

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-524974

(P2024-524974A)

(43)公表日 令和6年7月9日(2024.7.9)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 0 4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z 4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861	Z
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全85頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-578922(P2023-578922)	(71)出願人	518195690 ストーク セラピューティクス, インク. アメリカ合衆国 0 1 7 3 0 マサチュー セッツ州 ベドフォード ウィギンズ・ア ヴェニュー 4 5
(86)(22)出願日	令和4年6月21日(2022.6.21)	(74)代理人	100118902 弁理士 山本 修
(85)翻訳文提出日	令和6年2月21日(2024.2.21)	(74)代理人	100106208 弁理士 宮前 徹
(86)国際出願番号	PCT/US2022/034344	(74)代理人	100196508 弁理士 松尾 淳一
(87)国際公開番号	WO2022/271699	(74)代理人	100122644 弁理士 寺地 拓己
(87)国際公開日	令和4年12月29日(2022.12.29)	(72)発明者	アズナレズ, イザベル アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1
(31)優先権主張番号	63/212,981		
(32)優先日	令和3年6月21日(2021.6.21)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ナンセンス変異依存RNA分解機構に基づく病態及び疾患の処置のためのアンチセンスオリゴマー

(57)【要約】

遺伝子における選択的スプライシング事象は、異常な又は低減したタンパク質発現をもたらす非生産的mRNA転写物をもたらす可能性があり、遺伝子における選択的スプライシング事象を標的とすることができる治療剤は、患者において機能性タンパク質の発現レベルを調節する、及び/又は異常なタンパク質発現を阻害することができる。そのような治療剤は、タンパク質の欠損によって引き起こされる病態又は疾患を処置するために使用することができる。

【選択図】 図1

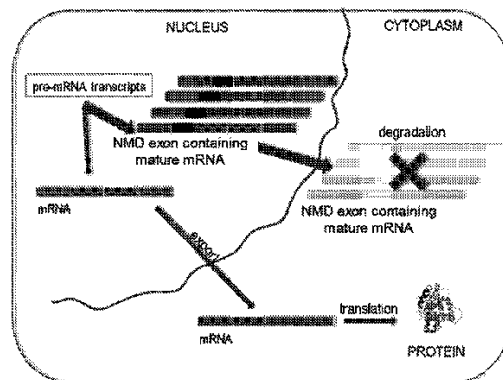


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的遺伝子から転写され、ナンセンス変異依存 RNA 分解機構誘導エクソン (NMD エクソン) を含む mRNA 前駆体を有する細胞において標的タンパク質の発現を調節する方法であって、薬剤又は薬剤をコードするベクターを細胞に接触させ、それによって薬剤が mRNA 前駆体からの NMD エクソンのスプライシングを調節し、それにより、mRNA 前駆体からプロセシングされるプロセシングされた mRNA のレベルを調節し、そして細胞において標的タンパク質の発現を調節することを含み、標的遺伝子は PHIP 遺伝子である、前記方法。

【請求項 2】

10

薬剤が、

- (a) mRNA 前駆体の標的化部分に結合するか、
- (b) NMD エクソンのスプライシングに関与する因子の結合を調節するか、又は
- (c) (a) 及び (b) の組合せである、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

薬剤が、NMD エクソンのスプライシングに関与する因子の、標的化部分の領域への結合に干渉する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

mRNA 前駆体の標的化部分が NMD エクソンの近位にある、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 5】

mRNA 前駆体の標的化部分が、NMD エクソンの 5' 末端の、最大で約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド上流にある、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

mRNA 前駆体の標的化部分が、NMD エクソンの 5' 末端の、少なくとも約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド、約 40 ヌクレオチド、約 30 ヌクレオチド、約 20 ヌクレオチド、約 10 ヌクレオチド、約 5 ヌクレオチド、約 4 ヌクレオチド、約 2 ヌクレオチド、約 1 ヌクレオチド上流にある、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 7】

mRNA 前駆体の標的化部分が、NMD エクソンの 3' 末端の、最大で約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド下流にある、請求項 2 に記載の方法。

40

【請求項 8】

mRNA 前駆体の標的化部分が、NMD エクソンの 3' 末端の、少なくとも約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド、約 40 ヌクレオチド、約 30 ヌクレオチド、約 20 ヌクレオチド、約 10 ヌクレオチド、約 5 ヌクレオチド、約 4 ヌクレオチド、約 2 ヌクレオチド、約 1 ヌクレオチド下流にある、請求項 2 に記載の方法。

