

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2022年1月20日(20.01.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/014703 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)  
A61P 21/00 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)  
A61P 25/00 (2006.01)

番 1 0 号 田辺三菱製薬株式会社内 Osaka (JP).  
村田 俊平(MURATA, Shumpei); 〒5418505 大阪府大阪市中央区道修町三丁目 2 番 1 0 号  
田辺三菱製薬株式会社内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/026798

(22) 国際出願日: 2021年7月16日(16.07.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2020-122975 2020年7月17日(17.07.2020) JP  
特願 2021-025158 2021年2月19日(19.02.2021) JP

(74) 代理人: 特許業務法人秀和特許事務所(IP FIRM SHUWA); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目 4 番 1 0 号 アクロポリス 2 1 ビル 8 階 Tokyo (JP).

(71) 出願人: 田辺三菱製薬株式会社(MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5418505 大阪府大阪市中央区道修町三丁目 2 番 1 0 号 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

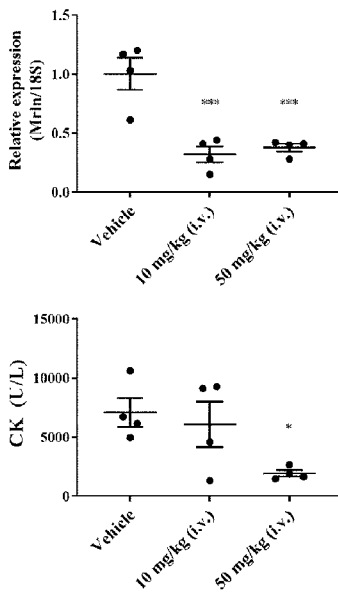
(72) 発明者: 石川 潔 (ISHIKAWA, Kiyoshi); 〒5418505 大阪府大阪市中央区道修町三丁目 2

(54) Title: AGENT FOR PREVENTING OR TREATING MUSCULAR DISEASE

(54) 発明の名称: 筋疾患の予防または治療剤

(57) Abstract: In the present invention, a myoregulin inhibitor such as a myoregulin antisense oligonucleotide or anti-myoregulin antibody is employed as an active component of an agent for preventing or treating a muscular disease such as muscular dystrophy, inclusion body myositis, amyotrophic lateral sclerosis, disuse muscle atrophy, and sarcopenia.

(57) 要約: Myoregulin に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドや抗 Myoregulin 抗体などの Myoregulin 阻害物質を筋ジストロフィー、封入体筋炎、筋萎縮性側索硬化症、廃用性筋萎縮およびサルコペニアなどの筋疾患の予防又は治療剤の有効成分とする。



Mean ± S.E.M. n=4. \*P<0.025, \*\*\*P<0.0005 vs. vehicle (Williams' multiple comparison test)

WO 2022/014703 A1

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

## 明 細 書

発明の名称：筋疾患の予防または治療剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、筋疾患を予防または治療するための薬剤に関する。

### 背景技術

[0002] ジストロフィン-糖タンパク質複合体 (dystrophin-glycoprotein complex: DGC) は骨格筋と細胞外マトリックスを連結する役割を担っている。DGCはジストロフィン、サルコグリカン (sarcoglycan)、ジストログリカン (dystroglycan) 等の蛋白質で構成される。DGCを構成する上記タンパク質のいずれかが遺伝子変異により欠損すると、筋ジストロフィー病態を発症する。ジストロフィンが欠損したタイプはデュシェンヌ型筋ジストロフィー (duchenne muscular dystrophy: DMD) と呼ばれる。DMDは最も発現頻度の高い筋ジストロフィーであり、男児に3,000分の1の概算頻度で発症する。DMDは筋ジストロフィーの中でも重症な型であり、10歳前後で歩行不能となり、車椅子生活となる。ジストロフィンの発現異常が軽微な場合は、DMDよりも症状は軽度となり、このような病態はベッカー型筋ジストロフィー (becker muscular dystrophy: BMD) と呼ばれる。サルコグリカンが欠損したタイプは肢帯型筋ジストロフィー (limb-girdle muscular dystrophy: LGMD) の2C~2F型に分類され、サルコグリカノパチー (sarcoglycanopathy) と総称される。サルコグリカノパチーも重症な型であり、その多くがDMDと同様の臨床症状を示す。

[0003] DGCを構成するタンパク質の欠損が原因で発症する筋ジストロフィーは、細胞内のカルシウム調節に異常が起きることが病態進行の一因であると考えられている (非特許文献1)。DMDは、そのモデルマウスの骨格筋におい

てSarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) 1の発現を亢進させると、筋ジストロフィー病態が改善することが報告されている（非特許文献2）。同様に、サルコグリカノパチーのモデルマウスにおいても、SERCA 1の発現亢進により筋ジストロフィー病態が改善することが明らかにされている（非特許文献3）。SERCAは小胞体膜に局在し、細胞質から小胞体内にカルシウムを取り込むポンプの役割を担う事で細胞内カルシウム量の調節に寄与するタンパク質であり、その中でもSERCA 1は骨格筋特異的に発現するタイプである。

[0004] 以上のことから、DGCを構成するタンパク質の欠損が原因で発症する筋ジストロフィーに対し、SERCA 1活性を亢進することは、筋ジストロフィー病態の改善に繋がることを示唆される。また、カルシウム調節に異常が生じる他の筋疾患においても、SERCA 1活性を亢進することは病態の改善に繋がる可能性がある。しかし、SERCA 1を選択的に、活性を十分に亢進することができる化合物は、現在まで報告されていない。

[0005] Myoregulin (MRLN) は、Long noncoding RNAによってコードされ、骨格筋特異的に発現し、SERCA活性を抑制することにより筋小胞体内カルシウムを調節するマイクロペプチドとして発見された。MRLNの遺伝子欠損マウスは、筋小胞体内カルシウム量と運動能力が増加することが報告され、そのメカニズムはSERCA 1の抑制解除によることが示唆されている（非特許文献4）。しかしながら、この文献で使用されたマウスは野生型マウスにおいてMRLNを欠損させたマウスであり、筋疾患の病態を反映していない。DMDのモデルマウス（mdxマウス）ではSERCA 1の発現が低下しているとの報告もあり、筋疾患の状態においてMRLNの発現を調節してSERCA 1の活性を向上させても筋疾患の病態が改善するかは不明であった（非特許文献5）。

このように、MRLNとSERCA 1の関係について報告はされているが、MRLNの発現抑制と筋ジストロフィーをはじめとする筋疾患の病態との

関係については報告されていない。

## 先行技術文献

## 非特許文献

- [0006] 非特許文献1: Biomed Res Int., 2015:131436 (2015)  
非特許文献2: Am J Physiol Cell Physiol., 308 (9): C699-709  
非特許文献3: J Clin Invest., 121 (3): 1044-52 (2011)  
非特許文献4: Cell, 160 (4): 595-606 (2015)  
非特許文献5: HUMAN GENE THERAPY, 21: 1735-1739 (2010)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明の課題は筋ジストロフィーなどの筋疾患を治療または予防するための薬剤を提供することである。

### 課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは鋭意検討を行った結果、MRLN阻害物質が筋疾患の治療や予防に有効であることを見出し、本発明を完成させるに至った。  
[0009] 本発明の要旨は以下の通りである。

[1] Myoregulin阻害物質を有効成分とする、筋疾患の予防または治療剤。

[2] Myoregulin阻害物質が核酸である、[1]に記載の予防または治療剤。

[3] Myoregulin阻害物質がMyoregulinに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、[2]に記載の予防または治療剤。

[4] 筋疾患が、筋ジストロフィー、封入体筋炎、筋委縮性側索硬化症、廃

用性筋萎縮およびサルコペニアを含む群から選択される、[1]～[3]のいずれかに記載の予防または治療剤。

[5] 筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、およびサルコグリカノパチーを含む群から選択される、[4]に記載の予防または治療剤。

[6] 筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、[4]に記載の予防または治療剤。

[7] 筋ジストロフィーがサルコグリカノパチーである、[4]に記載の予防または治療剤。

### 発明の効果

[0010] 本発明によれば、筋ジストロフィーなどの筋疾患の症状を改善することができ、当該疾患の予防や治療に有効な医薬が提供される。

### 図面の簡単な説明

[0011] [図1]MRLN特異的アンチセンスオリゴヌクレオチドによるMRLN発現阻害効果を示すグラフ。

[図2]m d xマウスにMRLN特異的アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与した時のMRLNの発現量比およびクレアチンキナーゼ（CK）の値を示すグラフ。

[図3]S g c bノックアウトマウスにMRLN特異的アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与した時のMRLNの発現量比およびCKの値を示すグラフ。

[図4]DMD患者由来細胞において、MRLN特異的s i R N Aを添加した時の4-Chloromethcathinone（CMC）依存的カルシウム濃度上昇を陰性コントロール添加時と比較した結果を示すグラフ。

### 発明を実施するための形態

[0012] 前述の概要及び以下の詳細な説明の両方とも例示的且つ説明的なものに過ぎず、請求される本発明を制限するものではないことを理解されたい。また、本明細書で使用されるセクションの見出しは、構成上の目的のためだけであり、記載される主題を制限するものとして解釈されるべきでない。

