000; 70084-70194; 71408-71558; 73401-73492; 73944-74071; 75143-75265; 78571-78682; 78794-78893; 79248-79353; 80502-82788
Mus musculus	19	1-132; 32040-32312; 34284-34565; 35821-35957; 40333-40507; 45861-46050; 48003-48118; 62308-62422; 63979-64172; 65507-65613; 65713-65839; 66124-66228; 66341-66451; 70850-71000; 72762-72850; 73401-73528; 74561-74683; 77564-77675; 77771-77870; 78234-78339; 79428-81736
Felis catus	20	1-1102; 2207-2312; 2677-2776; 2888-2999; 7017-7139; 8196-8323; 8814-8905; 10742-10892; 12058-12168; 12258-12362; 12645-12771; 12869-12975; 14198-14391; 15933-16047; 31125-31240; 33427-33616; 38728-38899; 43910-44047; 45147-45428; 48253-48522; 86237-86372 の逆相補体
Canis lupus familiaris	21	1-101; 35944-36213; 38998-39279; 40364-40500; 45080-45251; 49157-49346; 52424-52539; 66555-66669; 68419-68612; 69809-69915; 70009-70135; 70421-70525; 70612-70722; 71913-72063; 73946-74037; 74515-74642; 75747-75869; 79360-79471; 79585-79684; 80038-80143; 81200-81517
Equus caballus	22	1-129; 1273-1378; 1734-1833; 1950-2061; 5375-5497; 6550-6677; 7176-7267; 9440-9590; 10826-10936; 11023-11127; 11397-11523; 11617-11723; 13186-13367; 15056-15170; 28125-28240; 30357-30546; 34989-35160; 39789-39925; 41022-41303; 43889-44158; 79800-79957の逆相補体

【0053】

表 2 は配列番号 18～22 のエキソンの位置をリストしているので、リストされた位置の間にあるヌクレオチドはイントロン配列であることは理解されたい。例えば、ヒト c-KIT エキソン配列は、配列番号 18 のヌクレオチド 1-154, 37585-37854, 40357-40638, 41703-41839, 45797-45965, 49171-49360, 51497-51612, 65657-65771, 67930-68123, 69291-69397, 69489-69615, 69896-70000, 70084-70194, 71408-71558, 73401-73492, 73944-74071, 75143-75265, 78571-78682, 78794-78893, 79248-79353, 及び 80502-82788 を示す。配列番号 18 は、ゲノム配列であるため、ヒト c-KIT イントロン配列は、配列番号 18 のヌクレオチド 155-37584, 37855-40356, 40639-41702, 41840-45796, 45966-49170, 49361-51496, 51613-65656, 65772-67929, 68124-69290, 69398-69488, 69616-69895, 70001-70083, 70195-71407, 71557-73400, 73493-73943, 74072-75142, 75266-78570, 78683-78793, 78894-79247, 及び 79354-80501 に相当する。

【0054】

エキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)を設計する際に、いくつかの実施態様において、ESO は、エキソン／イントロン又はイントロン／エキソン境界に広がり、これは ESO が、スプライスドナー又はスプライスアクセプターの 5' 及び 3' の両方である連続ヌクレオチドを含むことを意味する。エキソンの一部である ESO のヌクレオチドの数及び隣接するイントロンの一部である ESO のヌクレオチドの数は変動してもよいが、いくつかの実施態様において、少なくとも 5 つのエキソンヌクレオチド及び少なくとも 5 つのイントロンヌクレオチドが存在する。限定ではなく例として、ESO が配列番号 1 及び

2 の場合のように 2 5 ヌクレオチドを有するように設計されている場合、いくつかの実施態様において、この ESO はそれぞれ 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 又は 20 の連続するエキソンヌクレオチドを含み、また直接隣接する 10, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 又は 5 の連続するイントロンヌクレオチドを含む。別の言い方をすれば、配列番号 1 8 ~ 2 2 の全てについて、ESO は、いくつかの実施態様において、配列番号 18 ~ 22 のいずれかの 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 又はそれ以上の連続するヌクレオチドを含み、15 ~ 25 又はそれ以上の連続するヌクレオチドは、少なくとも 1 つのスプライドナー又はスプライスアクセプター配列を含む。ESO が、長さが 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 又はそれ以上のプレ mRNA 配列を標的とするように設計できるように、5' 方向及び/又は 3' 方向の配列の伸長が可能である。

10

【0055】

表 3 に、ヒト c-KIT 遺伝子産物を標的とする際に使用するためのエキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)を設計するために採用できる例示的な標的配列を示す。これらの標的配列は、非ヒト動物の c-Kit 遺伝子産物を標的とするために使用する ESO を設計するために使用できるが、表 3 の例示的な ESO に対して採用されたアプローチに基づいていることに留意されたい。

【0056】

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3 ヒトc-KIT遺伝子産物を標的とするための例示的な標的配列

エキソン		ドナー標的配列*
2	アクセプター** ドナー	aacacgattctgttttcttggcagGCTCTTCTCAACCATCTGTGAGTCC (配列番号 23; 配列番号 18のヌクレオチド 37560-37609) AATTCCATTTATGTGTTTGTAGAGGtaaatgcttggcttctgcagtgc (配列番号 24; 配列番号 18のヌクレオチド 37830-37879)
3	アクセプター ドナー	actgatttggatatgcttctatagATCCTGCCAAGCTTTTCCTTGTGTA (配列番号 25; 配列番号 18のヌクレオチド 40332-40381) AAATTCATCCTGAAAGTGAGGCCAGgtactggctcttcttctgcctc (配列番号 26; 配列番号 18のヌクレオチド 40614-40663)
4	アクセプター ドナー	ggggccacattcttttcattctagCCTTCAAAGCTGTGCCTGTTGTGTC (配列番号 27; 配列番号 18のヌクレオチド 41678-41727) AACGTGGAAGAGAGAAACAGTCAGgtgagtgaatcgttcattctctc (配列番号 28; 配列番号 18のヌクレオチド 41815-41864)
5	アクセプター ドナー	tttctccttttgaaccagcagACTAAACTACAGGAGAAATATAATA (配列番号 29; 配列番号 18のヌクレオチド 45772-45821) GTCACAACAACCTTGAAGTAGTAGtaaatacctctatgggaatgtta (配列番号 30; 配列番号 18のヌクレオチド 45941-45990)
6	アクセプター ドナー	ttctgtcttattcattctaattagATAAAGGATTTCATTAATATCTTCCC (配列番号 31; 配列番号 18のヌクレオチド 49146-49195) AGTCTGAGAATGAAAGTAATATCAGtaagaaatggaccttgccttgggg (配列番号 32; 配列番号 18のヌクレオチド 49336-49385)
7	アクセプター ドナー	ttgactagtgtcttttctttagATACGTAAGTGAACCTTCATCTAACG (配列番号 33; 配列番号 18のヌクレオチド 51472-51521) ATAGCATTTAATGTTTATGTGAATAgtaagtaacatgaagggtcctttt (配列番号 34; 配列番号 18のヌクレオチド 51588-51637)
8	アクセプター ドナー	tatggccatttctgttttctttagCAAAACCAGAAATCCTGACTTACGA (配列番号 35; 配列番号 18のヌクレオチド 65632-65681) ATTTTGTCCAGGAAGTGAAGCAGAGgtgagatgatttttggcactgc (配列番号 36; 配列番号 18のヌクレオチド 65747-65796)
9	アクセプター ドナー	ggcttttcttcttcccttagATGCTCTGCTTCTGTACTGCCAGTG (配列番号 37; 配列番号 18のヌクレオチド 67907-67954) TTTGCATTTAAAGGTAACAACAAAGgtatattcttttaaccaattta (配列番号 38; 配列番号 18のヌクレオチド 68099-38148)
10	アクセプター ドナー	attccacatttcttccattgtagAGCAAATCCATCCCCACACCCTGTT (配列番号 39; 配列番号 18のヌクレオチド 69266-29315) GATTCTGACCTACAAATATTTACAGtaaccatttattgttctctctcc (配列番号 40; 配列番号 18のヌクレオチド 69373-69422)

【 0 0 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

表 3 続き

11	アクセプター ドナー	tctattttcccttttccccacagAAACCCATGTATGAAGTACAGTGGGA (配列番号 41; 配列番号 18のヌクレオチド 69464-69513) TTTCCCAGAAACAGGCTGAGTTTTGgtcagatgaaacaggggtttcca (配列番号 42; 配列番号 18のヌクレオチド 69591-69640)
12	アクセプター ドナー	taccttggtgtcttcttctacagGGAAAACCCTGGGTGCTGGAGCTTT (配列番号 43; 配列番号 18のヌクレオチド 69871-69920) ACTGTCGCTGTAAAGATGCTCAAGCgtaagttctgtatggtactgcatg (配列番号 44; 配列番号 18のヌクレオチド 69976-70025)
13	アクセプター ドナー	ctaaatgcatgtttccaatttagCGAGTGCCCATTTGACAGAACGGGA (配列番号 45; 配列番号 18のヌクレオチド 70059-70108) CTACTTGGAGCCTGCACCATTTGGAGgtaaagccgtgtccaagtccttt (配列番号 46; 配列番号 18のヌクレオチド 70170-70219)
14	アクセプター ドナー	ctaaccttttctatgtgcttttagGCCCCACCCTGGTCATTACAGAATA (配列番号 47; 配列番号 18のヌクレオチド 71383-71432) TTCTGCATTCAAAGGAGTCTTCCTGgtaagactgattacataaatggt (配列番号 48; 配列番号 18のヌクレオチド 71534-71583)
15	アクセプター ドナー	tcatgactgtttcatctctccagCAGCGATAGTACTAATGAGTACATG (配列番号 49; 配列番号 18のヌクレオチド 73376-73425) GACAAAAGGAGATCTGTGAGAATAGgtgagtacctacatcaagcaacc (配列番号 50; 配列番号 18のヌクレオチド 73468-73517)
16	アクセプター ドナー	aagaaaaatcctcttctctcacagGCTCATACATAGAAAGAGATGTGAC (配列番号 51; 配列番号 18のヌクレオチド 73919-73968) CATGGCTTTTCTCGCCTCCAAGAATgtaagtgggagtgattctctaaaga (配列番号 52; 配列番号 18のヌクレオチド 74047-74096)
17	アクセプター ドナー	tttcttttctctccaacctaatagTGTATTACAGAGACTTGGCAGCCA (配列番号 53; 配列番号 18のヌクレオチド 75118-75167) TTCTAATTATGTGGTTAAAGGAAACgtgagtacccattctctgctgaca (配列番号 54; 配列番号 18のヌクレオチド 75241-75290)
18	アクセプター ドナー	tgactctgtgtgcttctattacagGCTCGACTACCTGTGAAGTGGATGG (配列番号 55; 配列番号 18のヌクレオチド 78546-78595) TTTCTTTGGGAGCTGTTCTCTTTAGgtaaaatgaccttgccaaagacaa (配列番号 56; 配列番号 18のヌクレオチド 78658-78707)
19	アクセプター ドナー	cactgctttgcaaaactgtgtctcagGAAGCAGCCCCTATCCTGGAATGCC (配列番号 57; 配列番号 18のヌクレオチド 78769-78818) GCCCTGAACACGCACCTGCTGAAATgtaagagccaaaaattttccttt (配列番号 58; 配列番号 18のヌクレオチド 78869-78918)
20	アクセプター ドナー	atagtaaatggccttgtcttcagGTATGACATAATGAAGACTTGCTGG (配列番号 59; 配列番号 18のヌクレオチド 79223-79272) GCAGATTTTCAGAGAGCACCAATCATgtgagtataccctggccagcatag (配列番号 60; 配列番号 18のヌクレオチド 79329-79378)