50

【請求項 9】

mRNA 前駆体の標的化部分が、ゲノム部位 GRCh38/hg38:chr6 79004373 の、最大で約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド上流にある、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】

mRNA 前駆体の標的化部分が、ゲノム部位 GRCh38/hg38:chr6 79004373 の、約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド上流にある、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 11】

mRNA 前駆体の標的化部分が、ゲノム部位 GRCh38/hg38:chr6 79004436 の、最大で約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド下流にある、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 12】

mRNA 前駆体の標的化部分が、ゲノム部位 GRCh38/hg38:chr6 79004436 の、約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド下流にある、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

mRNA 前駆体の標的化部分が、mRNA 前駆体の 2 つのカノニカルなエクソン領域の間のイントロン領域に位置し、イントロン領域が NMD エクソンを含有する、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 14】

mRNA 前駆体の標的化部分が、NMD エクソンと少なくとも部分的に重複する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 15】

mRNA 前駆体の標的化部分が、NMD エクソンの上流又は下流のイントロンと少なくとも部分的に重複する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 16】

mRNA 前駆体の標的化部分が、5' NMD エクソン - イントロン接合部又は 3' NMD エクソン - イントロン接合部を含む、請求項 2 に記載の方法。

40

【請求項 17】

mRNA 前駆体の標的化部分が NMD エクソン内にある、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 18】

mRNA 前駆体の標的化部分が、NMD エクソンの約 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 個、又はそれより多い連続するヌクレオチドを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 19】

NMD エクソンが、(a) 配列番号 2 に対して少なくとも 80%、少なくとも 90%、

50

若しくは100%の配列同一性を有するイントロン配列内にある、及び/又は(b)配列番号3に対して少なくとも80%、少なくとも90%、若しくは100%の配列同一性を有する配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

NMDエクソンが配列番号3の配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項21】

mRNA前駆体の標的化部分が、ナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソンGRC h38/hg38:chr6 79004373~79004436内にある、請求項2に記載の方法。

【請求項22】

mRNA前駆体の標的化部分が、ナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソンGRC h38/hg38:chr6 79004373~79004436の上流又は下流にある、請求項2に記載の方法。

【請求項23】

mRNA前駆体の標的化部分が、ナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソンGRC h38/hg38:chr6 79004373~79004436のエクソン-イントロン接合部を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項24】

プロセシングされたmRNAから発現する標的タンパク質が、全長PHIPタンパク質又は野生型PHIPタンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

プロセシングされたmRNAから発現する標的タンパク質が、機能性PHIPタンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項26】

プロセシングされたmRNAから発現する標的タンパク質が、野生型PHIPタンパク質と比較して少なくとも部分的に機能性である、請求項1に記載の方法。

【請求項27】

プロセシングされたmRNAから発現する標的タンパク質が、全長野生型PHIPタンパク質と比較して少なくとも部分的に機能性である、請求項1に記載の方法。

【請求項28】

プロセシングされたmRNAから発現する標的タンパク質が、ナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソンGRC h38/hg38:chr6 79004373~79004436によってコードされるアミノ酸配列を欠くPHIPタンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項29】

mRNA前駆体からのNMDエクソンの排除を促進する、請求項1に記載の方法。

【請求項30】

薬剤と接触させた細胞におけるmRNA前駆体からのNMDエクソンの排除が、薬剤が存在しない場合と比較して、約1.1~約10倍、約1.5~約10倍、約2~約10倍、約3~約10倍、約4~約10倍、約1.1~約5倍、約1.1~約6倍、約1.1~約7倍、約1.1~約8倍、約1.1~約9倍、約2~約5倍、約2~約6倍、約2~約7倍、約2~約8倍、約2~約9倍、約3~約6倍、約3~約7倍、約3~約8倍、約3~約9倍、約4~約7倍、約4~約8倍、約4~約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、又は少なくとも約10倍増加する、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

細胞においてプロセシングされたmRNAのレベルの増加をもたらす、請求項1に記載の方法。

【請求項32】

10

20

30

40

50

薬剤と接触させた細胞におけるプロセシングされた mRNA のレベルが、薬剤が存在しない場合と比較して、約 1.1 ~ 約 10 倍、約 1.5 ~ 約 10 倍、約 2 ~ 約 10 倍、約 3 ~ 約 10 倍、約 4 ~ 約 10 倍、約 1.1 ~ 約 5 倍、約 1.1 ~ 約 6 倍、約 1.1 ~ 約 7 倍、約 1.1 ~ 約 8 倍、約 1.1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 約 9 倍、少なくとも約 1.1 倍、少なくとも約 1.5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2.5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3.5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、又は少なくとも約 10 倍増加する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