## [0013] (定義)

具体的な定義が与えられない限り、本明細書に記載の分析化学、有機合成化学、並びに医化学及び薬化学に関連して利用される命名法、及びそれらの手順及び技法は、当技術分野で周知であり、一般に使用されるものである。標準的な技法を、本明細書中で使用する化学合成及び化学分析に使用することができる。許容される場合、本明細書の開示の全体を通して言及される、すべての特許、出願、公開出願及び他の刊行物、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）などのデータベースを通して入手可能なGenBank受託番号及び関連する配列情報並びに他のデータは、本明細書に論じる文書の一部に関して、及びその全体が、参照により組み込まれる。

また、本明細書は、電子フォーマットの配列表と共に出願するが、当該電子フォーマット中に記載する配列表の情報は、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

[0014] 別段の指示がない限り、以下の用語は以下の意味を有する。

[0015] 「MRLN」は、Myoregulinといわれるオリゴヌクレオチド又はタンパク質を意味する。MRLNは、例えば、MRLN遺伝子から転写される各種プライシングバリエーション、一塩基置換体（SNP）などの配列バリエーションおよびそれらから翻訳されるバリエーションタンパク質を包含する。

[0016] 「核酸塩基」は、別の核酸の塩基と対形成することができる複素環部分を意味する。

[0017] 「核酸塩基配列」は、オリゴヌクレオチドを構成する、連続的な核酸塩基の順序を意味する。

[0018] 「ヌクレオシド」は、糖と核酸塩基が連結した分子を意味する。ある種の実施態様では、ヌクレオシドはリン酸基に連結している。

[0019] 「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドの糖部分にリン酸基が結合した分子を意味する。天然に存在するヌクレオチドは糖部分がリボース又はデオキシリボースであり、リン酸基を介してホスホジエステル結合により共有結合している。

- [0020] 「オリゴヌクレオチド」は、各ヌクレオシド及び各ヌクレオシド間結合が、互いに独立して連結したヌクレオシドのポリマーを意味する。
- [0021] 「相補的」は、第一の核酸と第二の核酸の核酸塩基間の対形成に対する能力を意味する。ある種の実施態様では、アデニンがチミジン又はウラシルと相補的である。ある種の実施態様では、シトシンがグアニンと相補的である。ある種の実施態様では5-メチルシトシンは、グアニンと相補的である。
- [0022] 「完全に相補的（相補性ともいう）」又は「100%相補的（相補性ともいう）」は、第一の核酸の核酸塩基配列の各核酸塩基のすべてが、第二の核酸の第二の核酸塩基配列中に相補的核酸塩基を有することを意味する。ある種の実施態様では、第一の核酸は修飾オリゴヌクレオチドであり、標的核酸が第二の核酸である。
- [0023] 「修飾ヌクレオシド」は、修飾糖及び／又は修飾核酸塩基を有するヌクレオシドを意味する。「修飾オリゴヌクレオチド」は、少なくとも1つの当該修飾ヌクレオシド及び／又は当該修飾ヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドを意味する。
- [0024] 「ヌクレオシド間結合」は、ヌクレオシド間の化学結合を指し、「修飾ヌクレオシド間結合」は、天然に存在するヌクレオシド間結合（すなわち、3'-5'ホスホジエステルヌクレオシド間結合）からの置換又は任意の変化を指す。例えば、ホスホロチオエートヌクレオシド間結合があるが、これに限定されない。「ホスホロチオエートヌクレオシド間結合」は、非架橋酸素原子の1つを硫黄原子で置き換えることによってホスホジエステル結合が修飾される、ヌクレオシド間の結合を意味する。
- [0025] 「修飾塩基」は、アデニン、シトシン、グアニン、チミジン又はウラシル以外の任意の核酸塩基を指す。例えば、5-メチルシトシンがあるが、これに限定されない。「非修飾核酸塩基」は、プリン塩基のアデニン（A）及びグアニン（G）、並びにピリミジン塩基のチミン（T）、シトシン（C）及びウラシル（U）を意味する。
- [0026] 「糖」又は「糖部分」は、天然糖部分又は修飾糖部分を意味する。「修飾

糖」は、天然の糖からの置換又は変化を指し、例えば、置換糖部分及び二環式糖が挙げられる。ここで、「置換糖部分」は、RNA又はDNAの天然糖以外のフラノシルを意味し、「二環式糖」は、同一環上に存在する2つの異なる炭素原子の架橋によって修飾されるフラノシル環を意味する。「二環式核酸」は、ヌクレオシド又はヌクレオチドのフラノース部分が、「二環式糖」を含む、ヌクレオシド又はヌクレオチドを指す。

[0027] 「siRNA」はsmall interfering RNAの略称であり、RNA干渉(RNAi)による遺伝子サイレンシングのために用いられる20~30塩基程度の塩基対からなる二本鎖RNAである。また、shRNAはshort hairpin RNAの略称であり、RNA干渉による遺伝子サイレンシングのために用いられるヘアピン型のRNA配列である。

[0028] 「抗体」は特定の抗原に特異的に結合するポリペプチドであり、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および抗原結合断片を包含する。

[0029] 「化合物」は、C、H、O、N、S等の原子の化学結合によって生じる物質全般を意味し、低分子化合物、ペプチド、糖、高分子化合物等を包含する。

[0030] 「投与」は、薬剤を動物に与えることを意味し、これらに限定されないが、医療専門家による投与及び自己投与が挙げられる。

[0031] 「有効量」は、薬剤を必要としている個体において所望の生理的転帰を実現するのに十分である、本発明の修飾オリゴヌクレオチドの量を意味する。有効量は、処置される個体の健康及び身体状態、処置される個体の分類群、組成物の製剤、個体の医学的状態の評価並びに他の関連する因子に応じて、個体の間で変動し得る。

[0032] 「予防」は、数分から無期限の期間にわたって、疾患、障害もしくは好ましくない健康状態、又は当該疾患、障害もしくは好ましくない健康状態に関連する1つ以上の症状、の発症又は発生を遅延させるか又は未然に防ぐことを意味する。予防するは、疾患、障害又は好ましくない健康状態を発生する危険性を低減させることも意味する。

[0033] 「治療」は、疾患、障害もしくは好ましくない健康状態、又は当該疾患、障害もしくは好ましくない健康状態に関連する1つ以上の症状、を軽減するか、改善するか、進行を遅延させるか、もしくは排除するか、又は、当該疾患、障害、もしくは好ましくない健康状態自体の1つもしくはそれ以上の原因を部分的に解消するか又は根絶することを意味する。

[0034] (具体的実施態様)

下記に示すある種の具体的実施態様は、これらに限定するものではないが、本発明は、Myoregulin阻害物質を有効成分とする、筋疾患の予防または治療剤（以下、本発明の剤と呼ぶことがある）を提供する。

[0035] <Myoregulin>

Myoregulin (MRLN) は、骨格筋に発現し、筋小胞体内カルシウム量を調節する、具体的には、筋小胞体内のカルシウムの取り込みを抑制する、マイクロペプチドである。MRLNとしては、ヒトやマウスなどの哺乳動物において発現するMRLNであればよいが、ヒトのMRLNが好ましい。マウスMRLN遺伝子の核酸塩基配列としては、例えば、NCBI GenBankに受託番号NM\_001304739.1で登録されている核酸塩基配列（配列番号1）が挙げられ、当該核酸塩基配列によってコードされるマウスMRLNタンパク質のアミノ酸配列としては配列番号2が挙げられる。ヒトMRLN遺伝子の核酸塩基配列としては、例えば、NCBI GenBankに受託番号NM\_001304731.2で登録されている核酸塩基配列（配列番号3）が挙げられ、当該核酸塩基配列によってコードされるヒトMRLNタンパク質のアミノ酸配列としては配列番号4が挙げられる。なお、mRNAの核酸塩基配列を表すときは、配列番号1および3において、TはUに読み替えるものとする。

[0036] ただし、MRLN遺伝子の核酸塩基配列は個体によって配列に差異を有することがあるため、上記配列には限定されず、筋小胞体内カルシウムを調節する、具体的には、筋小胞体内のカルシウムの取り込みを抑制する、マイクロペプチドをコードする限りにおいて、例えば、マウスMRLNの核酸塩基

配列は配列番号1と90%、95%、または98%以上の同一性を有する核酸塩基配列であってもよいし、ヒトMRLN遺伝子の核酸塩基配列は配列番号3と90%、95%、または98%以上の同一性を有する核酸塩基配列であってもよい。また、筋小胞体内カルシウムを調節する、具体的には、筋小胞体内のカルシウムの取り込みを抑制する、機能を有する限りにおいて、マウスMRLNタンパク質のアミノ酸配列は配列番号2と90%、95%、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよいし、ヒトMRLNタンパク質のアミノ酸配列は配列番号4と90%、95%、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。

[0037] <MRLN阻害物質>

MRLN阻害物質はMRLNの機能を阻害する物質および発現を阻害する物質を含む。

MRLNの機能としては、例えば、筋小胞体へのカルシウム取り込みを抑制する機能が挙げられる。

[0038] したがって、MRLN阻害物質は、筋小胞体へのカルシウム取り込みを増加させることができる物質である。なお、MRLN阻害物質の筋小胞体へのカルシウム取り込みを増加させる効果は、SERCA1活性抑制解除による可能性がある。