*これらの配列を標的とするESOは、示されている配列又はその部分配列の逆相補体になる。

**「アクセプター」はスプライスアクセプターを含む標的配列を指し、「ドナー」はリストされたエキソンのスプライスドナーを含む標的配列を指す。記載されている配列自体において、イントロン配列は小文字で示し、エキソン配列は大文字で示す。

【0058】

本発明のいくつかの実施態様において、10～50個の連結ヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴマーであって、キセタンパク質をコードするRNA分子の領域を標的とするオリゴマーが提供される。いくつかの実施態様において、このオリゴマーのRNA分子

へのハイブリダイゼーションは、このRNA分子のスプライシングを調節する。本発明のいくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーが標的配列に特異的にハイブリダイズし、それによってKitmRNA転写物のスプライシングを調節するように、KitmRNA分子の標的領域における標的配列に十分に相補的な核酸配列を含むアンチセンスオリゴマーが提供される。これらのアンチセンスオリゴマーは、10～50個の連結されたヌクレオシドを含むか、本質的にそれから成るか、又はそれのみから成ることができる。これらのアンチセンスオリゴマーは、15～35の連結ヌクレオチドを含むことができる。これらのアンチセンスオリゴマーは、15～35の連結されたヌクレオシドから本質的に成るか、又はそれのみから成ることができる。これらのアンチセンスオリゴマーは、10の結合ヌクレオシド、11の結合ヌクレオシド、12の結合ヌクレオシド、13の結合ヌクレオシド、14の結合ヌクレオシド、15の結合ヌクレオシド、16の結合ヌクレオシド、17の結合ヌクレオシド、18の結合ヌクレオシド、19の結合ヌクレオシド、20の結合ヌクレオシド、21の結合ヌクレオシド、22の結合ヌクレオシド、23の結合ヌクレオシド、24の結合ヌクレオシド、25の結合ヌクレオシド、26の結合ヌクレオシド、27の結合ヌクレオシド、28の結合ヌクレオシド、29の結合ヌクレオシド、30の結合ヌクレオシド、31の結合ヌクレオシド、32の結合ヌクレオシド、33の結合ヌクレオシド、34の結合ヌクレオシド、35の結合ヌクレオシド、36の結合ヌクレオシド、37の結合ヌクレオシド、38の結合ヌクレオシド、39の結合ヌクレオシド、40の結合ヌクレオシド、41の結合ヌクレオシド、42の結合ヌクレオシド、43の結合ヌクレオシド、44の結合ヌクレオシド、45の結合ヌクレオシド、46の結合ヌクレオシド、47の結合ヌクレオシド、48の結合ヌクレオシド、49の結合ヌクレオシド、又は50の結合ヌクレオシドを含むか、本質的にそれから成るか、又はそれのみから成ることができる。このmRNA分子は、Kitタンパク質を生成する任意の哺乳動物に由来するKitタンパク質をコードすることができる。このような哺乳動物の例には、ヒト、マウス、イヌ、ネコ及び馬が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施態様において、このmRNAは、配列番号8又は10と、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97%、少なくとも99%、又は100%同一のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様において、このmRNAは、配列番号9又は11と、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97%、少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施態様において、このmRNAは、配列番号9又は11から成るタンパク質をコードする。このRNA分子は、Kit転写物であってもよい。いくつかの実施態様において、このRNA分子は、KitmRNA分子である。いくつかの実施態様において、このRNA分子は、KitプレmRNAである。

【0059】

このアンチセンスオリゴマーが標的とする標的領域は、このRNA分子のスプライシングに機能的に関与する、このRNA分子の任意の領域であってよい。この「スプライシングに機能的に関与する」とは、mRNA分子のスプライシングをもたらすために、標的領域の配列が、細胞スプライシング装置（例えば、スプライセオソーム又はその成分）によって利用されることを意味する。このような領域の例には、イントロン配列を含む領域、エキソン配列を含む領域、イントロン/エキソン接合を含む領域、スプライスドナー部位配列を含む領域、スプライスアクセプター部位配列を含む領域、スプライスエンハンサー部位配列を含む領域、分岐点配列を含む領域、及びポリピリミジントラクトを含む領域が含まれるが、これらに限定されない。このような配列は当業者に知られている。このような配列もここで開示される。従って、いくつかの実施態様において、この標的領域は、エキソン配列、イントロン配列、エキソン/イントロン接合部を含む配列、スプライスドナー部位配列、スプライスアクセプター部位配列、スプライスエンハンサー部位配列、分岐点配列、及びポリピリミジントラクトから成る群から選択される配列の少なくとも一部を含む。本発明の文脈において、「少なくとも一部」は、その長さが、少なくとも5のヌクレオシド、少なくとも6のヌクレオシド、少なくとも7のヌクレオシド、少なくとも8のヌクレオシド、少なくとも9のヌクレオシド、少なくとも10のヌクレオシド、少なくとも11の

10

20

30

40

50

ヌクレオチドを指す。少なくとも12のヌクレオシド、少なくとも13のヌクレオチド、少なくとも14のヌクレオシド、少なくとも15のヌクレオシド、少なくとも16のヌクレオシド、少なくとも17のヌクレオシド、少なくとも18のヌクレオシド、少なくとも19のヌクレオシド、又は少なくとも20のヌクレオシドを指す。いくつかの実施態様において、この「少なくとも一部」は、知られている、スプライスドナー部位配列、スプライスアクセプター部位配列、スプライスエンハンサー部位配列、分岐点配列、又はポリピリミジントラクト配列の、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも97%を含む。このスプライスドナー部位配列、スプライスアクセプター部位配列、スプライスエンハンサー部位配列、分岐点配列又はポリピリミジン配列は、KitブレムRNAから得たものであってもよい。

10

【0060】

いくつかの実施態様において、この標的領域は、本発明のKit配列の少なくとも一部を含み、これは、配列番号8、10、12、14及び16のいずれか、又は配列番号18～22のいずれかであってもよい。いくつかの実施態様において、この「少なくとも一部」は、本開示のKit配列の少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも97%から成る部分を含む。いくつかの実施態様において、この「少なくとも一部」は、本開示のKit配列の一部と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも97%同一のポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様において、この標的領域は、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22から成る群から選択される配列の少なくとも一部に、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%同一のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様において、この標的領域は、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21又は配列番号22から成る群から選択される配列の少なくとも一部を含む。

20

【0061】

いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーは、KitブレムRNAのスプライシングに関与する領域又は配列を標的とする。いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーは、Kitイントロン配列、Kitエキソン配列、Kitスプライスドナー部位配列、Kitスプライスアクセプター部位配列、Kitスプライスエンハンサー部位配列、Kit分岐点配列、又はKitポリピリミジントラクトを標的とする。いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーは、KitブレムRNAのエキソン4を標的とする。いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーは、Kitエキソン4スプライスドナー配列、Kitエキソン4スプライスアクセプター配列、又はKitエキソン4スプライスエンハンサー配列を標的とする。いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーは、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21及び配列番号22又はこれらの部分配列から成る群から選択される配列に、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%同一の配列を含む標的分子を標的とする。いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーは、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21及び配列番号22又はこれらの部分配列から成る群から選択される配列を含む標的分子を標的とする。いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーは、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21及び配列番号22又はこれらの部分配列から成る群から選択される配列と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%

30

40

50

、少なくとも 99 %、又は 100 % 同一の配列を標的とする。

【0062】

いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーは、Kit mRNA に由来する、スプライスドナー部位配列、スプライスアクセプター部位配列、スプライスエンハンサー部位配列、分岐点配列、又はポリピリミジン配列の少なくとも一部に完全に相補的な配列に、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、又は少なくとも 99 % 同一の標的配列を含む。いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーは、Kit mRNA に由来する、スプライスドナー部位配列、スプライスアクセプター部位配列、スプライスエンハンサー部位配列、分岐点配列、又はポリピリミジン配列の少なくとも一部に完全に相補的な標的配列を含む。いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーは、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21 及び配列番号 22 又はこれらの部分配列から成る群から選択される配列の少なくとも一部に完全に相補的な配列と、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 %、又は 100 % 同一の標的配列を含む。この部分（一部）の長さは、いくつかの実施態様において、少なくとも 10 ヌクレオチドである。このアンチセンスオリゴマーは、Kit のプレ mRNA 分子のスプライシングを調節してもよい。

10

【0063】

いくつかの実施態様において、標的領域は、Kit スプライスドナー部位配列、Kit スプライスアクセプター部位配列、Kit スプライスエンハンサー部位配列、Kit 分岐点配列、及び Kit ポリピリミジン配列から選択される配列の少なくとも一部を含む。いくつかの実施態様において、この「少なくとも一部」は、Kit スプライスドナー部位配列、Kit スプライスアクセプター部位配列、Kit スプライスエンハンサー部位配列、Kit 分岐点配列又は Kit ポリピリミジン配列。の少なくとも 10 %、少なくとも 25 %、少なくとも 50 %、少なくとも 75 %、少なくとも 90 % 又は少なくとも 90 % を含む。この Kit スプライスドナー部位配列、Kit スプライスアクセプター部位配列、Kit スプライスエンハンサー部位配列、Kit 分岐点配列、又は Kit ポリピリミジン配列は、Kit プレ mRNA のエキソン 4 に由来するものでもよい。この部分（一部）は、その長さが、少なくとも 10 ヌクレオチドであってもよい。このアンチセンスオリゴマーは、Kit のプレ mRNA 分子のスプライシングを調節してもよい。

20

30

【0064】

いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーに含まれる相補的核酸配列（即ち、「標的に向く配列」）は、Kit mRNA に由来する、スプライスドナー部位配列、スプライスアクセプター部位配列、スプライスエンハンサー部位配列、分岐点配列、又はポリピリミジン配列の少なくとも一部に完全に相補的な配列に、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、又は少なくとも 99 % 同一である。いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーに含まれる相補的核酸配列は、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21 及び配列番号 22 又はこれらの部分配列から成る群から選択される配列の少なくとも一部に完全に相補的な配列と、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 %、又は 100 % 同一の配列を含む。この部分（一部）は、その長さが、少なくとも 10 ヌクレオチドであってもよい。このアンチセンスオリゴマーは、Kit のプレ mRNA 分子のスプライシングを調節してもよい。

40

いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマーは、配列番号 1 及び 2 から成る群から選択される配列と少なくとも 80 % 同一、少なくとも 85 % 同一、少なくとも 90 % 同一、少なくとも 95 % 同一、少なくとも 97 % 同一、又は少なくとも 99 % 同一の配列を含む。いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーは、配列番号 1 及び 2 から成る群から選択される配列を含むか、本質的にそれから成るか、又はそのみか

50

ら成る。

【0065】

本発明のいくつかの実施態様において、本発明のアンチセンスオリゴマーを発現する発現ベクターが提供される。ここで使用される場合、「発現ベクター」は、プロモーターに機能的に連結されたポリヌクレオチド配列を含む核酸分子であり、その結果、ポリメラーゼによるこのポリヌクレオチド配列の転写が本発明のアンチセンスオリゴマーの生成をもたらす、核酸分子である。例示的な発現ベクターには、その中にポリヌクレオチドが挿入又はクローン化される、例えば、プラスミド、バクテリオファージ、酵母又はウイルス（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルスなど）に由来するポリヌクレオチド分子、いくつかの実施態様においてDNA分子、が含まれる。適切な発現ベクターは当業者に知られている。

10

いくつかの実施態様において、本発明は、本発明のアンチセンスオリゴマー又は発現ベクターを含む医薬組成物を提供する。このような組成物は、ここに記載のアンチセンスオリゴマー又は発現ベクターの治療的送達に適している。従って、本発明は、1又はそれ以上の本発明のアンチセンスオリゴマー又は発現ベクターを治療有効量含み、1又はそれ以上の薬学的に許容される担体（添加剤）及び／又は希釈剤が共に処方された、医薬組成物を提供する。本発明のアンチセンスオリゴマー又は発現ベクターを単独で投与してもよいが、いくつかの実施態様において、本発明のアンチセンスオリゴマー又は発現ベクターは、医薬組成物として投与される。