細胞において標的タンパク質の発現の増加をもたらす、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 34】

薬剤と接触させた細胞におけるプロセシングされた mRNA から発現する標的タンパク質のレベルが、薬剤が存在しない場合と比較して、約 1.1 ~ 約 10 倍、約 1.5 ~ 約 10 倍、約 2 ~ 約 10 倍、約 3 ~ 約 10 倍、約 4 ~ 約 10 倍、約 1.1 ~ 約 5 倍、約 1.1 ~ 約 6 倍、約 1.1 ~ 約 7 倍、約 1.1 ~ 約 8 倍、約 1.1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 約 9 倍、少なくとも約 1.1 倍、少なくとも約 1.5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2.5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3.5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、又は少なくとも約 10 倍増加する、請求項 33 に記載の方法。

20

【請求項 35】

薬剤が、配列番号 4 ~ 180 から成る群より選択される配列に対して少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、又は 100 % の配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 36】

薬剤が遺伝子編集分子をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 37】

遺伝子編集分子が CRISPR-Cas9 を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

薬剤がアンチセンスオリゴマー (ASO) であり、アンチセンスオリゴマーが、ホスホロチオエート連結又はホスホロジアミデート連結を含む骨格修飾を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 39】

薬剤がアンチセンスオリゴマー (ASO) であり、アンチセンスオリゴマーが、ホスホロジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2'-O-メチル部分、2'-フルオロ部分、2'-NMA 部分、又は 2'-O-メトキシエチル部分を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 40】

薬剤がアンチセンスオリゴマー (ASO) であり、アンチセンスオリゴマーが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 41】

各糖部分が修飾糖部分である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

薬剤がアンチセンスオリゴマー (ASO) であり、アンチセンスオリゴマーが、8 ~ 50 核酸塩基、8 ~ 40 核酸塩基、8 ~ 35 核酸塩基、8 ~ 30 核酸塩基、8 ~ 25 核酸塩基、8 ~ 20 核酸塩基、8 ~ 15 核酸塩基、9 ~ 50 核酸塩基、9 ~ 40 核酸塩基、9 ~ 35 核酸塩基、9 ~ 30 核酸塩基、9 ~ 25 核酸塩基、9 ~ 20 核酸塩基、9 ~ 15 核酸塩基、10 ~ 50 核酸塩基、10 ~ 40 核酸塩基、10 ~ 35 核酸塩基、10 ~ 30 核酸塩基、10 ~ 25 核酸塩基、10 ~ 20 核酸塩基、10 ~ 15 核酸塩基、11 ~ 50 核酸

50

塩基、11～40 核酸塩基、11～35 核酸塩基、11～30 核酸塩基、11～25 核酸塩基、11～20 核酸塩基、11～15 核酸塩基、12～50 核酸塩基、12～40 核酸塩基、12～35 核酸塩基、12～30 核酸塩基、12～25 核酸塩基、12～20 核酸塩基、又は12～15 核酸塩基から成る、請求項1に記載の方法。

【請求項43】

薬剤をコードするベクターを細胞に接触させることを含み、ベクターがウイルスベクターである、請求項1に記載の方法。

【請求項44】

ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス(HSV)ウイルスベクター、又はレトロウイルスベクターを含む、請求項43に記載の方法。

10

【請求項45】

ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを含む、請求項43に記載の方法。

【請求項46】

薬剤が修飾snRNAを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項47】

修飾ヒトsnRNAが修飾U1 snRNAである、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

修飾ヒトsnRNAが修飾U7 snRNAである、請求項46に記載の方法。

20

【請求項49】

修飾ヒトsnRNAの1本鎖ヌクレオチド配列の一部が、mRNA前駆体の標的化部分に結合する配列を含む、請求項46に記載の方法。

【請求項50】

修飾snRNAをコードするベクターを細胞に接触させることを含み、請求項46に記載の方法。

【請求項51】

標的タンパク質のmRNAレベル又は発現レベルを評価することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項52】