筋小胞体へのカルシウム取り込みの増加は、後述の系で測定することができ、本発明の剤は、筋小胞体へのカルシウム取り込みを、当該剤を添加しないときまたは陰性コントロールを添加したときと比べて1.1倍以上に増加させることが好ましく、1.2倍以上に増加させることが好ましく、1.5倍以上に増加させることがより好ましい。

本発明の剤は、MRLNに直接作用して上記機能を阻害する剤であってもよいし、MRLNに間接的に作用して上記機能を阻害する剤であってもよい。

[0039] 一方、MRLNの発現阻害は、MRLNのpre-mRNA、mRNAおよびタンパク質のいずれか1つ以上の量を低減させることを意味する。

MRLNの発現阻害は、後述する発現測定系で評価することができ、本発明の剤は、MRLNのpre-mRNA、mRNAおよび／またはタンパク質の量を、当該剤を添加しないときまたは陰性コントロールを添加したときと比べて、70%以下に低下させることが好ましく、50%以下に低下させることが好ましく、30%以下に低下させることが好ましい。

[0040] MRLN阻害物質はMRLNの機能および／または発現を阻害することができる物質であれば特にその種類は制限されないが、核酸（オリゴヌクレオチド）、抗体、化合物などが挙げられる。

[0041] MRLN阻害物質である核酸としては、具体的には、例えば、MRLNに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNAまたはこれらを発現するベクターが挙げられるが、MRLNに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが好ましく用いられる。

[0042] MRLNに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、10～50塩基、好ましくは15～30塩基からなり、MRLNの核酸塩基配列（例えば、配列番号1、3もしくはこれらと90%、95%、または98%以上の同一性を有する核酸塩基配列）の等長部分に100%相補的である連続した少なくとも8塩基の核酸塩基配列（以下「MRLN相補的核酸塩基配列」と称する）を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドであることが好ましい。ここでいう、等長部分とは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの核酸塩基配列と、MRLNの核酸塩基配列とで相補性を有する部分を意味する。

[0043] MRLNに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、上記MRLN相補的核酸塩基配列を含んだ全長10～50塩基の核酸塩基配列を有するものであればよく、MRLN相補的核酸塩基配列以外の部分において1つまたは複数のミスマッチ核酸塩基や付加塩基を有していてもよく、全長として、MRLNの核酸塩基配列（例えば、配列番号1、3）の等長部分に対して85%以上、90%以上、好ましくは95%以上の相補性を有してもよい。

[0044] なお、MRLNの核酸塩基配列とMRLN阻害物質であるアンチセンスオリゴヌクレオチドの相補性パーセントは、例えば、当技術分野で既知のBL

ASTプログラム (basic local alignment search tools)、PowerBLASTプログラム (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)、Genetyxソフトウェア (GENETYX CORPORATION) のデフォルト設定を使用して、慣例的に決定することができる。相同性パーセント、配列同一性または相補性は、例えば、ギャッププログラム (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.) によって、Smith and Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489) のアルゴリズムを使用するデフォルト設定、Genetyxソフトウェア (GENETYX CORPORATION) のデフォルト設定を使用して決定することができる。

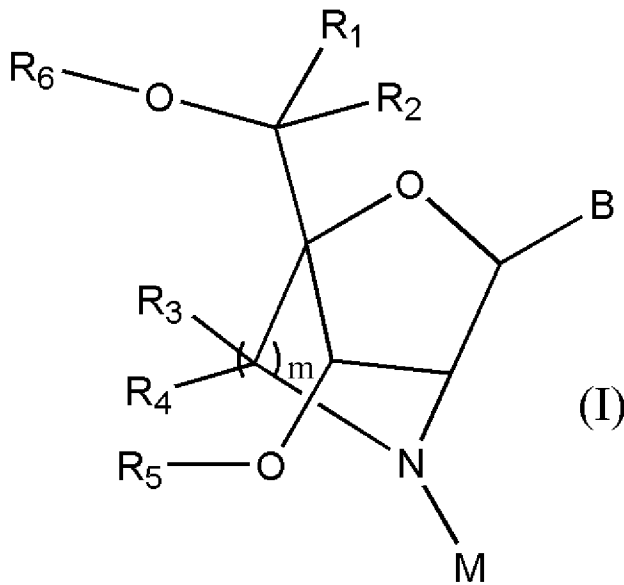
- [0045] MRLNに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、修飾オリゴヌクレオチドでありうる。修飾オリゴヌクレオチドとしては、5-メチルシトシンのような修飾塩基を含むものでもよいし、オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1つのヌクレオシドが修飾糖を含むものでもよい。また、ヌクレオシド間結合が修飾されているものでもよい。
- [0046] ここで、修飾糖とは、糖部分が修飾されたものをいい、当該修飾糖を1つ以上含む修飾オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ安定性の増強、結合親和性の増大等の有利な特徴を有する。修飾糖のうち少なくとも一つは、二環式糖または置換糖部分を有することが好ましい。
- [0047] 修飾糖を有するヌクレオシドの例としては、5'-ビニル、5'-メチル (RまたはS)、4'-S、2'-F、2'-OCH<sub>3</sub>、2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F及び2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>置換基を含むヌクレオシドが挙げられる。2'位の置換基は、アリル、アミノ、アジド、チオ、

O-アリル、O-C<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル、OCF<sub>3</sub>、OCH<sub>2</sub>F、O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>)、O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>)及びO-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>1</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) (式中、各R<sub>1</sub>、R<sub>m</sub>及びR<sub>n</sub>は独立に、Hまたは置換もしくは無置換のC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキルである)から選択することもできる。

[0048] 二環式糖を有するヌクレオシドの例としては、4' と2' のリボシル環原子の間の架橋を含むヌクレオシドが挙げられる。ある種の実施態様では、本明細書で提供されるオリゴヌクレオチドは、架橋が以下の式の1つを含む、1つまたは複数の二環式糖を有するヌクレオシドを含む：4' - (CH<sub>2</sub>) - O - 2' (LNA) ; 4' - (CH<sub>2</sub>) - S - 2' ; 4' - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> - O - 2' (ENA) ; 4' - CH(CH<sub>3</sub>) - O - 2' 及び4' - CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>) - O - 2' (及びそれらの類似物。米国特許7,399,845号を参照されたい) ; 4' - C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>) - O - 2' (及びそれらの類似物。WO2009/006478号を参照されたい) ; 4' - CH<sub>2</sub> - N(OCH<sub>3</sub>) - 2' (及びそれらの類似物。WO2008/150729号を参照されたい) ; 4' - CH<sub>2</sub> - O - N(CH<sub>3</sub>) - 2' (US2004-0171570号を参照されたい) ; 4' - CH<sub>2</sub> - N(R) - O - 2' (式中、Rは、H、C<sub>1</sub>~C<sub>12</sub>アルキルまたは保護基である) (米国特許7,427,672号を参照されたい) ; 4' - CH<sub>2</sub> - C(H)(CH<sub>3</sub>) - 2' (Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134を参照されたい) ; 並びに4' - CH<sub>2</sub> - C(=CH<sub>2</sub>) - 2' (及びそれらの類似物。WO2008/154401号を参照されたい)。

[0049] ある種の実施態様では、二環式糖を含むヌクレオシドはWO2020/100826に開示された架橋型人工核酸ALNAの糖部分を含むヌクレオシドであることができ、例えば、下記一般式(1)で表されるALNA [Ms]の糖部分を含むヌクレオシドとすることができる。

[化1]



[式中、

Bは、核酸塩基であり；

$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ は各々独立して、水素原子、又は1つ以上の置換基で置換されていてもよい $C_{1-6}$ アルキル基であり；

$R_5$ 及び $R_6$ は各々独立して、水素原子、水酸基の保護基、置換されてもよいリン酸基、リン部分又は支持体への共有結合等であり；

mは、1又は2であり；

Mは、1つ以上の置換基で置換されていてもよいメチル基で置換された、スルホニル基である。ALNA [Ms]の典型的な具体例は、Mが無置換のメチル基で置換されたスルホニル基である、ヌクレオシドである。

[0050] ある種の実施態様では、MRLN阻害物質としてのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの核酸塩基がシトシンである核酸塩基配列を有する。ある種の実施態様では、少なくとも1つのシトシンは修飾核酸塩基の5-メチルシトシンである。

[0051] RNA及びDNAの天然に存在するヌクレオシド間結合は、3'-5'ホスホジエステル結合である。1つまたは複数の修飾された、すなわち天然に存在しない、ヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、例えば、細胞取り込みの増強、標的核酸に対する親和性の増強及びヌクレアーゼの存

在下での安定性の増大などの特性が理由で、天然に存在するヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドよりも好ましいことが多い。

修飾ヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドは、リン原子を保持するヌクレオシド間結合及びリン原子を有さないヌクレオシド間結合を含む。代表的なリン含有ヌクレオシド間結合としては、これらに限定されないが、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホルアミデート及びホスホロチオエートの1つ以上が挙げられる。リン含有及び非リン含有結合の調製方法は周知である。