本発明の医薬組成物は、以下に適合したものを含む固体又は液体形態で、投与するために特別に処方されてもよい：(1) 経口投与、例えば、水薬（水溶液又は非水溶液又は懸濁液）、錠剤（例えば、頬側、舌下）、及び全身吸収、ボールス、粉末、顆粒、舌に塗布するためのペーストとして；(2) 非経口投与、例えば、無菌溶液又は懸濁液又は徐放性製剤として、例えば、皮下、筋肉内、静脈内又は硬膜外注射による；(3) 局所塗布、たとえば、クリーム、軟膏、又は皮膚に適用される徐放性パッチ又はスプレーとして；(4) 腔内又は直腸内、たとえば、ペッサリー、クリーム、又はフォームとして；(5) 舌下；(6) 眼；(7) 経皮的；(8) 肺吸、たとえば、ネブライザー又はエアロゾル吸入器による；又は、(9) 鼻から。適切な担体、添加剤及び希釈剤の例は、米国特許公開第2015/0361428号に記載されており、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0066】

上記のように、本発明のアンチセンスオリゴマーは、Kitの発現を低下させることができる。このような低下は、Kitタンパク質をコードするmRNA分子のスプライシングを調節することによって達成される。従って、本発明のいくつかの実施態様において、細胞を本発明のアンチセンスオリゴマーと接触させる段階を含む、細胞内のKit mRNAのスプライシングを調節する方法が提供される。この細胞は、KitのmRNA分子を発現する任意の細胞であってもよい。従って、この細胞は、培養中の細胞、又は個人の体内の細胞であってもよい。代表的な実施態様において、この細胞は肥満細胞である。

30

本発明のいくつかの実施態様において、肥満細胞を本発明のアンチセンスオリゴマーと接触させる段階を含む、肥満細胞にアポトーシスを誘導する方法が提供される。

従って、本発明のいくつかの実施態様において、本発明のアンチセンスオリゴマーを投与する段階を含む、個体のKit関連疾患を治療する方法が提供される。いくつかの実施態様において、このKit関連疾患は、癌又は肥満細胞症である。いくつかの実施態様において、この癌は、胃腸間質腫瘍又は白血病である。

40

肥満細胞症は、個人が多すぎる肥満細胞及び肥満細胞前駆体を有することによって引き起こされるまれな肥満細胞活性化障害である。肥満細胞はアトピー反応に関与しているため、肥満細胞症に苦しむ個人は、じんましん、かゆみ、アナフィラキシーショックを受けやすい。従って、本発明の1つの方法は、治療を必要とする個人に本発明のアンチセンスオリゴマーを投与する段階を含む、肥満細胞症に罹患している個人を治療する方法である。この個人は、かゆみ、じんましん、アナフィラキシーなどの肥満細胞症の症状を示していても、示していなくてもよい。いくつかの実施態様において、アンチセンスオリゴマー

50

は、肥満細胞症の症状を発症するリスクのある個人に投与される。

【0067】

このmRNAは、配列番号8、10、12、14又は16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97%、少なくとも99%、又は100%同一のヌクレオチド配列を含んでもよい。いくつかの実施態様において、このmRNAは、配列番号9、11、13、15又は17に、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。いくつかの実施態様において、このmRNAは、配列番号9、11、13、15又は17から成るタンパク質をコードする。

いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーは、KitプレmRNAのスプライシングに関与する標的領域にハイブリダイズする。いくつかの実施態様において、このアンチセンスオリゴマーは、Kitスプライスドナー部位配列、Kitスプライスアクセプター部位配列、Kitスプライスエンハンサー部位配列、Kit分岐点配列及びKitポリピリミジン配列から成る群から選択される配列の少なくとも一部を含むmRNA中の標的領域にハイブリダイズする。このKitスプライスドナー部位配列、Kitスプライスアクセプター部位配列、Kitスプライスエンハンサー部位配列、Kit分岐点配列、又はKitポリピリミジン配列は、KitプレmRNAのエキソン4に由来するものでもよい。

本発明のいくつかの実施態様において、細胞を本発明のアンチセンスオリゴマーと接触させる段階を含む、細胞におけるKitタンパク質の発現を低減させる方法が提供される。本発明の実施態様において、この細胞は、Kitタンパク質を発現する任意の細胞であってもよい。従って、この細胞は、培養中の細胞（例えば、組織培養）又は個人の体内の細胞であってもよい。いくつかの実施態様において、細胞によって発現されるKitの量は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、又は少なくとも99%低減される。代表的な実施態様において、この細胞は肥満細胞である。

【0068】

本発明のアンチセンスオリゴマーは、Kitタンパク質を発現する任意の個体に投与してもよい。ここで使用される場合、個体（個人）、対象、患者などの用語は、ヒト、マウス、ネコ、イヌ、又は馬などであるが、これらに限定されない、Kitタンパク質を発現する任意の哺乳動物を包含することを意味する。用語「個体（個人）」、「対象」及び「患者」自体は、特定の年齢、性別、人種などを示すものではない。従って、男であろうと女であろうと、如何なる年齢の個人が本発明の対象となることが意図されている。同様に、本発明の方法は、例えば、白人、アフリカ系アメリカ人（黒人）、ネイティブアメリカン、ネイティブハワイアン、ヒスパニック、ラテン系、アジア人、及びヨーロッパ人を含む、あらゆる人種に適用することができる。本発明のいくつかの実施態様において、このような特性は顕著であってもよい。このような場合、顕著な特性（年齢、性別、人種など）は提示される。さらに、「個体（個人）」という用語は、ヒト及びヒト以外の動物の両方を包含する。本発明のアンチセンスオリゴマーが投与されてもよい適切な非ヒト動物には、コンパニオンアニマル（即ち、ペット）、食用動物、使役動物、又は動物園動物が含まれるが、これらに限定されない。例示的な動物には、猫、犬、馬、フェレット及び他のイタチ科動物、ウシ、ヒツジ、ブタ、及びげっ歯類が含まれるが、これらに限定されない。

【0069】

本発明のアンチセンスオリゴマーは、任意の適切な投与経路によって個体に投与することができる。このような経路の例には、経口及び非経口経路（例えば、静脈内（IV）、皮下、腹腔内（IP）、及び筋肉内）、吸入（例えば、噴霧及び吸入）及び経皮送達（例えば、局所）などが含まれるが、これらに限定されない。本発明のアンチセンスオリゴマーを個体の血流に送達するのに有効な任意の方法もまた、これらの方法において企図される。例えば、アンチセンスオリゴマーの経皮送達を、局所投与に適合した薬学的に許容される担体を使用することによって達成することができる。アンチセンスオリゴマーは、タンパ

ク質又は脂質などの他の分子の非存在下で投与することができ、又はそれらは、タンパク質又は脂質などの他の分子との複合体で投与することができる。例えば、アンチセンスオリゴマーをカプセル化するためにカチオン性脂質を使用することは、米国特許第8,569,256号及び米国特許第6,806,084号に開示されており、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。同様に、ペプチド結合モルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用法は、米国特許公開第2015/0238627号に開示されており、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

本発明のアンチセンスオリゴマーはK i t媒介性応答を低下させることができるので、このようなアンチセンスオリゴマーはアレルギー症状を治療するために使用することができる。従って、本発明のいくつかの実施態様において、治療を必要とする個体に本発明のアンチセンスオリゴマーを投与することによって、その個体のアレルギー症状を治療する方法が提供される。治療対象のアレルギー症状は、K i tを含む経路によって媒介される任意の症状であってもよい。このような症状には、喘息、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、及びアトピー性皮膚炎が含まれるが、これらに限定されない。

【実施例】

【0070】

以下の実施例は、当業者に、クレームされる化合物、組成物、製品、装置、及び／又は方法がどのように作られ評価されるかについて、完全な開示と記載を提供するために示したものであり、これらは純粹に例示することを目的とするものであり、本発明を限定することを意図するものではない。数値（量、温度など）に関して正確さを確保するための努力がなされているが、いくつかのエラーや偏差を考慮する必要がある。特に明記されていない限り、部は重量部であり、温度は単位℃で表すか、又は周囲温度であり、圧力は大気圧又はそれに近い。

【0071】

実施例で使用した材料と方法

肥満細胞培養

HMC-1.2ヒト肥満細胞（MC）系統を、MilliporeSigma (Burlington, Massachusetts, USA)から購入し、製造元の指示に従って培養した。ヒト肥満細胞（MC）系統LAD2をアレルギー疾患研究所（NIAID, NIH, Bethesda, Maryland, USA）のキルシェンバウム博士及びメトカルフェ博士から入手し、文献（Kirshenbaum et al., 2003）に記載されているように培養した。骨髄由来肥満細胞(BMMC)を入手して、文献（Jensen et al., 2006）に記載のように培養した。マウスでの実験は、ノースカロライナ州立大学（Raleigh, North Carolina, USA）の施設内動物管理使用委員会によって承認されたプロトコルの下で実施された。

アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）による肥満細胞（MC）のトランスフェクション

肥満細胞（MC）を、文献（Cruse et al., 2013）記載のようにトランスフェクトした。受容体の発現

文献（Cruse et al., 2013）に記載のように、受容体の発現をフローサイトメトリーで調べた。

アポトーシス及び生存率アッセイ

アポトーシスは、FITC-Annexin V (eBioscience, a division of Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA)を用いて評価した。生存率を評価するために、細胞をLIVE/DEAD Green Dead Cell Stain (Invitrogen, Carlsbad, California, USA)を用いて製造元の指示に従って染色するか、又はヨウ化プロピジウムで染色した。フローサイトメトリーは、CytoFLEXフローサイトメーター(Beckman Coulter, Brea, California, USA)上で行った。

増殖アッセイ

増殖は、CellTrace Far Red (Invitrogen)を使用して、製造元の指示に従って評価した。また細胞を、LIVE/DEAD Green Dead Cell Stainで染色し、さらに、トリパンブルーを使用して生細胞数を評価した。

腹腔内注射及び腹膜洗浄

プロトコルは、ノースカロライナ州立大学の施設内動物管理使用委員会によって承認された。腹腔内洗浄は、ASOの腹腔内注射後に実施された。肥満細胞は、フローサイトメトリーによってKit及びIgE受容体陽性細胞として同定された。

皮内注射と皮膚組織学

プロトコルは、ノースカロライナ州立大学の施設内動物管理使用委員会によって承認された。ASOは、ID注射により皮膚に注射され、皮膚切片が採取された。肥満細胞（MC）はトルイジンブルー染色で同定及びカウントされ、H&Eは組織形態を評価するために使用された。

【0072】

実施例の補足材料及び方法

肥満細胞培養：

HMC-1.2ヒト肥満細胞（MC）系統は、MilliporeSigma (Burlington, Massachusetts, USA)から購入し、イスコーブ改変ダルベッコ培地(IMDM; MilliporeSigma)に10% (vol/vol) ウシ胎児血清（FBS）及びペニシリン（100 U/mL）/ストレプトマイシン（100 µg/mL）を補充した培地で、製造元の指示に従って培養した。ヒト肥満細胞（MC）系統LAD2をアレルギー疾患研究所のキルシェンバウム博士及びメトカルフェ博士から入手し、StemPro-34栄養補助食品、L-グルタミン（2 mM）、ペニシリン（100 U/mL）/ストレプトマイシン（100 µg/mL）（Gibco; Gaithersburg, Maryland, USA）を含むStemPro-34培地に、100 ng/mLの組換えヒト幹細胞因子（SCF）（R&D Systems、Minneapolis, Minnesota, USA）を添加した培地で、文献（Kirshenbaum et al., 2003）記載のように培養した。幹細胞因子（SCF）を添加した培地の半分を週に1回交換した。骨髓由来肥満細胞（BMMC）は、文献（Jensen et al., 2006）記載のように、C57 BL/6Jマウス(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA)の大腿骨から得られた骨髓から展開し、マウス組換えSCF及びIL-3（R&D Systems）20 ng/mLが補充された。マウスでの実験は、ノースカロライナ州立大学の施設内動物管理使用委員会によって承認されたプロトコルの下で実施された。