薬剤が治療剤である、請求項1に記載の方法。

30

【請求項53】

請求項52に記載の治療剤又は請求項52に記載の治療剤をコードするベクターと、薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項54】

治療剤又は治療剤をコードするベクターと、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物であって、治療剤が、配列番号4～180から成る群より選択される配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーを含む、前記医薬組成物。

【請求項55】

治療剤が、配列番号55～180から成る群より選択される配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%、又は100%の配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーを含む、請求項54に記載の医薬組成物。

40

【請求項56】

脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、髄腔内注射、皮下注射、経口投与、滑膜注射、硝子体内投与、網膜下注射、局所適用、移植、又は静脈内注射用に製剤化される、請求項53に記載の医薬組成物。

【請求項57】

髄腔内注射又は脳脊髄内注射用に製剤化される、請求項53に記載の医薬組成物。

【請求項58】

第2の治療剤をさらに含む、請求項53に記載の医薬組成物。

50

【請求項 59】

第2の治療剤が低分子を含む、請求項58に記載の医薬組成物。

【請求項 60】

第2の治療剤がアンチセンスオリゴマーを含む、請求項58に記載の医薬組成物。

【請求項 61】

第2の治療剤がイントロン保持を是正する、請求項58に記載の医薬組成物。

【請求項 62】

配列番号4～180から成る群より選択される配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーを含む組成物であって、アンチセンスオリゴマーは、骨格修飾、糖部分修飾、又はそれらの組合せを含む、前記組成物。

10

【請求項 63】

アンチセンスオリゴマーを含むポリヌクレオチドをコードするウイルスベクターを含む組成物であって、アンチセンスオリゴマーは、配列番号4～180から成る群より選択される配列から成る、前記組成物。

【請求項 64】

ポリヌクレオチドが修飾snRNAをさらに含む、請求項63に記載の組成物。

【請求項 65】

修飾ヒトsnRNAが修飾U1 snRNAである、請求項64に記載の組成物。

【請求項 66】

修飾ヒトsnRNAが修飾U7 snRNAである、請求項64に記載の組成物。

20

【請求項 67】

アンチセンスオリゴマーが、配列番号55～180から成る群より選択される配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%、又は100%の配列同一性を有する、請求項62又は63に記載の組成物。

【請求項 68】

疾患若しくは病態を処置すること又は疾患若しくは病態を発生する可能性を低下させることを必要とする対象の細胞内で標的タンパク質の発現を調節することによって、対象において疾患若しくは病態を処置するか又は疾患若しくは病態を発生する可能性を低下させる方法であって、対象の細胞に請求項53～61のいずれか1項に記載の医薬組成物を接触させることを含む、前記方法。

30

【請求項 69】

疾患又は病態が、PHIP遺伝子における機能喪失型変異に関連する、請求項68に記載の方法。

【請求項 70】

疾患又は病態が、PHIP遺伝子のハプロ不全に関連し、対象が、機能性PHIPタンパク質をコードする第1のアレル、及びPHIPタンパク質が産生されないか若しくは低減したレベルで産生される第2のアレル、又は非機能性PHIPタンパク質若しくは部分的に機能性PHIPタンパク質をコードする第2のアレルを有する、請求項68又は69に記載の方法。

【請求項 71】

疾患又は病態が知的障害疾患又は病態を含む、請求項68に記載の方法。

40

【請求項 72】

疾患又は病態が、Chung-Jansen症候群(CHUJANS)、常染色体優性障害、知的障害、発話遅延、不安、自閉症スペクトラム障害(ASD)、注意欠陥多動性障害(ADHD)、攻撃行動、顔面異形、カフェオレ斑、PHIPハプロ不全によって引き起こされる過体重症候群、発達遅延、肥満、又は異形症を含む、請求項68に記載の方法。

【請求項 73】

疾患又は病態がChung-Jansen症候群を含む、請求項68に記載の方法。

【請求項 74】

50

疾患又は病態が知的障害を含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 5】

疾患又は病態が P H I P 遺伝子の常染色体劣性変異に関連し、対象が、

(i) P H I P タンパク質が産生されないか、若しくは野生型アレルと比較して低減したレベルで産生される、又は

(i i) 産生される P H I P タンパク質が非機能性であるか、若しくは野生型アレルと比較して部分的に機能性である、

第 1 のアレル、及び

(i i i) P H I P タンパク質が野生型アレルと比較して低減したレベルで産生され、産生される P H I P タンパク質が野生型アレルと比較して少なくとも部分的に機能性である、又は