ある種の実施態様では、MRLN阻害物質としてのアンチセンスオリゴヌクレオチドのヌクレオシド間結合は、全てホスホロチオエートヌクレオシド間結合である。

[0052] MRLN阻害物質としてのアンチセンスオリゴヌクレオチドは常法によって合成することができ、例えば、市販の核酸合成装置によって容易に合成することができる。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドに含まれてもよい、ヌクレオシドの糖修飾のALNA [Ms]はWO2020/100826に開示されている方法で合成することができる。

[0053] MRLNに対するsiRNAは、MRLNのmRNAの部分配列（通常20塩基以上、好ましくは21塩基以上、且つ通常30塩基以下、好ましくは27塩基以下、より好ましくは23塩基以下）に相補的な配列を有する二本鎖オリゴRNAであり、当該転写産物を特異的に認識して切断することによりMRLNの発現を阻害し得るものであれば特に制限されない。当業者は、配列番号1に記載したマウスMRLN遺伝子の核酸塩基配列又は配列番号3に記載したヒトMRLN遺伝子の核酸塩基配列をもとに、ヒト又はマウスのMRLNの発現を阻害するために使用され得るsiRNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖の配列を決定することができる。siRNAの合成は自体公知の方法で行えば良く、例えば、センス鎖及びアンチセンス鎖をDNA/RNA化学合成または酵素合成によりそれぞれ合成し、それらをアニーリングさせることにより合成することができる。

- [0054] 発現ベクターとしては、当該技術分野で使用される任意のものを使用することができ、例えば、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが挙げられる。
- [0055] 前記MRLNに対する抗体は、MRLNに特異的に結合する抗体であって、結合することによりMRLNの機能を阻害するアンタゴニスト抗体を用いることが好ましい。
- [0056] 本明細書でいう「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等の天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体や一本鎖抗体、ヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体、ファージディスプレイによって作製された抗体およびこれらの結合性断片が含まれる。
- [0057] 結合性断片とは、前述した抗体の一部分の領域を意味し、具体的には例えばF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv(variable fragment of antibody)、sFv、dsFv(disulphide stabilized Fv)、dAb(single domain antibody)等があげられる(Exp. Opin. Ther. Patents, Vol. 6, No. 5, P. 441-456, 1996)。
- [0058] 抗体のクラスは、特に限定されず、IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgE等のいずれのアイソタイプを有する抗体をも包含する。好ましくは、IgGまたはIgMであり、精製の容易性等を考慮するとより好ましくはIgGである。
- [0059] ポリクローナル抗体は、例えば、下記のようにして製造することができる

。即ち、免疫原をマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ヤギ、ウマまたはウサギなどの動物の皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパット内あるいは腹腔内に1～数回注射することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1～14日毎に1～5回免疫を行って、最終免疫より約1～5日後に免疫感作された該哺乳動物から血清が取得される。血清をそのままポリクローナル抗体として用いることも可能であるが、好ましくは、限外ろ過、硫酸分画、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52等）、抗イムノグロブリンカラムもしくはプロテインA/Gカラム、免疫原を架橋させたカラム等を用いたアフィニティカラムクロマトグラフィーにより単離および／または精製される。

[0060] モノクローナル抗体は、例えば、下記のようにして製造することができる。すなわち、免疫原を投与されたマウス、ラットまたはハムスターなどの免疫感作動物から得られた抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた免疫原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

[0061] モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ（融合細胞）の調製は、ケーラーおよびミルシュタインらの方法（Nature, Vol. 256, P. 495-497, 1975）およびそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマp3/X63-AG8.653（653; ATCC No. CRL1580）、p3/NS1/1-Ag4-1（NS-1）、p3/X63-AG8.U1（p3U1）、SP2/O-Ag14（Sp2/O、Sp2）、PA1、F0またはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11またはCEM-T15を使用することができる。

[0062] モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニング

は、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述の免疫感作で用いた免疫原に対する反応性を、例えばELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。モノクローナル抗体は、上述のポリクローナル抗体と同様に、単離および／または精製されることが好ましい。

[0063] キメラ抗体は、例えば「実験医学（臨時増刊号），Vol. 6，No. 10，1988」、特公平3-73280号公報等を、ヒト化抗体は、例えば特表平4-506458号公報、特開昭62-296890号公報等を、ヒト抗体は、例えば「Nature Genetics，Vol. 15，P. 146-156，1997」、「Nature Genetics，Vol. 7，P. 13-21，1994」、特表平4-504365号公報、国際出願公開WO94/25585号公報、「Nature，Vol. 368，P. 856-859，1994」、特表平6-500233号公報等を参考にそれぞれ製造することができる。

[0064] ファージディスプレイによる抗体作製は、抗体スクリーニング用に作製されたファージライブラリーから、例えば、バイオパニングにより抗原に親和性を有するファージを回収、濃縮することにより、Fab等の抗体等を容易に得ることができる。ファージディスプレイによる抗体作製については、「Nature，Vol. 348，P. 552-554，1990」、「Phage display a laboratory manual」In cold spring harbor laboratory press，2001」、「Antibody Engineering - a Practical Approach，IRL Press，Oxford，1996」を参照のこと。

[0065] F(ab)<sub>2</sub>およびFab' は、イムノグロブリンを、蛋白分解酵素であるペプシンまたはパパインで処理することによりそれぞれ製造することができる。Fabは、Fab発現ファージライブラリーを上記ファージディスプレイによる抗体作製法と同様にスクリーニングすることにより、製造するこ

とができる。

[0066] 本発明の剤の有効成分であるMRLN阻害物質は、MRLNの機能や発現を阻害する化合物でもよい。化合物は、MRLNの機能や発現を阻害できる限り、その構造は限定されず、低分子化合物、ペプチド、糖、高分子化合物等いずれであってもよい。化合物はスクリーニングにより得ることができる。

[0067] <MRLN阻害物質の評価またはスクリーニング方法>

MRLN阻害物質を評価またはスクリーニング（選抜）する方法としては、MRLNの細胞内における発現の阻害あるいは機能の阻害を検証できる方法であればいかなるものでもよいが、具体的には、例えば、以下に示す*in vitro*、及び*in vivo*の検証方法が用いられる。

[0068] MRLN阻害物質の評価またはスクリーニングにおいて、MRLN発現阻害を指標とする場合は、MRLNを発現する細胞や組織において阻害物質又はその候補物質を添加して、MRLNのmRNAやタンパク質の発現量を測定し、該阻害物質または候補物質の非添加時または陰性コントロール添加時と比較する方法が挙げられる。

[0069] MRLNを発現する細胞としては、筋芽細胞や筋管細胞が挙げられ、培養筋細胞の一例としては、実施例で使用されたC2C12細胞が挙げられる。MRLN遺伝子が外来的に導入された細胞を用いてもよい。

[0070] また、非ヒト動物にMRLN阻害物質を投与し、当該動物の筋組織においてMRLNの発現量を測定してもよいし、単離された筋組織にMRLN阻害物質を投与し、当該筋組織においてMRLNの発現量を測定してもよい。

[0071] このような*in vitro*や*in vivo*のMRLN発現量測定系においてMRLN発現量を測定することで、MRLN阻害物質をスクリーニングしたり評価したりすることができる。

[0072] なお、MRLN阻害物質をMRLN発現細胞に接触させる方法も特に制限はないが、MRLN阻害物質が核酸である場合には、一般的に核酸を細胞内へ導入するために用いられる方法、例えば、リポフェクション法やエレクト

ロポレーション法、Gymnosis法等を用いることができる。

[0073] MRLNの細胞内におけるmRNA発現量は、当技術分野で既知の様々な方法で測定することができる。具体的には、ノーザンブロット解析、競合的ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または定量的リアルタイムPCR等が挙げられる。mRNAを単離する際には、当技術分野で周知の方法を使用して、例えば、製造業者の推奨プロトコルに従ってSuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Toyobo)、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen)等を使用することができる。このようにしてMRLNの発現量を測定することができる。

[0074] MRLNの細胞内におけるタンパク質の発現量は、当技術分野で既知の様々な方法でアッセイすることができる。具体的には、例えば、免疫沈降法、ウェスタンブロット解析（\*免疫ブロット法）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、定量的タンパク質アッセイ、タンパク質活性アッセイ（例えば、カスパーゼ活性アッセイ）、免疫組織化学法、免疫細胞化学法又は蛍光活性化セルソーティング（FACS）等があげられる。

[0075] MRLN阻害物質の評価またはスクリーニングにおいて、MRLNの機能阻害を指標としてMRLN阻害物質をスクリーニング又は評価する場合は、例えば、筋小胞体へのカルシウム取り込みおよび筋小胞体からのカルシウム放出を指標とすることができる。一例として、筋細胞ヘリアノジン（ryanodine）受容体アゴニストを添加して刺激を行い、筋小胞体から放出されるカルシウム量を測定する系において、MRLN阻害物質またはその候補物質を存在させ、その影響を調べることでMRLN阻害物質をスクリーニング又は評価することができる。筋疾患においては、筋小胞体からのカルシウム漏出が起こり、筋小胞体内のカルシウム量が低下して、リアノジン受容体アゴニスト刺激による筋小胞体からのカルシウム放出量が低下しているところ、MRLN阻害物質が存在することで筋小胞体内のカルシウム量が回復し、筋小胞体からのカルシウム放出量が増加（回復）するので、このカルシ