肥満細胞（MC）のアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）によるトランスフェクション

肥満細胞（MC）をASOでトランスフェクションする場合、各トランスフェクションについて、 2×10^6 のヒト肥満細胞（MC）又は 3×10^6 のマウス骨髓由来肥満細胞(BMMC)を使用した。トランスフェクションは、NucleofectorII及びCellLine Kit V（Lonza）を使用して、文献（Cruse et al., 2013）に記載のように行った。トランスフェクションの効率は、10 µM FITC結合標準対照25-merASO（Gene Tools LLC）を使用して測定した。プログラムT-030をLAD2細胞及びHMC-1.2細胞に使用し、プログラムX-001をマウス骨髓由来肥満細胞(BMMC)に使用した。実験中に細胞生存率をモニターしたが、ASOトランスフェクションによる細胞毒性の証拠はなかった。実験に使用した標準対照ASOとKit Stop ESO(エキソンスキッピングオリゴヌクレオチド)とは非結合であった。

【0073】

アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）の設計

KitStop ESOを、ヒトc-KITのエキソン4（GENBANK(R)バイオ配列データベースのアクセッション番号NM_000222.2）を標的にするように設計した。スプライスドナー部位を含む領域は、ヒトc-KITの配列5'-GAATGAAGCGATTCACTCACCTGAC-3'（配列番号1）を用いて、標的化された。マウスc-kitの場合、マウスc-Kitのスプライスドナー部位（GENBANK(R)バイオ配列データベースのアクセッション番号NM_001122733.1）を含む領域を、配列5'-AGGACTTAAACAGCACTCACCTGAG-3'（配列番号2）を用いて標的にした。すべてのオリゴヌクレオチドはGeneToolsLLCから購入した。非結合標準対照ASOは、Gene Tools LLCから提供され、哺乳類ゲノムの既知の配列と一致せず、配列5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'（配列番号3）を有する。標準対照ASOは、KitStop ESO(エキソンスキッピングオリゴヌクレオチド)と同じ化学的性質を有するが、既知の遺伝子のエキソンスキッピングを誘発しない。インビボ研究のために、末端3'-Nを介してオ

10

20

30

40

50

クタグアニジニウムデンドリマー (Vivo Morpholino) に連結されたモルホリノ ESO (エキソンスキッピングオリゴヌクレオチド) を、Gene Tools, LLC (Philomath, Oregon, USA) から購入した。

【0074】

RT-PCR

LAD2細胞、HMC-1.2細胞及びマウス骨髄由来肥満細胞(BMMC)を上記のようにトランスフェクトした。LAD2細胞及びHMC-1.2細胞の場合、RNAeasy plus mini-kit (Qiagen, Germantown, Maryland, USA)を使用して、QIAshredderステップを含め、製造元の指示に従って、全RNAを48時間後に回収した。マウス骨髄由来肥満細胞(BMMC)の場合、同じプロトコルに従って24時間後に全RNAを回収した。RT-PCRは、Thermo Fisher Scientific Verso 1-Step RT-PCR kiを使用して、製造元の指示に従って行った。使用したプライマーは、エキソン4及びその周囲のエキソンを増幅し、KitStop ESOの標的となるc-Kit mRNAの複数のエキソンに常にまたがるように設計されている。ヒトc-KIT mRNAの場合、以下のプライマーを使用した：順方向：5'-GAAGCCTCTTCCCAAGGACT-3' (配列番号4)、逆方向：5'-GTGTTTCAGGTTTGGGGAATG-3' (配列番号5)。マウスc-Kit mRNAの場合、以下のプライマーを使用した：順方向：5'-TCATCGAGTGTGATGGGAAA-3' (配列番号6)、逆方向：5'-TCACAGGGGAGATGTTGATG-3' (配列番号7)。

【0075】

受容体の発現

LAD2細胞及びHMC-1.2細胞を、標準対照ASO又はKitStop ESOを用いて上記のようにトランスフェクトし、完全培地でそれぞれ2～7日及び24～72時間インキュベートした。トランスフェクトされた骨髄由来肥満細胞(BMMC)を完全培地で48時間インキュベートした。ヒト細胞の場合、表面Kit発現と総Kit発現を調べるために、各時点で、フローサイトメトリーを、APC結合抗ヒトCD117モノクローナル抗体 (クローン104D2) 及びAPC結合マウスIgG1、 κ 、アイソタイプ対照抗体(Biolegend, San Diego, California, USA)を使用して行った。マウス細胞の場合、フローサイトメトリーを使用して、以下の抗体を使用して表面Fc ϵ RI α 及びKitの発現を評価した：PE結合抗マウスFc ϵ RI α (クローンMAR-1) モノクローナル抗体及びPE結合IgGアイソタイプ対照(eBioscience via Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA)；並びにFITC結合抗マウスCD117 (クローン2B8) モノクローナル抗体及びFITC結合IgG2b、 κ 、アイソタイプ対照抗体(BD Biosciences, San Jose, California, USA)。

【0076】

アポトーシス及び生存率アッセイ

HMC-1.2細胞 (2×10^6) に、上記のように標準対照ASO又はKitStop ESOをトランスフェクトし、完全IMDMで24～72時間インキュベートした。各時点で、細胞をペレット化し、FITC-Annexin V (eBioscience) を用いてアポトーシスを調べた。生存率を調べるために、製造元の指示に従って、細胞をLIVE/DEAD Green Dead Cell Stain (Invitrogen) 又はヨウ化プロプリジウムで染色した。CytoFLEXフローサイトメーター (Beckman Coulter) を用いてフローサイトメトリーを行った。

【0077】

増殖アッセイ

トランスフェクションを行う前に、HMC-1.2細胞をPBSで1回洗浄した。細胞を1 μ M CellTrace Far Red (Invitrogen) を用いて、細胞を 1×10^6 細胞/mLの濃度で製造元の指示に従って染色した。簡単に説明すると、細胞を37℃で20分間染色した後、5分かけて5倍量の培地を添加した。細胞をペレット化し、完全培地に再懸濁し、37℃で10分間インキュベートし、CellTrace試薬を酢酸加水分解させた。染色された細胞を、上記のように標準的な対照ASO又はKitStop ESOでトランスフェクトした。HMC-1.2細胞を37℃で24～72時間培養した。各指定時点で、細胞をLIVE/DEAD Green Dead Cell Stainで染色し、これを用いて死細胞を特定し、除去した。増殖中の細胞は、単一細胞集団用の追加のゲートセットを用いて識別した。フローサイトメトリーは、CytoFLEXフローサイトメー

10

20

30

40

50

ターで行った。さらに、トリパンプルーを使用して、さまざまな時点での生細胞数を評価した。

【0078】

腹腔内注射及び腹膜洗浄

4～8週齢の雌BALB/cマウスをジャクソン研究所から購入し、少なくとも1週間順応させ、その後腹腔内注射をおこなった。これはノースカロライナ州立大学の施設内動物管理使用委員会によって承認されている。注射中の外傷及び血液汚染を防ぐために、ガス麻酔鎮静下で、0日目及び3日目に29ゲージ針を用いた腹腔内注射により、治療群に、50 μ l の0.5 mM KitStop VivoモルホリノESO又は対照VivoモルホリノASOを投与した。5日目にAVMA承認ガイドラインに従って安楽死術を行い、腹膜洗浄を介して腹膜液を収集した。5%w/vBSAを含む5mLの氷冷PBSを、腹部の筋肉を通して注入した。腹部を30秒間穏やかにマッサージし、洗浄液と混合された3～4 mLの腹水を、注射器に吸引して回収し、氷上で円錐形のチューブに移して輸送した。腹膜からの 1×10^6 細胞のフローサイトメトリーにより、表面Kit及びIgE受容体発現による総肥満細胞数を調べた。RT-PCRのために、 5×10^6 個の細胞をペレット化し、液体窒素で瞬間冷凍した。全RNAを回収し、RT-PCRを上記のように実施した。

10

【0079】

皮内注射と皮膚組織学

4～8週齢の雌BALB/cマウスをジャクソン研究所から購入し、少なくとも1週間順応させ、その後皮膚注射をおこなった。これはノースカロライナ州立大学の施設内動物管理使用委員会によって承認されている。0、7、14日目に、正確な注射を可能にするためにガス麻酔鎮静下で、マウスの正中線の1.5cm外側の背側を覆う皮膚の別々の部位に、29ゲージ針を繰り返し注射することにより、KitStop Vivo morpholinoESOと対照VivomorpholinoASOの両方を2.5nmol投与した。16日目にAVMA承認ガイドラインに従って安楽死術を行い、1cmx1cmの皮膚切片を切除し、10%中性緩衝ホルマリンで少なくとも48時間固定し、5ミクロン間隔で切片化し、トルイジンブルー又はヘマトキシリン及びエオシンで染色した。皮膚切片の顕微鏡検査は、2人のACVPボード認定病理医によって行われ、1人の病理医は治療群を知らされていなかった。トルイジンブルー染色された皮膚切片について、切片表面内の核を含む無傷の肥満細胞の集計を行った。以前に収集された1cmx1cmの切除されたホルマリン固定パラフィン包埋皮膚組織を通る断面の反対側の半分を表す2つの5ミクロン厚の組織切片の全長に沿って、集計した。

20

30

【0080】

ヒト化異種移植肥満細胞腫瘍モデル

ジャクソン研究所(Bar Harbor, ME, USA)から得た6～8週齢のNSGマウス(NOD-scidIL2R γ ^{null})の右脇腹に、 1×10^6 個のHMC-1.2腫瘍性肥満細胞(MC)を皮下注射した。腫瘍サイズはミットヨIP65キャリパーで測定した。腫瘍のサイズが50mm³に達したら、マウスに、全身投与のために静脈注射(iv)で又は腫瘍部位の皮下に、3日ごとに最長14日目まで注入した。静脈注射(iv)については、8.33 mg/kg KitStop ESOを注入し、皮下注射(sc)については、3.33 mg/kg KitStop を注入した。腫瘍サイズを毎日測定し、腫瘍が一次元で1.5cmに達したとき又は14日目にマウスを安楽死させた。

40

【0081】

[実施例1]

エキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)で処理された肥満細胞(MC)における野生型及び変異型c-Kitエキソン4のスキップ

ヨウ化プロピジウム及びLive/Dead染色(Cruse et al., 2016)の結果から、ヒト及びマウスの肥満細胞(MC)において、95%より高いエキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)のトランスフェクション効率が達成され、細胞毒性の証拠はなかった。ヒトc-KITプレmRNAの配列を分析すると、ESOによって誘導されるエキソン4のスキッピングにより、成熟したmRNAのオープンリーディングフレームにフレームシフトが導入されることが予測された。このmRNAから予測されるタンパク質の翻訳には、未成熟終止コドンが

50

含まれている。従って、ESOによるフレームシフトは、c-Kit mRNA翻訳の早期終了を誘発し、タンパク質を大幅に短縮するか、ナンセンス変異依存mRNA崩壊（以下「NMD」という。）を誘発する（図1A）。どちらの結果もKit受容体の発現を排除するはずである。安定した25merのモルホリノESOは、KitStopと呼ばれるc-Kitpre-mRNAのエキソン4のドナースプライス部位を標的とするように設計されている。スプライス部位はmRNA転写産物の初期に位置するので、短縮されたタンパク質の生成が発生すると、このタンパク質は大幅に短縮される（図1A）。G560V及びD816V変異を示すHMC-1.2細胞を、野生型Kitを発現するLAD2細胞と同様に、試験した。RT-PCRで示されるように、同等の25merの標準対照ASOでトランスフェクトされた細胞と比較して、KitStopは、変異c-Kit（図1B）と野生型（図1C）の両方のmRNAのエキソンスキッピングを誘導した。