(i v) 産生される P H I P タンパク質が野生型アレルと比較して部分的に機能性である、

第 2 のアレル、

を有する、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 6】

対象がヒトである、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 7】

対象が非ヒト動物である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 8】

対象が胎児、胚、又は小児である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 9】

細胞がエクスピボである、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

医薬組成物が、脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、髄腔内注射、皮下注射、経口投与、滑膜注射、硝子体内投与、網膜下注射、局所適用、移植、又は静脈内注射によって投与される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 8 1】

医薬組成物が、髄腔内注射又は脳脊髄内注射によって投与される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 8 2】

疾患又は病態を処置する、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 8 3】

標的遺伝子から転写されかつナンセンス変異依存 RNA 分解機構誘導エクソン (N M D エクソン) を含む m R N A 前駆体からの N M D エクソンのスプライシングを調節し、それにより、m R N A 前駆体からプロセシングされるプロセシングされた m R N A のレベルを調節し、そして m R N A 前駆体を有する細胞において標的タンパク質の発現を調節する薬剤又は該薬剤をコードするベクターを含む組成物であって、標的遺伝子が P H I P 遺伝子である、前記組成物。

【請求項 8 4】

標的遺伝子から転写されかつナンセンス変異依存 RNA 分解機構誘導エクソン (N M D エクソン) を含む m R N A 前駆体からの N M D エクソンのスプライシングを調節し、それにより、m R N A 前駆体からプロセシングされるプロセシングされた m R N A のレベルを調節し、そして疾患又は病態の処置を必要とする対象の細胞において標的タンパク質の発現を調節することによって、対象において疾患又は病態を処置する薬剤又は該薬剤をコードするベクターを含む組成物であって、標的遺伝子が P H I P 遺伝子である、前記組成物。

【請求項 8 5】

請求項 8 3 又は 8 4 に記載の組成物と、薬学的に許容される賦形剤及び / 又は送達ビヒクルとを含む、医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 86】

標的タンパク質がプレクストリン相同ドメイン相互作用タンパク質（PHIP）である、請求項 1～85 のいずれか 1 項に記載の方法又は組成物又は医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

【001】本願は、その全体が本明細書に援用される、2021年6月21日に提出された米国仮特許出願第63/212,981号の利益を主張する。

【背景技術】

【0002】

【002】遺伝子における選択的スプライシング事象は、異常な又は低減したタンパク質発現をもたらし得る非生産的 mRNA 転写物をもたらす可能性があり、遺伝子における選択的スプライシング事象を標的とすることができる治療剤は、患者において機能性タンパク質の発現レベルを調節する、及び/又は異常なタンパク質発現を阻害することができる。そのような治療剤は、タンパク質欠損によって引き起こされる病態又は疾患を処置するために使用することができる。

【0003】

【003】Chung Jansen 症候群（CHUJANS）としても公知の PHIP 関連障害は、乳児期から明らかな全般的発達遅延、知的発達障害又は学習困難、行動異常、異形特徴、及び肥満を特徴とする。その表現型及びさらなる特徴の重症度は多様である。CHUJANS は、プレクストリン相同ドメイン相互作用タンパク質（PHIP）遺伝子の変化によって引き起こされる珍しい病態である。この遺伝子は、脳及び神経系の発生に関連するいくつかの過程において重要な役割を果たす。PHIP 遺伝子はまた、神経組織においてインスリンを制御することにも関与する。今日まで、PHIP 関連障害が糖尿病を引き起こすことは知られていないが、この障害を有する人々は、糖尿病の危険因子である過体重となる増加した危険がある。最も一般的な徴候及び症状としては、軽度から重度の学習上の問題、行動上の問題、及び過体重となる傾向が挙げられる。PHIP 関連障害は、常染色体優性病態である。PHIP 関連障害を有する多くの人々は、軽度から重度の知的障害を有する。知的障害を有しなかった、PHIP 関連障害を有する人々は、発話の問題、幼児期における全般的発達遅延、及び学習上の問題を有することが多い。現在、PHIP 関連障害患者のための承認された疾患修飾処置は存在せず、そのような処置に対する必要性が存在する。