ウム放出の増加（回復）を指標としてMRLN阻害物質をスクリーニング又は評価することができる。

[0076] また、MRLN阻害物質は筋疾患モデル動物を用いて評価またはスクリーニングすることもできる。筋疾患モデル動物としては、例えば、ジストロフィンの欠損マウスやサルコグリカンの欠損マウスを用いることができる。

[0077] 例えば、これらの欠損マウスは血中クレアチンキナーゼ量が正常マウスに比べて増加しているところ、MRLN阻害物質を投与することで血中クレアチンキナーゼ量が低下するので、この血中クレアチンキナーゼ量の低下量を指標としてMRLN阻害物質を評価またはスクリーニングすることができる。

[0078] また、筋疾患モデル動物における筋線維の崩壊や細胞死などの病態改善を指標としてMRLN阻害物質を評価またはスクリーニングすることもできる。

[0079] 本発明の選抜方法により得られるMRLN阻害物質は、筋疾患の発生又は進行を抑制するため、筋疾患の予防及び／又は治療薬として用いることができる。すなわち、本発明は、上記方法によりMRLN阻害物質を選抜する工程を含む、筋疾患の予防及び／又は治療薬のスクリーニング方法を提供する。当該スクリーニング方法は、候補物質のMRLN発現阻害能と、筋小胞体からのカルシウム放出等のMRLN機能阻害能の両方を評価する工程を含むことが好ましい。

[0080] <MRLN阻害物質による筋疾患治療>

本発明においては、MRLN阻害物質によって、筋疾患を治療又は予防することができる。

筋疾患としては、例えば、筋ジストロフィー、封入体筋炎、筋委縮性側索硬化症、廃用性筋萎縮、サルコペニアが挙げられるが、特にこれらには限定されない。この中では、筋ジストロフィーが好ましい。筋ジストロフィーは代表的にはジストロフィン-糖タンパク質複合体（DGC）の構成因子に変異又は欠損を有する筋ジストロフィーが挙げられ、例えば、デュシェンヌ型

筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢体型筋ジストロフィー（サルコグリカノパチーなど）が挙げられる。なお、サルコグリカノパチーはLGMD2C、LGMD2D、LGMD2E、LGMD2Fを含む。

筋疾患は筋細胞の細胞質におけるカルシウム異常流入を伴う疾患であることが好ましい。

[0081] MRLN阻害物質は、MRLNの機能または発現を阻害することにより筋小胞体カルシウム取り込み増加機能を有し、それにより細胞質内のカルシウム量を低下させる。

したがって、細胞質内へのカルシウム異常流入を伴う上記のような筋疾患の治療や予防に有効である。

特に、筋ジストロフィーの病態には、1) DGCの欠損によって膜の透過性が亢進し、それによって細胞質内カルシウム量が増加し、細胞死が起こる、2) DGCの欠損によってnNOS (neuronal nitric oxide synthase) が減少して細胞質でiNOS (inducible nitric oxide synthase) が増加し、リアノジン受容体がニトロシル化され、筋小胞体内カルシウムが減少して筋収縮が低下する、という2つのメカニズムが示唆されている。

MRLN阻害剤は、細胞質内カルシウム量を減少させ、かつ、筋小胞体内のカルシウム取り込みを増加させることで、筋細胞死を抑制し、筋収縮力を維持・回復させ、筋疾患に対して治療効果および／または予防効果を発揮する。

すなわち、本発明の剤は、筋細胞死を抑制する剤または筋収縮力を維持・回復する剤でありうる。

[0082] したがって、本発明は、MRLN阻害物質を有効成分とする筋疾患の治療もしくは予防剤または筋疾患の治療もしくは予防のための医薬組成物；有効量のMRLN阻害物質を筋疾患の治療又は予防を必要とする対象へ投与する工程を含む筋疾患の治療または予防方法；筋疾患を治療または予防するためのMRLN阻害物質；筋疾患の治療または予防用医薬の製造におけるMRL

N阻害物質の使用；を提供する。

[0083] 本発明の剤は、M R L N阻害物質をそのままあるいは薬理的に許容し得る担体を配合することで調製することができる。薬理的に許容し得る担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。

[0084] また、M R L N阻害物質が核酸である場合は、本発明の剤は、核酸導入用試薬を含むことができる。該核酸導入用試薬としては、リポソーム、リポフェクチン、リポフェクタミン、DOGS（トランスフェクタム）、DOPE、DOTAP、DDAB、DHDEAB、HDEAB、ポリブレン、あるいはポリ（エチレンイミン）（PEI）等の陽イオン性脂質等を用いることができる。

[0085] 本発明の剤は、筋疾患の治療や予防を必要とする対象に、経口または非経口に投与することができる。非経口投与としては、例えば、皮下投与、静脈内投与、筋肉内投与、動脈内投与、腹腔内投与などが挙げられる。投与は、持続的又は長期的でもよいし、短期的又は断続的でもよい。

[0086] 経口投与する場合の剤形としては、例えば、錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤、マイクロカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などが挙げられる。

一方、非経口投与する場合の剤形としては、例えば、注射剤、注入剤、点滴剤、坐剤などが挙げられる。また、適当な基剤（例、酪酸の重合体、グリコール酸の重合体、酪酸-グリコール酸の共重合体、酪酸の重合体とグリコール酸の重合体との混合物、ポリグリセロール脂肪酸エステルなど）と組み合わせて徐放性製剤とすることも有効である。

[0087] M R L N阻害物質を上記の剤形に製剤化する方法としては、当該分野で一

一般的に用いられている公知の製造方法を適用することができる。また、上記の剤形に製する場合には、必要に応じて、その剤形に製する際に製剤分野において通常用いられる賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤などの担体、甘味剤、界面活性剤、懸濁化剤、乳化剤などの各種製剤添加物などを適宜、適量含有させて製造することができる。

[0088] 例えば、非経口投与のための剤としては、好ましくは、注射剤が用いられる。注射剤としては、静脈注射剤のほか、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などが含まれる。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記アンチセンスオリゴヌクレオチドなどのMRLN阻害物質を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁又は乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、リン酸緩衝食塩水、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。また、緩衝剤、pH調整剤、等張化剤、無痛化剤、保存剤、安定化剤などを含むことができる。かかる組成物は公知の方法によって製造される。

[0089] 本発明の剤に含まれる有効成分、すなわち、MRLN阻害物質の割合は、所望の効果を奏することができる範囲で適宜設定することができるが、通常、0.01~100重量%であり、好ましくは0.1~99.9重量%、より好ましくは0.5~99.5重量%である。

[0090] MRLN阻害物質を有効成分として含有する本発明の剤は、安定かつ低毒性で安全に使用することができる。その1日の投与量は、有効成分の種類、投与対象の体重や年齢、症状などにより一概に規定されるものではないが、1回につき体重1kgあたり0.1ngから1000mgの範囲、好ましくは1ng~100mg/kg/週の範囲で選ぶことが可能である。

[0091] 本発明の剤の投与回数は、特に限定されるものではないが、通常、1月当たり1～10回程度である。また、投与期間は、数日～1週間程度の短期服用であっても、数週間～数ヶ月程度の長期服用であっても、数年～数十年であってもよい。なお、相当程度の間隔を置いて前記疾患の症状が再発した場合、本発明の剤の再度の投与が可能である。

[0092] 本発明の剤の投与対象としては筋疾患の治療や予防を必要とする対象であるが、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、ヒツジ、サル、ヒト等の哺乳動物があげられ、好ましくは霊長類であり、特に好ましくはヒトである。

[0093] 非限定開示及び参照による組み込み

本明細書に記載のある種の化合物、組成物及び方法は、ある種の実施態様に従って特異的に記載されているが、以下の実施例は、本明細書に記載の化合物を例示する役割を果たすにすぎず、これを限定することを意図しない。本出願に記載される参考文献のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 実施例

[0094] 以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0095] 実施例 1

### 修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドの調製

修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドは一般的なオリゴ核酸の固相合成法に従い株式会社ニッポンジーン社/株式会社ニッポンジーンマテリアル社により合成および精製された。なお、化合物の同定は高速液体クロマト質量分析計により行った。

[0096] 合成したMRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドはマウスMRLNの核酸塩基配列（配列番号1）の409～424位に相補的な16塩基からなる修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

[0097] 実施例 2

### In vitro MRLN ノックダウン活性試験 (Gymnosis法)

C2C12細胞を384 plateに播種し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。3時間後、実施例1で合成したMRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。約72時間後、細胞からMRLNアンチセンスオリゴヌクレオチド含有培地を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline: PBS) でWashを行った。その後、SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Toyobo) を用い、RNAを含む細胞ライセートの調製と、ライセートからの逆転写反応を行い、鋳型cDNAの合成を行った。このcDNAを用いてリアルタイムPCRを行い、MRLNのmRNA発現量を定量した。MRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドの処理濃度は、最高濃度を1000 nMとし、公比3の4濃度で希釈したのを用い、MRLNノックダウン活性としてIC<sub>50</sub>を算出した。試験を3回行い、IC<sub>50</sub>の平均値を求めたところ、119.9 nMであった。このように、MRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドは、MRLN発現を阻害することが示された。