10

【0082】

[実施例2]

c-KitエキソンスキッピングによるKit発現の喪失

野生型又は変異型c-KitmRNAへのフレームシフトの導入がKitタンパク質の発現を妨げるかどうかを調べるために、フローサイトメトリーを使用してLAD2細胞とHMC-1.2細胞におけるKit発現を測定した（ゲーティング戦略については、図2E及び2Fを参照されたい。）。肥満細胞（MC）は細胞表面に野生型Kitを発現するが、Kitは、そのリガンドである幹細胞因子（SCF）による活性化に続いて急速に内在化される。エンドサイトーシス後、Kitは、分解前に細胞内コンパートメント内でシグナルを送る(Wiley&Burke, 2001)。そのため、表面（図2A及び2C）とKit全体（図2B及び2D）の発現の両方がLAD2細胞で測定された。KitStopは、表面Kitの発現を、48時間後に $94.5 \pm 1.4\%$ 、7日後に $99.0 \pm 0.6\%$ 減少させた（図2C）。同じ細胞で、Kitの総発現は、48時間後に $93.5 \pm 0.9\%$ 減少し、7日後に $95.6 \pm 1.8\%$ 減少した（図2D）。これらのデータは、KitStopで処理されたヒト肥満細胞（MC）において、表面及び野生型Kitの発現全体がほぼ完全に失われていることを示している。

20

HMC-1.2細胞株などの腫瘍性肥満細胞（MC）では、発癌性Kitのシグナル伝達は、SCFとは無関係に細胞内コンパートメント内で発生する(Obata et al., 2014)。その結果、Kitの総発現量がHMC-1.2細胞で測定された（ゲーティング戦略については、図3D-3Fを参照されたい。）。HMC-1.2細胞はLAD2細胞よりも顕著に多く増殖するため、KIT発現はより短い時点で評価され（図3A）、KitStopが総変異体KIT発現を有意に減少させることが分かった（図3B及び3C）。KITの発現は、HMC-1.2細胞では72時間にわたって部分的に回復したが（図3B及び3C）、LAD2細胞では回復しなかった（図2D）。しかし、KitStopで処理したHMC-1.2細胞の生細胞の総数は、標準の対照ASOで処理した細胞と比較して、24時間時点では少なく、72時間にわたって減少した。トランスフェクション効率は約95%であるため、エキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)で効率的にトランスフェクトされなかった細胞のごく一部が72時間後に残り、効率的にトランスフェクトされた細胞はKitの発現を失い、その結果、実験の間、減少した、と考えられる。

30

【0083】

[実施例3]

KitStopによりHMC-1.2細胞の構成的KITシグナル伝達は減少する

40

KIT D816V変異は、構成的なKITシグナル伝達をもたらす。HMC-1.2細胞の生存と増殖に対するKitStopの効果が、KIT依存性シグナル伝達によるものであるというさらなる証拠として、KITと下流のキナーゼERKのリン酸化を調べた。ERKが選択されたのは、それがRas-Raf-MEK-ERK経路における下流キナーゼであり、これは両方のKITシグナル伝達の下流であり、細胞増殖において十分に確立された役割を有するためである。HMC-1.2細胞においてKITとERKの両方とも構成的にリン酸化された（図4A）。KitStop ESOのトランスフェクションは、KIT（図4B）とERK（図4C）の両方のリン酸化を同等に減少させた。KitStopは、KITのリン酸化を阻害するというよりは、むしろ機能的なKITタンパク質の発現を効果的に減少させるので、KITのリン酸化のこの減少は、構成的に活性なKITタンパク質の発現の減少の直接的な結果であると考えられる。しかし、KitStopは、 β -ア

50

クチンと比較して、ERK発現に影響を与えなかったため（図4A）、ERK経路に対する下流の影響はリン酸化の低下によるものであり、これはおそらくKITタンパク質の低下の直接的な結果と考えられる。

【0084】

[実施例4]

フレームシフトしたc-Kitが腫瘍性肥満細胞（MC）の死を誘導する

非形質転換肥満細胞（MC）ではインビトロで外因性の支持サイトカインの非存在下でアポトーシスが急速に起こる（Mekori et al., 1993; Yanagida et al., 1995; Asai et al., 2001）が、これとは対照的に、D816Vのようなc-Kit変異を活性化することは、構成的Kitの活性化を有効にする。HMC-1.2などの腫瘍性肥満細胞（MC）疾患細胞株では、構成的Kitの活性化により、SCF非依存的な肥満細胞（MC）の継続的な生存と成長が可能になる。従って、KitStop治療が、腫瘍性HMC-1.2細胞における、c-Kit変異のイマチニブ非感受性活性化の生存促進効果を排除できるかどうかを調べた。最初に、HMC-1.2細胞アポトーシスをFITC結合アネキシンVを使用して評価した（図5A、5F及び5G）。標準対照ASOでトランスフェクトされた細胞と比較して、KitStopで処理された細胞は72時間にわたってアネキシンV-FITC染色の増加を示した（図5A及び5B）。KitStopは72時間にわたって非アポトーシス細胞の数を減らし（図5C）、初期（図5D）及び後期（図5E）のアポトーシス細胞はそれに対応して増加した。細胞の生存率を調べるために、HMC-1.2細胞をヨウ化プロピジウム（PI）で染色した（図6A、6F～6H）。標準の対照ASOとは対照的に、KitStopは72時間にわたってPI染色の増加を起こした（図6A～6C）。LIVE/DEAD染色でも同様の染色パターンが見られ（図6D、6I、6J）、測定された各時点で死細胞が増加した（図6E）。以上をまとめると、これらの発見は、エキソンスキッピングオリゴヌクレオチド（ESO）を介したc-Kit転写産物のフレームシフトが、腫瘍性肥満細胞（MC）におけるアポトーシスと細胞死を急速に誘導することを示す。

【0085】

[実施例5]

c-Kitのフレームシフトが腫瘍性肥満細胞（MC）の増殖を妨げる

HMC-1.2細胞により発現されるc-Kit変異の活性化が、SCF非依存性増殖を促進することを考慮して（Longley et al., 1999; Chan et al., 2013）、腫瘍性肥満細胞（MC）増殖に対するc-Kitフレームシフトの影響を調べた。標準対照ASOでトランスフェクトされた細胞とは対照的に、トリパンプルの細胞数カウントで生細胞数が増加することが示されているように（図7A）、KitStopはHMC-1.2の増殖を防止した。総生細胞数カウントに加えて、CellTrace希釈及びLIVE/DEAD染色を使用して増殖アッセイを実施した。細胞数カウントと同様に、生存KitStop処理細胞の集団は、LIVE/DEAD染色で示すように、CellTrace色素を保持しているが、標準対照ASO処理細胞のCellTrace蛍光は、各時点でますます希釈されている（図7B及び7C）。標準対照ASO及びKitStop処理細胞の両方で、生存非増殖細胞の割合は時間とともに減少した（図7D）。しかし、KitStop処理による生存非増殖細胞の減少は、増殖した細胞よりも、むしろ生存不能な細胞の増加によるものであった（図7B及び7E）。以上をまとめると、これらの発見は、ESOによって誘発されるc-Kitのフレームシフトが、変異型Kitを介した腫瘍細胞の成長と生存を著しく抑制することを示している。その結果、c-Kitを標的とするオリゴヌクレオチドのフレームシフトは、インビボでの肥満細胞（MC）負荷を低減させるための効率的なアプローチを示す。

【0086】

[実施例6]

インビボでKitStopESOによる腹膜肥満細胞（MC）の枯渇

インビトロでの腫瘍性ヒト肥満細胞（MC）におけるc-Kitフレームシフトオリゴヌクレオチドの結果を考慮して、治療的有用性の原理を証明するために、インビボでこのアプローチの有効性を評価した。マウス骨髄由来肥満細胞（BMMC）を使用して、マウスc-Kitを標的とするKitStopESOを試験した。RT-PCR（図8A）及びKitタンパク質発現の著しい減少（図8B及び8C）によって示されているように、KitStopはマウスc-KitmRNAの

10

20

30

40

50

エキソンスキッピングを誘導した。2回の腹腔内注射とそれに続く腹膜洗浄により、インビボでのKitStopの有効性を試験した(図8D)。c-Kit mRNAのエキソンスキッピングは、腹膜洗浄細胞で常に明らかであるとは限らないが、c-Kit mRNAのレベルは大多数のマウスで著しく減少し(図8E)、腹膜のKit⁺細胞の減少を示唆している。これに従い、KitStop処理マウスで、腹膜洗浄細胞のフローサイトメトリーは、腹膜肥満細胞(MC)が約50%有意に減少したことを示した(図8F~8H)。以上をまとめると、これらのデータは、KitStopが、インビボでも機能し、他の組織の肥満細胞(MC)を枯渇させるための実行可能なアプローチである可能性があることを示唆している。

【0087】

[実施例7]

インビボで局所ESO投与は皮膚肥満細胞(MC)数を減少させる

組織内の肥満細胞(MC)の枯渇についてのKitStopの治療可能性のさらなる証拠として、背部の皮膚への皮内(ID)注射により、KitStopの有効性を調べた。皮膚へのESOの投与は、IgEシグナルに応答して肥満細胞(MC)機能を効果的にダウンレギュレートし、インビボで肥満細胞(MC)に対するESO活性を評価するモデルを提供することが示されているため(Cruse et al., 2016)、KitStopの皮膚における有効性を評価した。肥満細胞(MC)は長寿命で、皮膚に豊富に含まれている。そのため、投与プロトコルを腹膜の研究から拡張した。2週間の間に3回、マウスの背部皮膚に、KitStop又は標準対照ASOを注射した後、皮膚組織を評価した(図9A)。皮膚切片をトルイジンブルー(図9B)又はH&E(図9C)のいずれかで染色して、肥満細胞(MC)を特定し、組織を調べた。2人のACVPボード認定病理医が肥満細胞(MC)数と組織を評価し、1人は盲検化され、もう1人は非盲検化されたが、両方の病理学者とも、同等の数と結論を導き出した。検査された組織切片には明白な病変がなかった。さらに、KitStopで治療した皮膚の領域は、同じマウスから採取した標準的な対照のASOで治療した皮膚の領域と比較した場合、皮膚肥満細胞(MC)(図9D)及び総皮膚肥満細胞(MC)(図9E)がほぼ50%少なくなった。これらのデータは、KitStopが、インビボで成熟した組織に存在する肥満細胞(MC)を枯渇させるというさらなる証拠を提供する。

【0088】

[実施例8]

インビボでKitStop ESOの全身投与は腫瘍性肥満細胞(MC)の増殖を阻害する

KitStopESOがインビトロとインビボの両方で効果的に機能することを確認したので、肥満細胞腫瘍の治療に関連するヒト化インビボモデルで、KitStopを試験した。攻撃的な腫瘍を形成するHMC-1.2細胞を、NSGマウスに接種した。腫瘍体積が約50mm³に達した(0日目)後、3日ごとに1日1回、KitStopを静脈内(IV)注射又は皮下(SC)注射して、ビヒクル対照と比較した(図10A)。この保守的な投与プロトコルを使用して、経時的な腫瘍体積を評価・測定して、KitStopの全身IV投与が腫瘍増殖を有意に減少させることを立証した(図10B)。処理の14日目に、マウスを安楽死させ、腫瘍を切除してその重量を測定した(図10C及び10D)。KitStop 静脈内(IV)注射グループの腫瘍は、ビヒクル対照グループとKitStop皮下(SC)注射グループの両腫瘍よりも有意に小さかった。脾臓はKitStopIVグループでサイズが減少する傾向を示したが(図10E)、実験の過程にわたって、肝臓重量(図10F)とマウス重量(図10G)に違いはなかった。以上をまとめると、これらのデータは、攻撃的なヒト化肥満細胞腫瘍モデルにおいて、KitStopの全身(IV)投与が腫瘍増殖を有意に阻害したという結論を裏付けた。さらに、KitStop治療は、許容度が高く、マウスの体重はほとんど影響を受けなかった。

【0089】

実施例についての議論

異常な肥満細胞(MC)増殖における構成的Kitシグナル伝達の役割は、その受容体を、結果として生じるクローン性疾患のための標的にする。この疾患は、患者の年齢、臓器の関与、併存疾患、及び疾患の攻撃性の違いにより、不均一であって治療が難しいことで悪名高い(Valent et al., 2017)。しかし、発癌性Kitのシグナル伝達の根底にある