【発明の概要】

【0004】

【004】標的遺伝子から転写されかつナンセンス変異依存 RNA 分解機構誘導エクソン（NMD エクソン）を含む mRNA 前駆体を有する細胞において標的タンパク質の発現を調節する方法であって、薬剤又は薬剤をコードするベクターを細胞に接触させ、それによって薬剤が mRNA 前駆体からの NMD エクソンのスプライシングを調節し、それにより、mRNA 前駆体からプロセシングされるプロセシングされた mRNA のレベルを調節し、そして細胞内で標的タンパク質の発現を調節することを含み、標的遺伝子は PHIP 遺伝子である、方法が本明細書で提供される。

【0005】

【005】一部の態様では、薬剤は、(a) mRNA 前駆体の標的化部分に結合するか、(b) NMD エクソンのスプライシングに関与する因子の結合を調節するか、又は (a) 及び (b) の組合せである。

【0006】

【006】一部の態様では、薬剤は、NMD エクソンのスプライシングに関与する因子の、標的化部分の領域への結合に干渉する。

【0007】

10

20

30

40

50

[007]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分はNMDエクソンの近位にある。

【0008】

[008]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、NMDエクソンの5'末端の、最大で約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド上流にある。

【0009】

[009]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、NMDエクソンの5'末端の、少なくとも約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約5ヌクレオチド、約4ヌクレオチド、約2ヌクレオチド、約1ヌクレオチド上流にある。

10

【0010】

[010]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、NMDエクソンの3'末端の、最大約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド下流にある。

20

【0011】

[011]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、NMDエクソンの3'末端の、少なくとも約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約5ヌクレオチド、約4ヌクレオチド、約2ヌクレオチド、約1ヌクレオチド下流にある。

30

【0012】

[012]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、ゲノム部位GRC h 38 / hg 38 : chr 6 79004373の、最大で約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド上流にある。

【0013】

[013]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、ゲノム部位GRC h 38 / hg 38 : chr 6 79004373の、約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド上流にある。

40

【0014】

[014]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、ゲノム部位GRC h 38 / hg 38 : chr 6 79004436の、最大で約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレ

50

オチド、約 50ヌクレオチド下流にある。

【0015】

[015]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、ゲノム部位GRCh38/hg38:chr6 79004436の、約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド下流にある。

【0016】

[016]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、mRNA前駆体の2つのカノニカルな(canonical)エクソン領域の間のイントロン領域に位置し、イントロン領域はNMDエクソンを含有する。

10

【0017】

[017]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、NMDエクソンと少なくとも部分的に重複する。

【0018】

[018]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、NMDエクソンの上流又は下流のイントロンと少なくとも部分的に重複する。

【0019】

[019]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、5' NMDエクソン - イントロン接合部又は3' NMDエクソン - イントロン接合部を含む。

20

【0020】

[020]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分はNMDエクソン内にある。

【0021】

[021]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、NMDエクソンの約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個、又はそれより多い連続するヌクレオチドを含む。

【0022】

[022]一部の態様では、NMDエクソンは、(a)配列番号2に対して少なくとも80%、少なくとも90%、若しくは100%の配列同一性を有するイントロン型(intronic)配列内にある、及び/又は(b)配列番号3に対して少なくとも80%、少なくとも90%、若しくは100%の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0023】

[023]一部の態様では、NMDエクソンは配列番号3の配列を含む。

【0024】

[024]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、ナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソンGRCh38/hg38:chr6 79004373~79004436内にある。

【0025】

[025]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、ナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソンGRCh38/hg38:chr6 79004373~79004436の上流又は下流にある。

40

【0026】

[026]一部の態様では、mRNA前駆体の標的化部分は、ナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソンGRCh38/hg38:chr6 79004373~79004436のエクソン - イントロン接合部を含む。

【0027】

[027]一部の態様では、プロセシングされたmRNAから発現する標的タンパク質は、全長PHIPタンパク質又は野生型PHIPタンパク質である。

50

【 0 0 2 8 】

【028】一部の態様では、プロセシングされたmRNAから発現する標的タンパク質は、機能性PHIPタンパク質である。

【 0 0 2 9 】

【029】一部の態様では、プロセシングされたmRNAから発現する標的タンパク質は、野生型PHIPタンパク質と比較して少なくとも部分的に機能性である。

【 0 0 3 0 】

【030】一部の態様では、プロセシングされたmRNAから発現する標的タンパク質は、全長野生型PHIPタンパク質と比較して少なくとも部分的に機能性である。

【 0 0 3 1 】

【031】一部の態様では、プロセシングされたmRNAから発現する標的タンパク質は、ナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソンGRCh38/hg38:chr6:79004373~79004436によってコードされるアミノ酸配列を欠くPHIPタンパク質である。