#### [0098] 実施例3

### In vivo MRLN ノックダウン活性試験

実施例1で合成したMRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドを、10および50 mg / 5 mL / kgとなるように生理食塩水で調製し、7週齢のC57BL / 10ScSn-Dmdmdx / J (mdx) マウス (雄性、Jackson Laboratory) に尾静脈内投与した。mdxマウスはDMDのモデルマウスとして最も使用されているマウスである。約72時間後にイソフルラン (ファイザー) 麻酔下にて腹部大静脈より全採血を行い、致死させた。致死後、前脛骨筋を採取し、RNA later Soln. (Invitrogen) に浸漬させた。組織にRNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) のRLTバッファーを

加え、マルチビーズショッカーを用いて破碎し、キット記載のプロトコルに従ってRNAを精製した。RNA 200 ngを逆転写し、得られたcDNAを用いて定量PCRを行った。MRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドのノックダウン活性は、MRLNの18S rRNAに対する量比を、vehicle群に対する相対値で示した。結果を図1に示す。MRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドは、筋肉においてMRLN発現を阻害することが示された。

#### [0099] 実施例4

##### 筋ジストロフィーモデルマウスに対するMRLN アンチセンスオリゴヌクレオチド投与試験

実施例1で合成したMRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドを、適切な濃度に生理食塩水で調製し、mdxマウス、サルコグリカン $\beta$  (sarcoglycan  $\beta$ : Sgcb) ノックアウトマウス、サルコグリカン $\alpha$  (Sgca) ノックアウトマウス、サルコグリカン $\gamma$  (Sgcg) ノックアウトマウス、サルコグリカン $\delta$  (Sgcd) ノックアウトマウスまたはジストロフィン/ユートロフィン (utrophin) ダブルノックアウトマウスに尾静脈内投与する。適切な回数投与する群を設定し、最終投与の数日から1週間後に麻酔下にて腹部大静脈より全採血を行い、致死させる。採取した血漿または血清を用い、クレアチンキナーゼ (CK) の測定を行う。致死後、病理解析用に骨格筋組織の一部を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で浸漬固定する。遺伝子解析用に骨格筋組織の一部を採取し、RNA later Soln. (invitrogen) に浸漬させる。遺伝子解析のためのRNA抽出は、組織にRNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) のRLTバッファーを加えた後、マルチビーズショッカーを用いて破碎し、キット記載のプロトコルに従って行う。RNA 200 ngを逆転写し、得られたcDNAを用いて定量PCRを行う。ホルマリン固定後の骨格筋組織は、パラフィン切片を作製し、IgG抗体 (Anti-IgG (H+L) Mouse, Goat-Poly Biotin

、Vector Laboratories)による免疫染色を実施することで組織標本を作製する。各組織標本は、Aperio AT2 (Leica Biosystems)を用いて撮影する。このデジタル画像を用いて、IgG免疫染色の陽性面積を画像解析ソフトウェア「HALO」のArea Quantification Moduleにより定量解析し、全体面積あたりの陽性面積の比率(%)を算出する。IgG免疫染色の陽性領域は、細胞の壊死線維の指標となる。MRLNアンチセンスオリゴヌクレオチド投与により、MRLN遺伝子の発現抑制、血漿または血清中CKの低下、そして骨格筋病理像の改善を確認する。

[0100] 具体的には、MRLNの発現量比とCKの値の解析は以下のようにして行った。

実施例1で合成したMRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドを、3および10mg/5mL/kgとなるように生理食塩水で調製し、8週齢のC57BL/10ScSn-Dmdmx/J (mdx) マウス(雄性、Jackson Laboratory)に尾静脈内投与した。週1回、2回投与し、最終投与の1週間後にイソフルラン(ファイザー株式会社)麻酔下にて腹部大静脈より全採血を行い、致死させた。また、上記MRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドを、10および50mg/5mL/kgとなるように生理食塩水で調製し、15週齢のサルコグリカン $\beta$  (sarcoglycan  $\beta$ : Sgcb)ノックアウトマウスに尾静脈内投与した。Sgcbノックアウトマウスはサルコグリカン $\beta$ パチーのモデルマウスであり、Sgcb遺伝子のExon 2を欠損させることにより作出した。投与の3日後にセボフルラン(丸石製薬)麻酔下にて腹部大静脈より全採血を行い、致死させた。致死後、前脛骨筋を採取し、RNA later Soln. (invitrogen)に浸漬させた。組織にRNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen)のRLTバッファーを加え、マルチビーズショッカーを用いて破碎し、キット記載のプロトコルに従ってRNAを精製した。RNA 200ngを逆転写し、得られたcDNAを用いて定量

PCRを行った。採取した血漿を用い、クレアチンキナーゼ（CK）の測定を行った。mdxマウスの結果を図2に、Sgcbノックアウトマウスの結果を図3に示す。MRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドは、どちらのモデルマウスにおいても、MRLN発現の阻害と共にCKを低下させた。

#### [0101] 実施例5

##### 筋ジストロフィー患者由来細胞を用いた細胞内カルシウム測定試験

DMDおよびサルコグリカノパチー（LGMD2E）患者由来筋芽細胞を96 well plateまたは384 well plateに播種し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養する。培養期間中、細胞がセミコンフルエントの状態での分化誘導を行う。細胞が筋管に分化した後、MRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはsiRNAまたはトランスフェクション試薬（Lipofectamine RNAi Reagent等）と混合したMRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはsiRNAを処置し、さらにCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養する。用いるMRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはsiRNAは、ヒトMRLNの核酸塩基配列（配列番号3）の一部に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはsiRNAである。MRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはsiRNAを処置してから数日後、細胞からMRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはsiRNA含有培地を除去し、カルシウムDyeを含むLoading Dyeを加え、室温で培養する。1時間後、FDSSによる細胞内カルシウム測定を行う。カルシウム測定時、細胞を刺激するために、リアノジン受容体アゴニスト等を用いる。MRLNアンチセンスオリゴヌクレオチドもしくはsiRNA処置による、患者由来細胞の筋小胞体内カルシウムの増加を確認する。

[0102] 具体的には、細胞内カルシウム測定は以下のようにして行った。

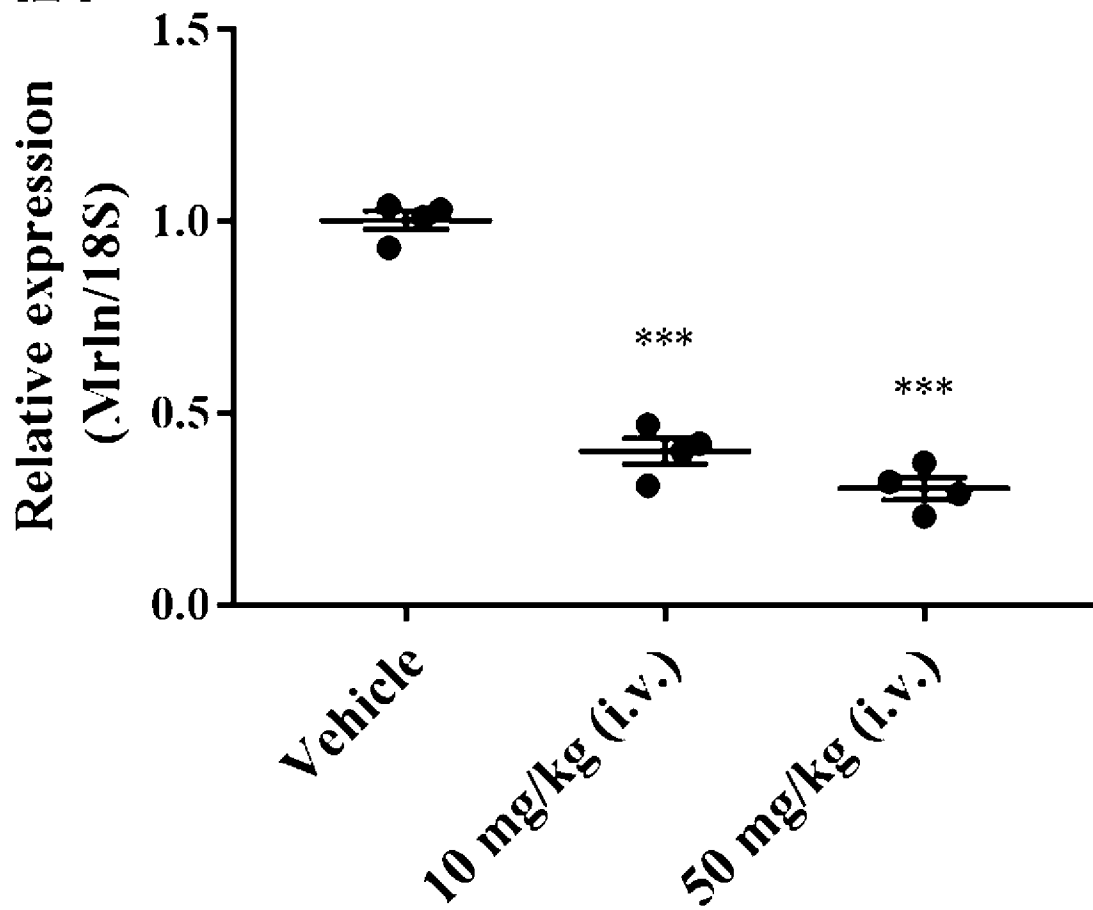
DMD患者由来細胞（NCNP Muscle Repository）を384 well plateに播種し、培養した後、筋管細胞へ分化誘導を行った。筋管に分化した後、Lipofectamine RNAiMA