10

20

30

40

50

c-Kit変異の多様性は、受容体の標的化を比例的により困難にする。これらの変異の中で、全身性肥満細胞症患者の大多数に存在するD816Vは特に問題が大きい。D816V変異は、K i tのチロシンキナーゼドメインのコンフォメーション変化を誘発することにより、チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)であるメシル酸イマチニブ(Gleevec)に対する耐性を付与する(Antonescu et al., 2005; Theoharides et al., 2015)。D816V⁺全身性肥満細胞症の新たな治療法は、高い反応率を示すマルチキナーゼ阻害剤であるミドスタウリンである。しかし、ミドスタウリンによる治療後でも、疾患の進行と白血病への変化のリスクがある(Gotlib et al., 2016; Valent et al., 2017)。消化管間質腫瘍(GIST)などの他の腫瘍性疾患はイマチニブで治療できるが、肥満細胞症と同様に、時間とともに追加のc-Kit変異を獲得して、イマチニブの感受性は失われる可能性がある(Heinrich et al., 2006; Tamborini et al., 2006)。GISTなどの他の腫瘍性疾患は、c-Kitの体細胞機能獲得型変異が一般的であり、転移のリスクも予測される(Heinrich et al., 2006; Ito et al., 2014)、複数のチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)の組み合わせは、腫瘍性肥満細胞(MC)の成長に対して相乗的な抑制効果をもたらす可能性があり、治療上の利益をもたらす可能性がある。しかし、チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)に対する後天的な耐性は依然としてリスクである(Gleixner et al., 2007; Gallogly et al., 2017)。その結果、異常な肥満細胞(MC)増殖とc-Kit変異の活性化を伴った生存との強い関連性を考慮すると、これらの疾患に対する望ましいアプローチは、受容体の多くの可能な変異とコンフォメーションにもかかわらず、高い有効性を持つc-Kitを特異的に標的とすることであろう。

【0090】

c-Kitを選択的に標的とする場合、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)技術は有望なアプローチである。また、オリゴヌクレオチドの安定性、バイオアベイラビリティ、有効性、及び送達を改善する新世代の化学修飾の進歩(Juliano, 2016; Godfrey et al., 2017; McClorey & Banerjee, 2018)は、このASO技術のエキサイティングな進歩である。ASOは用途が広く、その設計に応じて、さまざまな遺伝子操作の応用を行うことができる。たとえば、ASOのいくつかの応用例は、タンパク質の翻訳をブロックしたり、エキソンの包含を促進したり、成熟したmRNAのエキソンスキッピングを誘発したりすることである。本実施例において、エキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)を使用して後者を達成し、c-Kit mRNAに未成熟終止コドンを導入した。そうすることで、野生型と変異型の両方のK i tの発現が禁止され、インビトロでのK i t依存性の腫瘍性肥満細胞(MC)の増殖及び生存も大幅に抑制された。腫瘍性HMC-1.2細胞において、KitStopは、細胞内K i t発現をダウンレギュレートしたが、D816V変異によりK i tの表面発現の必要性がなくなるため、これは特に重要である。一方、発癌性K i tのシグナル伝達は、リガンド結合とは無関係に細胞内で起こり(Obata et al., 2014)、従って、表面で変異型Kit発現が無いことは、抗体ベースの治療アプローチを無効にしてしまう。インビトロでの発見に加えて、インビボでのKit Stopの投与はマウスの組織における腹膜肥満細胞(MC)及び皮膚肥満細胞(MC)の数を減少させることが示された。従って、KitStopは肥満細胞(MC)の負担を軽減できる。KitStopは、4日後に腹腔内の肥満細胞(MC)数を約50%減少させ、3回の処理後に成熟した皮膚肥満細胞において同様の減少が見られた。この疾患では皮膚が関係することが一般的であり、皮膚肥満細胞(MC)の寿命が長く、エクスピボで皮膚肥満細胞(MC)は成長因子と成長因子受容体(SCFR)が無いことに対して耐性があるため(Hazzan et al., 2017)、皮膚肥満細胞(MC)数に対するKitStopの効果は、肥満細胞症などの疾患におけるKitStopの潜在的な有効性を立証するために特に重要である。

【0091】

従来のsiRNAアプローチを使用してc-Kitを標的にするのではなくて、プレmRNAスプライシングを変更することを選択する代表的理由は、肥満細胞(MC)によって発現されるc-Kit転写産物の量が膨大なことと、肥満細胞(MC)に対するsiRNAアプローチが(特にインビボで)非効率性であることの2つである。KitStopがc-Kit mRNAを標的とすることは、RT-PCRで測定した場合、ヒト及びマウスの肥満細胞(MC)において明らかに非効率

的なエキソンスキッピングを引き起こした。この非効率的なエキソンスキッピングは、細胞内のエキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)と比較して、c-KitmRNA転写産物の化学量論と豊富さが原因である可能性が最も高い。エキソンスキッピングの効率は、エキソンの他のスプライシング調節部位を標的とするさまざまなESOを試験することで改善される。しかし、明らかに非効率的なエキソンスキッピングを使用しても、KitStopは、野生型及び変異型のKitタンパク質の発現を効率的に低下させ、増殖を失い、アポトーシスと細胞死を顕著に誘導した。KitStopは、激しく短縮されたC末端タンパク質の生成をもたらすかもしれない。転写産物にフレームシフトを導入するCRISPR/Casシステムは、転写産物のナンセンス変異依存mRNA崩壊(NMD)をもたらすが、NMDはしばしば非効率であり、検出が困難なC末端短縮型タンパク質が生成される(Reber et al.,2018)。従って、RNase Hに依存する従来のsiRNAアプローチ又はRNA誘導サイレンシング複合体(RISC)を介した転写産物分解経路とは対照的に、ESOを用いた飽和mRNA分解の非効率性は、ノックダウンの効率を失うというよりは、むしろ非機能的又はドミナントネガティブタンパク質の生成をもたらす可能性がある。特定の操作理論に拘束されることは望まないが、変異型c-Kitなどの望ましくない転写物のコピー数が多いことについて、この現象は治療の成功に役割を果たす可能性がある。しかし、ESOは転写産物の可逆的操作であり、ゲノムを変更しないため、大幅に短縮されたタンパク質の生成は一時的なものになる。従って、特定の細胞タイプの内部調節プロセスを克服しなければならないCRISPR/Casシステムに比べて、本発明は、対象の遺伝子に標的を定めた変更を加えるため、特定の治療用途において利点がある(Haapaniemi et al.,2018; Ihry et al.,2018)。

【0092】

まとめると、以上開示したインビトロ及びインビボのデータは、肥満細胞(MC)腫瘍性疾患の治療的治療法としてc-KitのESO誘発性フレームシフトを起こすための概念実証である。野生型マウスを用いたこれらの実験は、KitStopの治療可能性を評価するための概念実証のステップであった。以前に議論されたように(Cruse et al.,2016)、エキソンスキッピングオリゴヌクレオチド(ESO)は可逆的治療を表すものであり、そのためにゲノムの不可逆的变化を回避する。KitStopによって誘発されるナンセンスなフレームシフトは、肥満細胞(MC)腫瘍や消化管間質腫瘍(GIST)の治療のための有望なアプローチを表しており、臨床応用のための翻訳可能性を持つc-Kit特異的治療戦略を表している。さらに、c-Kitは、特定の黒色腫などのc-Kit駆動型の癌や、小細胞肺癌や脳腫瘍などの二次的なc-Kit変異を獲得し、その後c-Kit変異が腫瘍の進行に寄与する癌など(Pittoni et al., 2011のレビューを参照されたい。)、他の種類の癌でも役割を果たす。mRNAスプライスバリエーションとタンパク質アイソフォームを変更するために使用されるESOの治療における可能性は、高コレステロール血症及び心血管疾患(Disterer et al.,2013)、乳がん(Wan et al.,2009)、アレルギー(Cruse et al.,2016)などの疾患において、すでに強調されている。ESOの特定の送達プラットフォームに向けて改善を行うことができるが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)治療に関するESOエテプリルセン(eteplirsen)の最近の承認(Dowling, 2016; Syed, 2016)は、この他のESOが個人化された標的治療として出現する可能性が高いことを示している。

【0093】

参考文献

以上の開示で引用されたすべての参考文献に加えて、以下に挙げられているすべての特許、特許出願及びその出版物、科学雑誌記事、及びデータベースエントリ(例えば、GEN BANK(R)データベースエントリ及びそこで利用可能なすべての注釈)を含む、但し、これらに限定されない、すべての参考文献は、それらが、本明細書で使用される方法論、技術、及び/又は組成物を補足し、説明し、背景を提供し、又は教示する範囲で、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

Antonescu et al. (2005) Clin Cancer Res 11(11): 4182-4190.

Arock et al. (2015) Leukemia 29(6): 1223-1232.

Asai et al. (2001) Immunity 14(6): 791-800.

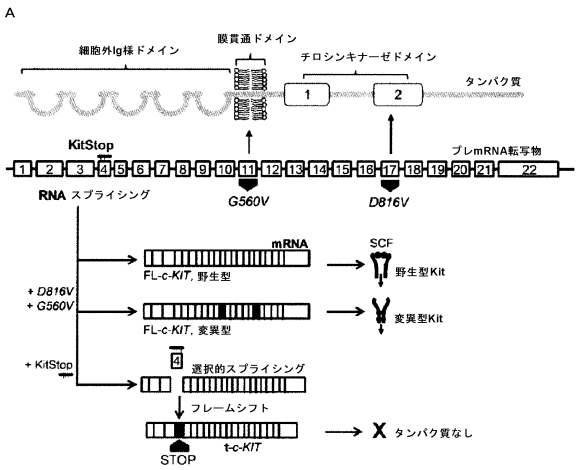
- Berger et al. (2000) *Nuc Acid Res* 28:2911-2914.
- Besmer et al. (1986) *Nature* 320(6061): 415-421.
- Chan et al. (2013) *Clin Exp Dermatol* 38(5): 538-544.
- Cruse et al. (2013) *Immunity* 38(5): 906-917.
- Cruse et al. (2014) *Immunol Allergy Clin North Am* 34(2): 219-237.
- Cruse et al. (2016) *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(49): 14115-14120.
- Disterer et al. (2013) *Mol Ther* 21(3): 602-609.
- Dowling (2016) *Nat Rev Neurol* 12(12): 675-676.
- Galli et al. (1995) *Int Arch Allergy Immunol* 107(1-3): 51-53.
- Gallo et al. (2017) *Ther Adv Hematol* 8(9): 245-261.
- Giebel et al. (1992) *Oncogene* 7(11): 2207-2217.
- Gleixner et al. (2006) *Blood* 107(2): 752-759.
- Gleixner et al. (2007) *Haematologica* 92(11): 1451-1459.
- Godfrey et al. (2017) *EMBO Mol Med* 9(5): 545-557.
- Gotlib et al. (2016) *N Engl J Med* 374(26): 2530-2541.
- Haapaniemi et al. (2018) *Nat Med* 24(7):927-930.
- Hazzan et al. (2017) *Cell Death Discov* 3: 17048.
- Heinrich et al. (2006) *J Clin Oncol* 24(29): 4764-4774.
- Iemura et al. (1994) *Am J Pathol* 144(2): 321-328.
- Ihry et al. (2018) *Nat Med* 24(7):939-946.
- Ito et al. (2014) *Int J Clin Exp Pathol* 7(11): 8024-8031.
- Jensen et al. (2006) *Curr Protoc Immunol* Chapter 3: Unit 3.23.
- Jensen et al. (2008) *Br J Pharmacol* 154(8): 1572-1582.
- Juliano (2016) *Nucleic Acids Res* 44(14): 6518-6548.
- Kirshenbaum et al. (2003) *Leuk Res* 27(8): 677-682.
- Longley et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4): 1609-1614.
- Ma et al. (2002) *Blood* 99(5): 1741-1744.
- McClore & Banerjee (2018) *Biomedicines* 6(2): 10.3390/biomedicines6020051.
- Mekori et al. (1993) *J Immunol* 151(7): 3775-3784.
- Miettinen et al. (2002) *Eur J Cancer* 38 Suppl 5: S39-51.
- Obata et al. (2014) *Nat Commun* 5: 5715.
- Pardanani et al. (2003) *Lancet* 362(9383): 535-536.
- Pittoni et al. (2011) *Oncogene* 30(7): 757-769.
- Reber et al. (2018) *Mol Biol Cell* 29(2): 75-83.
- Syed (2016) *Drugs* 76(17): 1699-1704.
- Tamborini et al. (2006) *Oncogene* 25(45): 6140-6146.
- Taniguchi et al. (1999) *Cancer Res* 59(17): 4297-4300.
- Theoharides et al. (2015) *N Engl J Med* 373(19): 1885-1886.
- Tsai M et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(14): 6382-6386.
- U.S. Patent Nos. 6,806,084; 8,569,256; 8,765,703; 8,946,183.
- U.S. Patent Publication Nos. 2015/0238627; 2015/0376615.
- Valent et al. (2017) *Cancer Res* 77(6): 1261-1270.
- Wan et al. (2009) *Int J Cancer* 124(4): 772-777.
- Wiley & Burke (2001) *Traffic* 2(1): 12-18.
- Wu et al. (2012) *Int J Mol Med* 30(1):63-68.
- Yanagida et al. (1995) *Blood* 86(10): 3705-3714.
- Yang et al. (2015) *Am J Transl Res* 7(9):1499-1509.