X Transfection Reagent (invitrogen) とヒトMRLNの核酸塩基配列（配列番号3）に対するsiRNAとしてRNAi Silencer Select siRNA (Thermo Fisher)、もしくは陰性コントロールとしてSilencer Select Negative Control No. 1 siRNA (Thermo Fisher) を混合した後に細胞に添加し、さらにCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。7日間培養後、細胞から培地を除去し、Cal-520 (AAT Bioquest) を含むLoading Dyeを加え、室温で1時間培養した後、FDSS7000EX (浜松ホトニクス) を用いて、励起波長480nm、検出波長540nmで蛍光値を1秒間隔で10分間測定した。蛍光値を1分間測定し、ベースラインとした。測定開始1分後にリアノジン受容体アゴニスト4-Chloromethcathinone (CMC : 関東化学) を終濃度1mMになるように添加し、さらに9分間測定を継続した。細胞内カルシウム濃度上昇による蛍光値の増大の最大値からベースラインを差し引いた値を算出し、その値を筋小胞体内カルシウム量として解析した。結果を図4に示す。siRNA処置により、筋小胞体内からのカルシウム放出量が増加したことから、siRNAによるMRLNノックダウンにより、筋小胞体内カルシウム量が増加したことが示された。

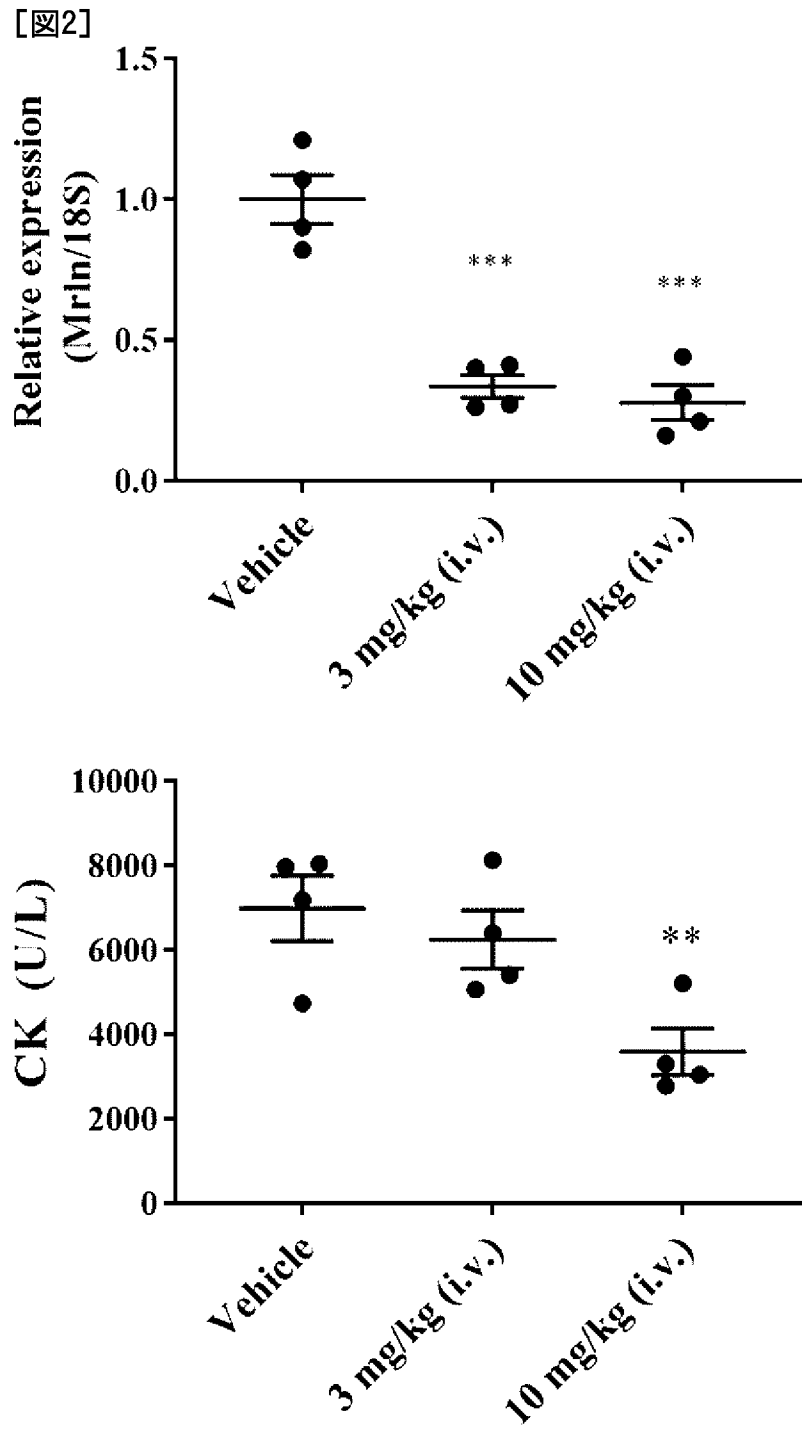
## 請求の範囲

- [請求項1] Myoregulin阻害物質を有効成分とする、筋疾患の予防または治療剤。
- [請求項2] Myoregulin阻害物質が核酸である、請求項1に記載の予防または治療剤。
- [請求項3] Myoregulin阻害物質が、Myoregulinに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項2に記載の予防または治療剤。
- [請求項4] 筋疾患が、筋ジストロフィー、封入体筋炎、筋委縮性側索硬化症、廃用性筋萎縮およびサルコペニアを含む群から選択される、請求項1～3のいずれか1項に記載の予防または治療剤。
- [請求項5] 筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、およびサルコグリカノパチーを含む群から選択される、請求項4に記載の予防または治療剤。
- [請求項6] 筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィーである、請求項4に記載の予防または治療剤。
- [請求項7] 筋ジストロフィーがサルコグリカノパチーである、請求項4に記載の予防または治療剤。

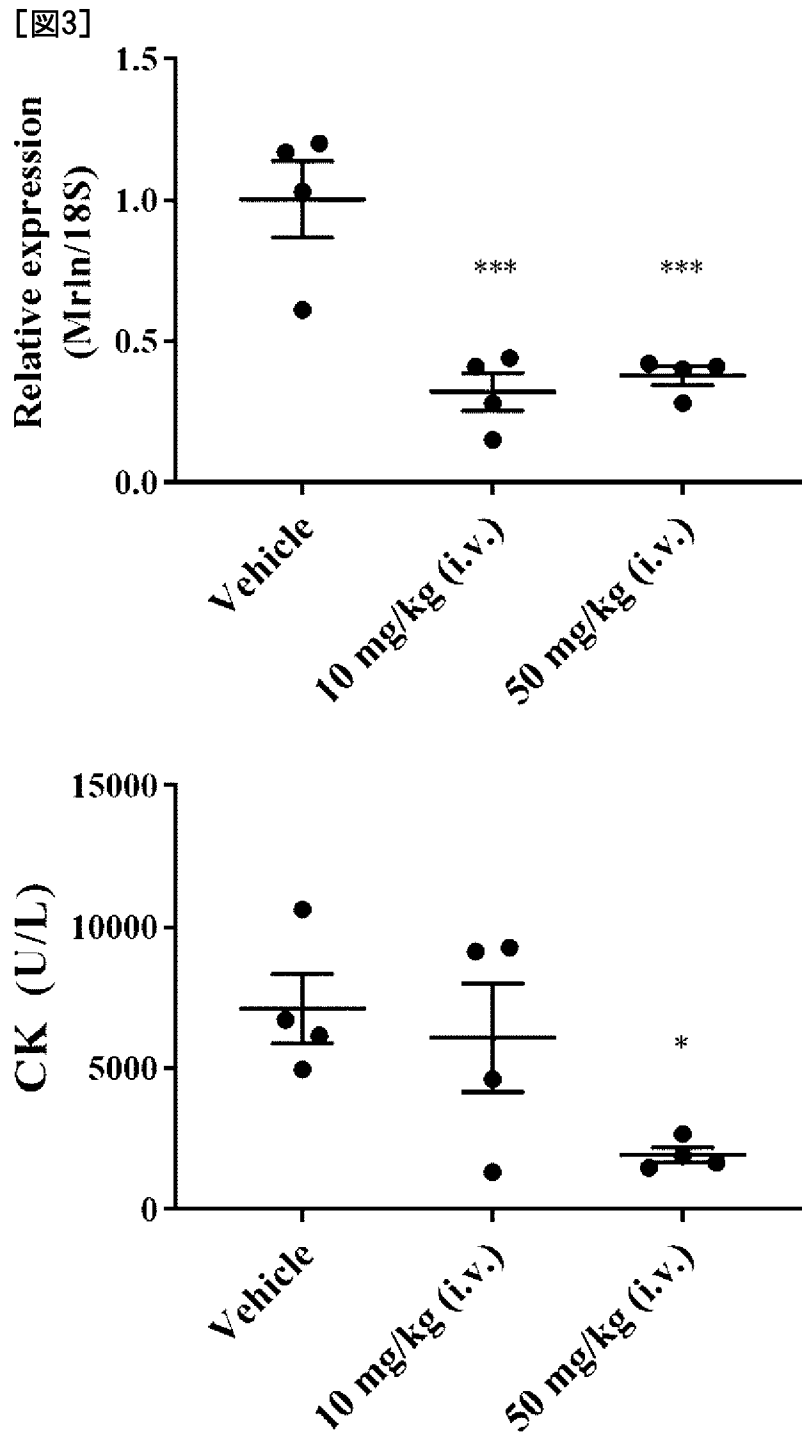
[Fig. 1]