本発明の様々な詳細は、ここに開示した発明の範囲から逸脱することなく変更することができることを理解されたい。さらに、以上の説明は、本発明を例示することのみを目的としており、限定することを目的とするものではない。

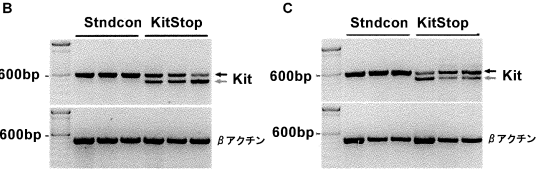
【0094】

【図面】

【図1A】

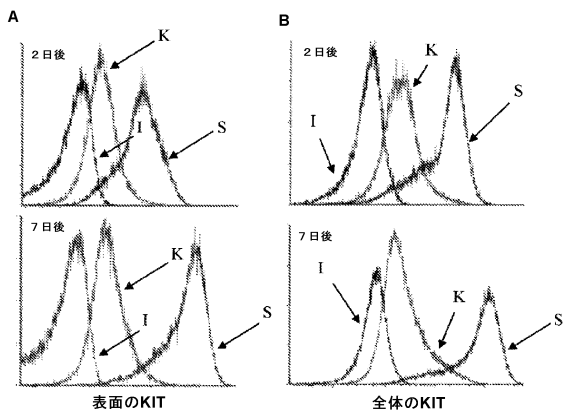


【図1BC】

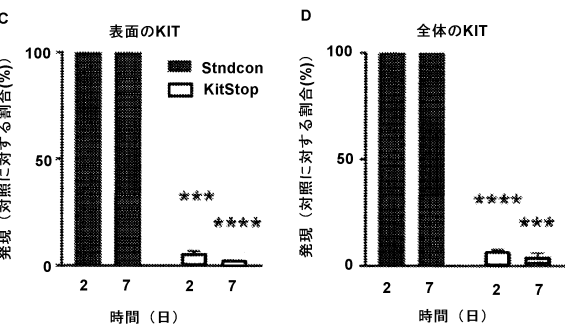


10

【図2AB】



【図2CD】



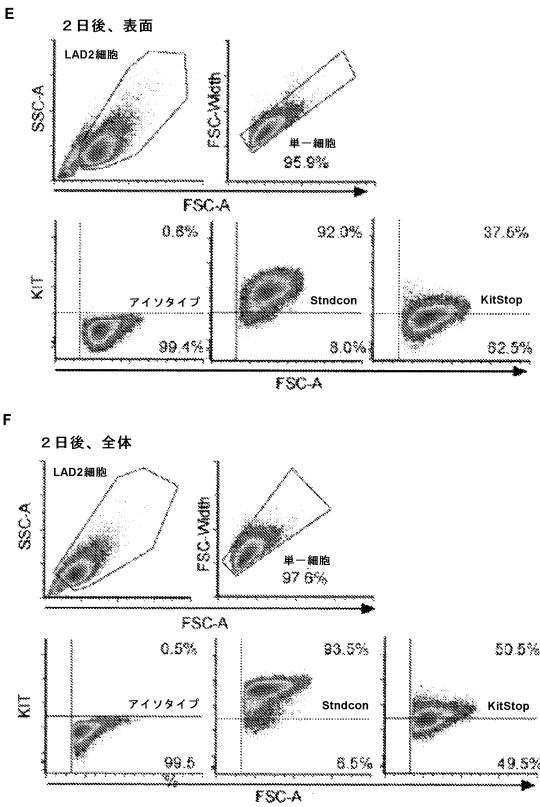
20

30

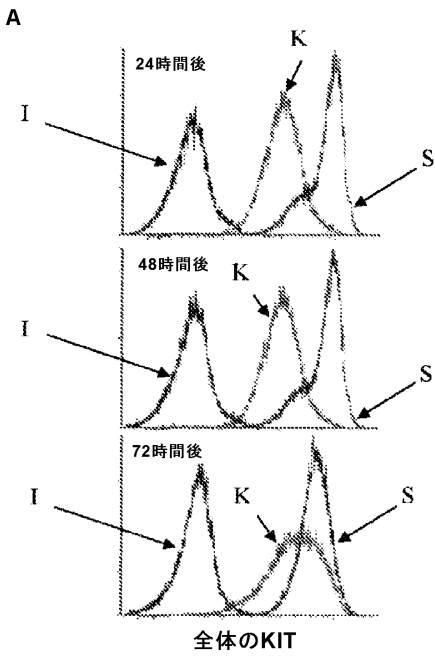
40

50

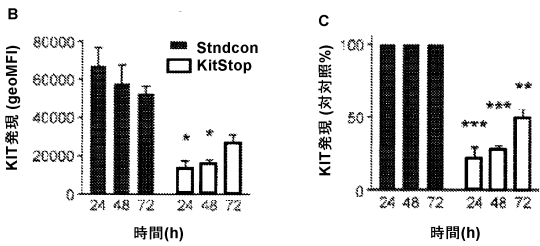
【図 2 E F】



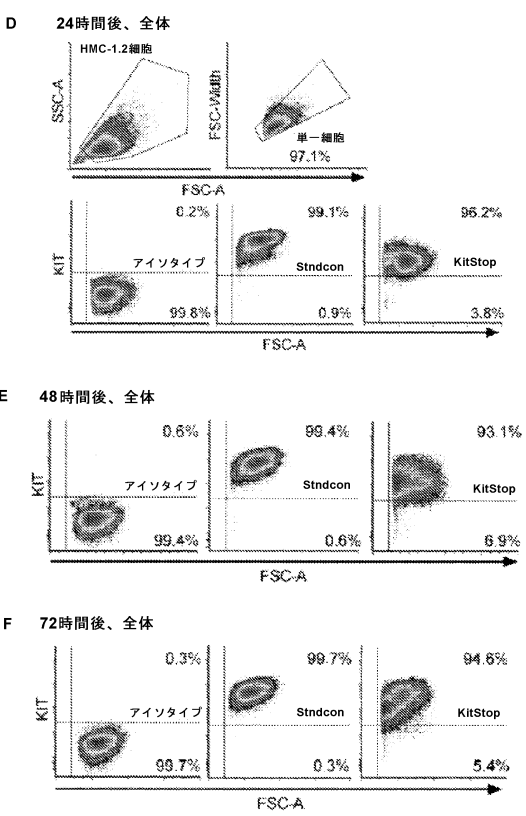
【図 3 A】



【図 3 B C】



【図 3 D - F】



10

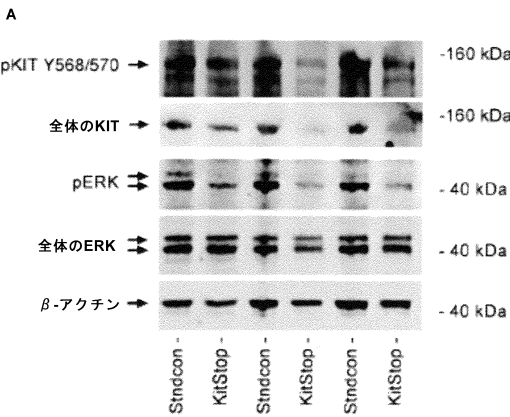
20

30

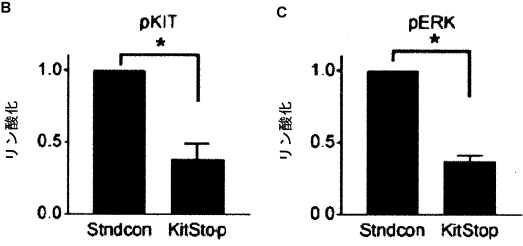
40

50

【図 4 A】

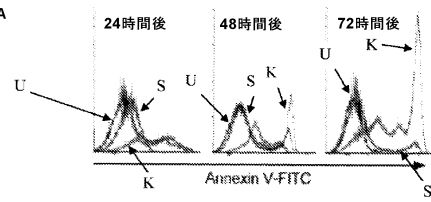


【図 4 B C】

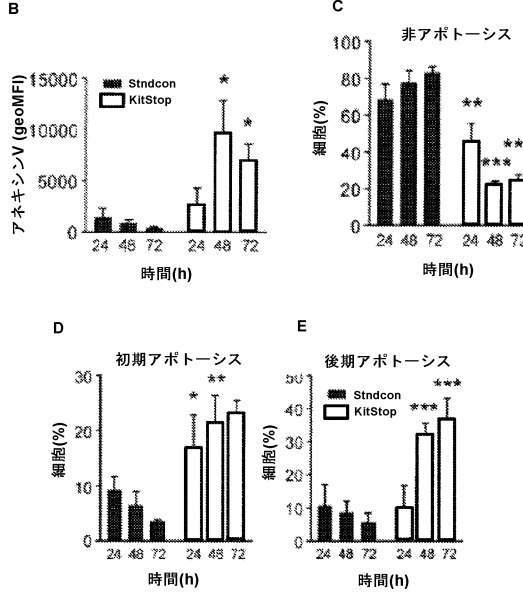


10

【図 5 A】



【図 5 B - E】



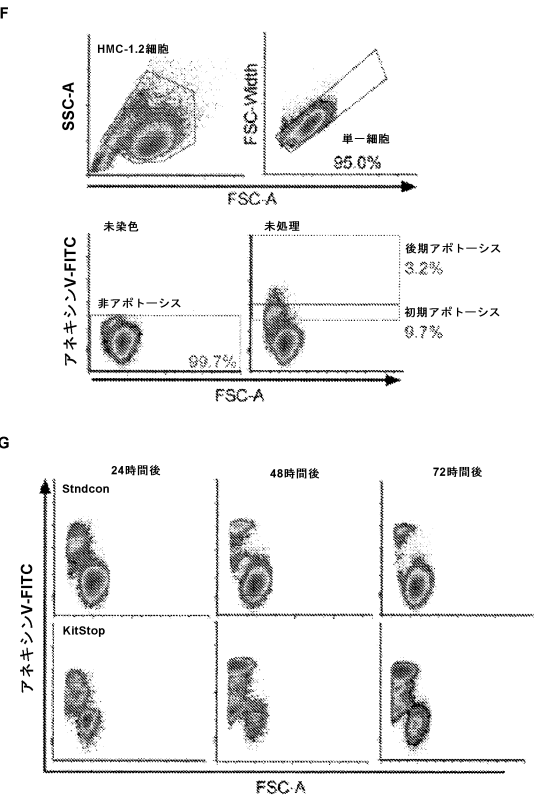
20

30

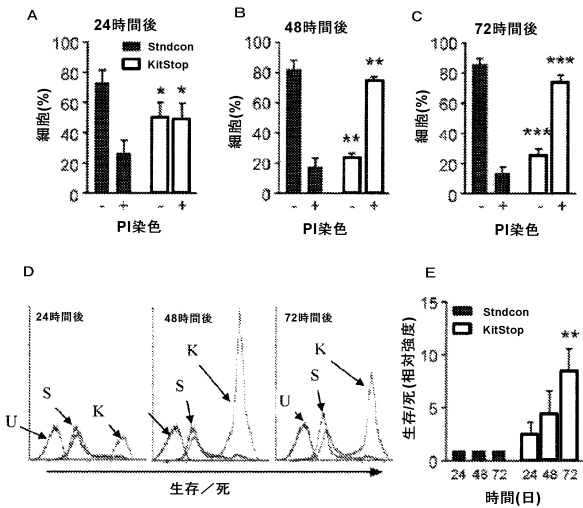
40

50

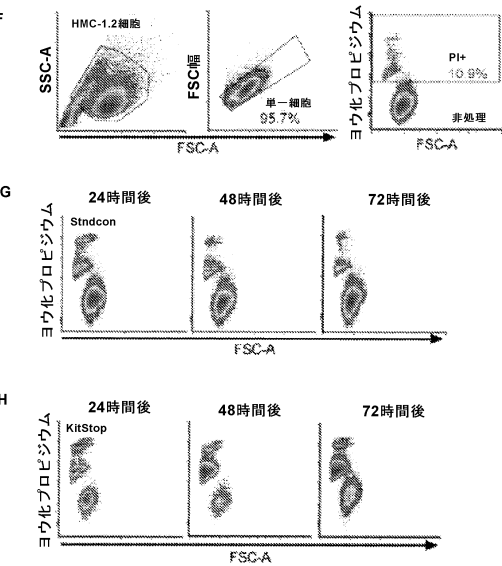
【図 5 F G】



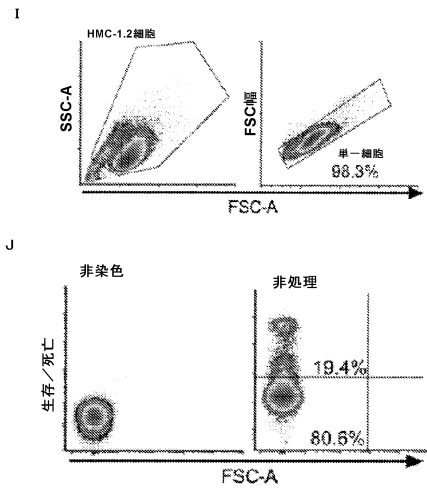
【図 6 A - E】



【図 6 F - H】



【図 6 I J】



10

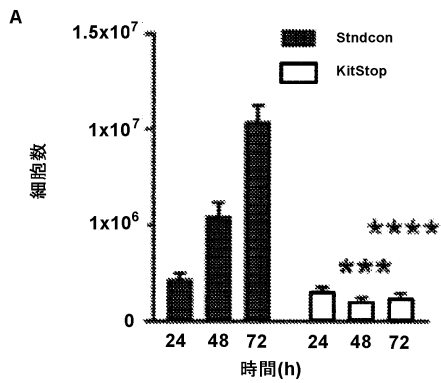
20

30

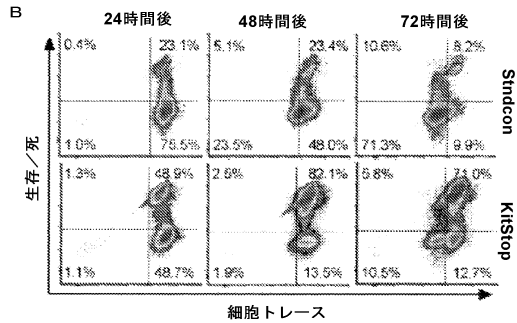
40

50

【図 7 A】

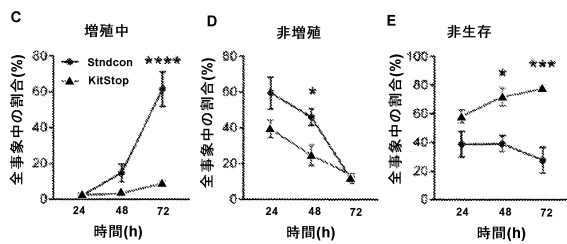


【図 7 B】

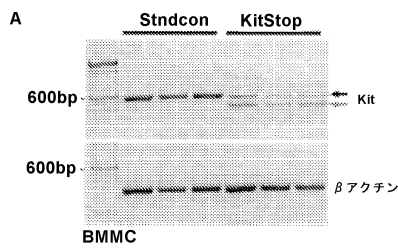


10

【図 7 C - E】

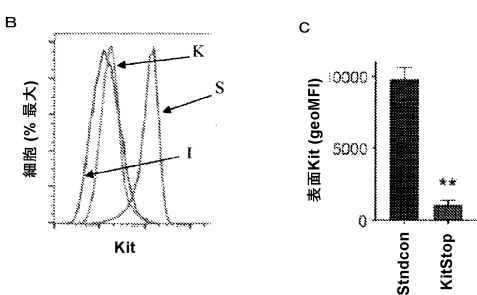


【図 8 A】

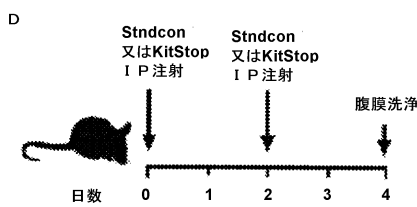


20

【図 8 B - C】



【図 8 D】