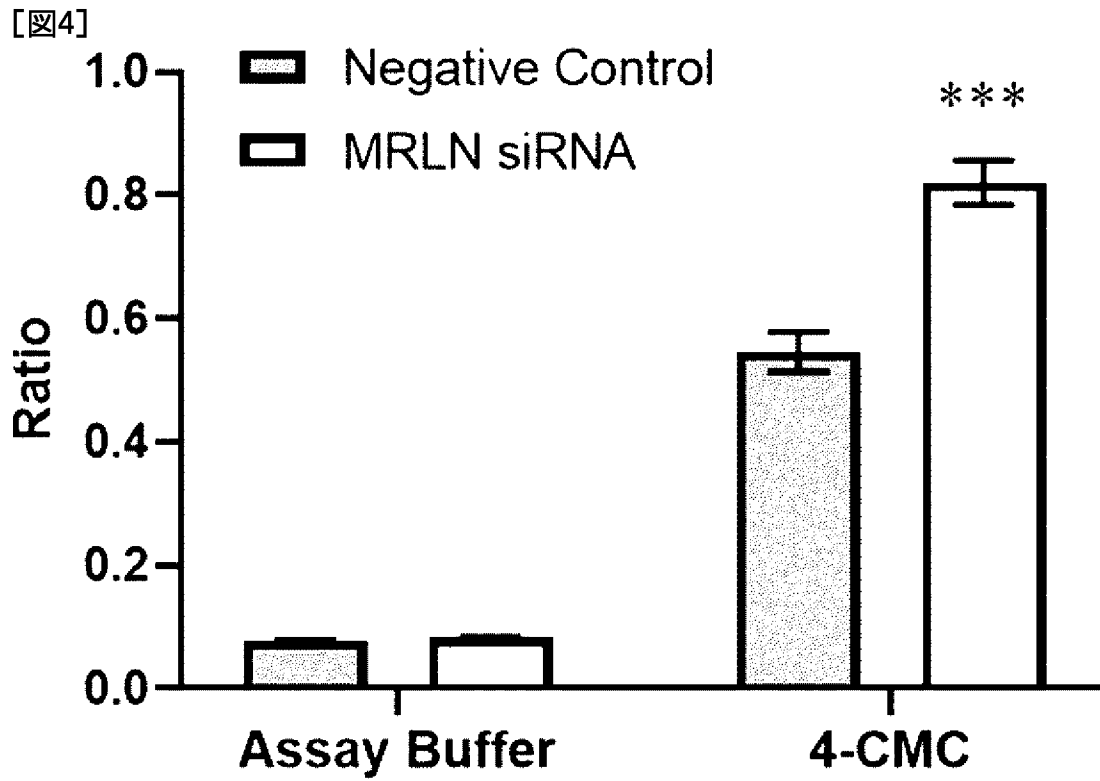
Mean  $\pm$  S.E.M. n=4. \*\*\* $P$ <0.0005, vs.vehicle (Williams' multiple comparison test)



Mean  $\pm$  S.E.M. n=4. \*\* $P$ <0.005, \*\*\* $P$ <0.0005 vs.vehicle  
(Williams' multiple comparison test)



Mean  $\pm$  S.E.M. n=4. \* $P$ <0.025, \*\*\* $P$ <0.0005 vs.vehicle  
(Williams' multiple comparison test)



Mean  $\pm$  S.E.M. n=15. \*\*\* $P$ <0.001 vs.  
Negative Control (Student's  $t$ -test)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2021/026798

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 A61K 45/00(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i  
 FI: A61K45/00; A61P29/00; A61P25/00; A61P21/00; A61K48/00;  
 A61K31/7088; C12N15/113 Z ZNA  
 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)  
 A61K45/00; A61K48/00; A61P21/00; A61P25/00; A61P29/00; C12N15/113;  
 A61K31/7088

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2017-214337 A (NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY) 07 December 2017 (2017-12-07) entirety, claims, paragraphs [0006], [0107], example 2	1-7
Y	ANDERSON, Douglas M. et al., "A Micropeptide Encoded by a Putative Long Noncoding RNA Regulates Muscle Performance", Cell, 2015, vol. 160, pp. 595-606, <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009">http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009</a> abstract, fig. 2, page 598, right column, page 599, left column	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 09 September 2021 (09.09.2021)	Date of mailing of the international search report 21 September 2021 (21.09.2021)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--	---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2021/026798

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016/0228502 A1 (UNIVERSITY OF MARYLAND) 11 August 2016 (2016-08-11) paragraphs [0004]-[0006]	1-7
A	US 2017/0298107 A1 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 19 October 2017 (2017-10-19) paragraph [0004]	1-7

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/JP2021/026798

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2017-214337 A	07 Dec. 2017	(Family: none)	
US 2016/0228502 A1	11 Aug. 2016	(Family: none)	
US 2017/0298107 A1	19 Oct. 2017	US 2020/0140502 A1 paragraph [0004]	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 45/00(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/7088(2006.01)i</p> <p>FI: A61K45/00; A61P29/00; A61P25/00; A61P21/00; A61K48/00; A61K31/7088; C12N15/113 Z ZNA</p>																	
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K45/00; A61K48/00; A61P21/00; A61P25/00; A61P29/00; C12N15/113; A61K31/7088</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2021年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年							
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																
日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年																
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年																
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2017-214337 A (国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター) 07.12.2017 (2017-12-07) 全体、特許請求の範囲、[0006]、[0107]、実施例2</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ANDERSON, Douglas M. et al., A Micropeptide Encoded by a Putative Long Noncoding RNA Regulates Muscle Performance, Cell, 2015, Vol. 160, p. 595-606, <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009">http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009</a> abstract, Figure 2, p. 598右欄p.599左欄</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2016/0228502 A1 (UNIVERSITY OF MARYLAND) 11.08.2016 (2016-08-11) [0004]-[0006]</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2017/0298107 A1 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 19.10.2017 (2017-10-19) [0004]</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	JP 2017-214337 A (国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター) 07.12.2017 (2017-12-07) 全体、特許請求の範囲、[0006]、[0107]、実施例2	1-7	Y	ANDERSON, Douglas M. et al., A Micropeptide Encoded by a Putative Long Noncoding RNA Regulates Muscle Performance, Cell, 2015, Vol. 160, p. 595-606, <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009">http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009</a> abstract, Figure 2, p. 598右欄p.599左欄	1-7	A	US 2016/0228502 A1 (UNIVERSITY OF MARYLAND) 11.08.2016 (2016-08-11) [0004]-[0006]	1-7	A	US 2017/0298107 A1 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 19.10.2017 (2017-10-19) [0004]	1-7
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号															
Y	JP 2017-214337 A (国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター) 07.12.2017 (2017-12-07) 全体、特許請求の範囲、[0006]、[0107]、実施例2	1-7															
Y	ANDERSON, Douglas M. et al., A Micropeptide Encoded by a Putative Long Noncoding RNA Regulates Muscle Performance, Cell, 2015, Vol. 160, p. 595-606, <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009">http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.009</a> abstract, Figure 2, p. 598右欄p.599左欄	1-7															
A	US 2016/0228502 A1 (UNIVERSITY OF MARYLAND) 11.08.2016 (2016-08-11) [0004]-[0006]	1-7															
A	US 2017/0298107 A1 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 19.10.2017 (2017-10-19) [0004]	1-7															
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																	
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“&” 同一パテントファミリー文献	“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献				
* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの																
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの																
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“&” 同一パテントファミリー文献																
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献																	
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献																	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>09.09.2021</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>21.09.2021</p>																
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP)</p> <p>〒100-8915</p> <p>日本国</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>濱田 光浩 4U 3763</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>																

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告  
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/026798

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2017-214337 A	07.12.2017	(ファミリーなし)	
US 2016/0228502 A1	11.08.2016	(ファミリーなし)	
US 2017/0298107 A1	19.10.2017	US 2020/0140502 A1 [0004]	