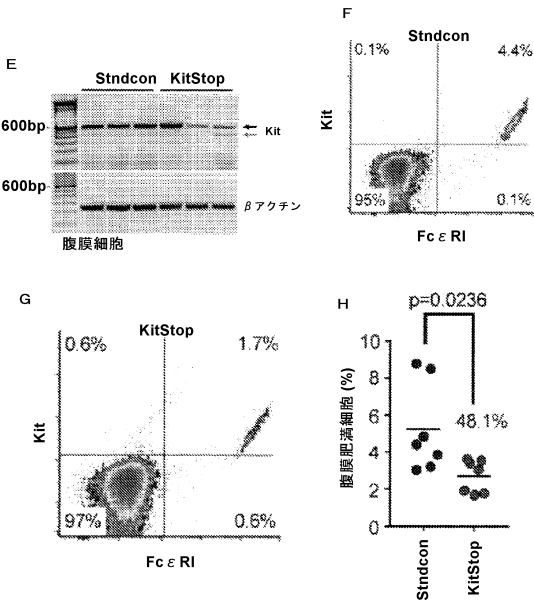


30

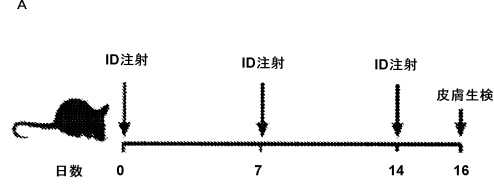
40

50

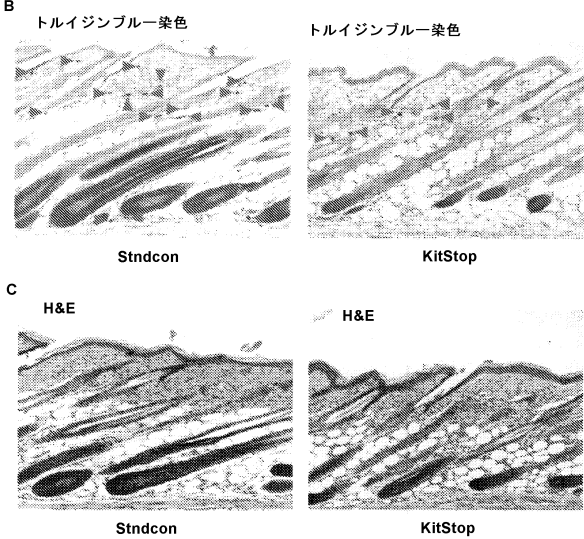
【図 8 E - H】



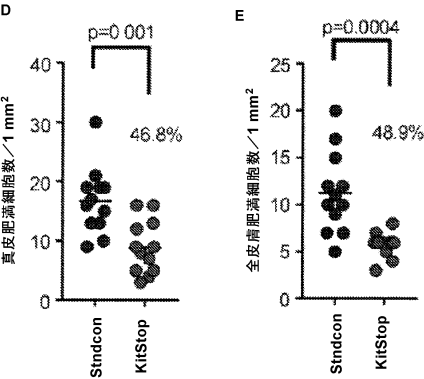
【図 9 A】



【図 9 B - C】



【図 9 D - E】



10

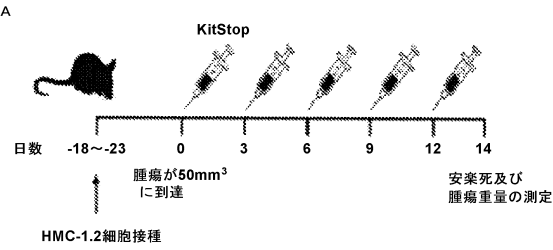
20

30

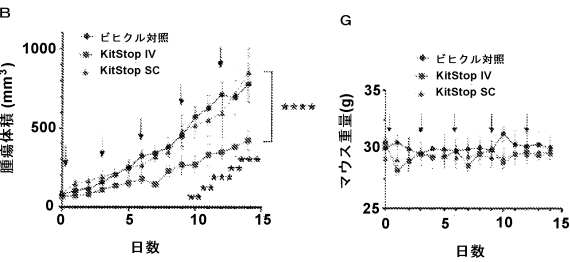
40

50

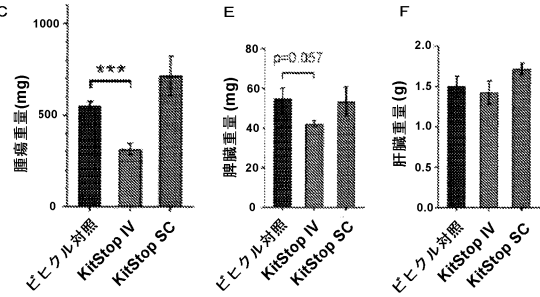
【図 10 A】



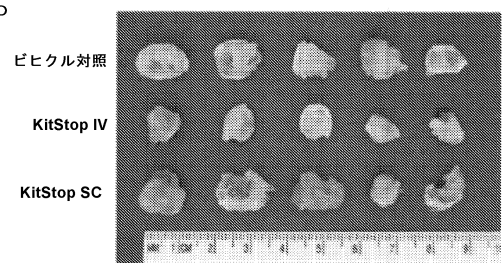
【図 10 B G】



【図 10 C E F】



【図 10 D】



【配列表】

0007677628000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	17/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	17/04	
C 0 7 K	14/715	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
C 1 2 N	9/12	(2006.01)	C 0 7 K	14/715	
			C 1 2 N	9/12	

審査官 松原 寛子

(56)参考文献

特表 2 0 0 2 - 5 0 7 1 8 6 (J P , A)

Cancer research, 2001年, Vol.61, p.2200-2206

Oligonucleotide-based drugs and therapeutics : Preclinical and Clinical Considerations for development, Splice-switching oligonucleotides, 2018年, p.445-489, Doi:10.1002/9781119070153.ch17

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 N 5 / 0 7 8 7

C 1 2 N 1 5 / 6 3

A 6 1 K 3 1 / 7 0 8 8

A 6 1 K 3 5 / 7 6

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 2

A 6 1 P 1 7 / 0 4

A 6 1 P 3 7 / 0 8

C 0 7 K 1 4 / 7 1 5

C 1 2 N 9 / 1 2

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)