【 0 0 3 2 】

【032】一部の態様では、方法は、mRNA前駆体からのNMDエクソンの排除を促進する。

【 0 0 3 3 】

【033】一部の態様では、薬剤と接触させた細胞におけるmRNA前駆体からのNMDエクソンの排除は、薬剤が存在しない場合と比較して、約1.1~約10倍、約1.5~約10倍、約2~約10倍、約3~約10倍、約4~約10倍、約1.1~約5倍、約1.1~約6倍、約1.1~約7倍、約1.1~約8倍、約1.1~約9倍、約2~約5倍、約2~約6倍、約2~約7倍、約2~約8倍、約2~約9倍、約3~約6倍、約3~約7倍、約3~約8倍、約3~約9倍、約4~約7倍、約4~約8倍、約4~約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、又は少なくとも約10倍増加する。

【 0 0 3 4 】

【034】一部の態様では、方法は、細胞においてプロセシングされたmRNAのレベルの増加をもたらす。

【 0 0 3 5 】

【035】一部の態様では、薬剤と接触させた細胞におけるプロセシングされたmRNAのレベルは、薬剤が存在しない場合と比較して、約1.1~約10倍、約1.5~約10倍、約2~約10倍、約3~約10倍、約4~約10倍、約1.1~約5倍、約1.1~約6倍、約1.1~約7倍、約1.1~約8倍、約1.1~約9倍、約2~約5倍、約2~約6倍、約2~約7倍、約2~約8倍、約2~約9倍、約3~約6倍、約3~約7倍、約3~約8倍、約3~約9倍、約4~約7倍、約4~約8倍、約4~約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、又は少なくとも約10倍増加する。

【 0 0 3 6 】

【036】一部の態様では、方法は、細胞において標的タンパク質の発現の増加をもたらす。

【 0 0 3 7 】

【037】一部の態様では、薬剤と接触させた細胞においてプロセシングされたmRNAから発現する標的タンパク質のレベルは、薬剤が存在しない場合と比較して、約1.1~約10倍、約1.5~約10倍、約2~約10倍、約3~約10倍、約4~約10倍、約1.1~約5倍、約1.1~約6倍、約1.1~約7倍、約1.1~約8倍、約1.1~約9倍、約2~約5倍、約2~約6倍、約2~約7倍、約2~約8倍、約2~約9倍、約3~約6倍、約3~約7倍、約3~約8倍、約3~約9倍、約4~約7倍、約4~約8倍、

10

20

30

40

50

約 4 ~ 約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3 . 5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、又は少なくとも約 1 0 倍増加する。

【 0 0 3 8 】

[038]一部の態様では、薬剤は、配列番号 4 ~ 1 8 0 から成る群より選択される配列に対して少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーを含む。

【 0 0 3 9 】

[039]一部の態様では、薬剤は遺伝子編集分子をさらに含む。

【 0 0 4 0 】

[040]一部の態様では、遺伝子編集分子は C R I S P R - C a s 9 を含む。

【 0 0 4 1 】

[041]一部の態様では、薬剤がアンチセンスオリゴマー (A S O) であり、アンチセンスオリゴマーが、ホスホロチオエート連結又はホスホロジアミデート連結を含む骨格修飾を含む。

【 0 0 4 2 】

[042]一部の態様では、薬剤はアンチセンスオリゴマー (A S O) であり、アンチセンスオリゴマーは、ホスホロジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2 ' - O - メチル部分、2 ' - フルオロ部分、2 ' - N M A 部分、又は 2 ' - O - メトキシエチル部分を含む。

【 0 0 4 3 】

[043]一部の態様では、薬剤がアンチセンスオリゴマー (A S O) であり、アンチセンスオリゴマーが少なくとも 1 つの修飾糖部分を含む。

【 0 0 4 4 】

[044]一部の態様では、各糖部分は修飾糖部分である。

【 0 0 4 5 】

[045]一部の態様では、薬剤がアンチセンスオリゴマー (A S O) であり、アンチセンスオリゴマーが、8 ~ 5 0 核酸塩基、8 ~ 4 0 核酸塩基、8 ~ 3 5 核酸塩基、8 ~ 3 0 核酸塩基、8 ~ 2 5 核酸塩基、8 ~ 2 0 核酸塩基、8 ~ 1 5 核酸塩基、9 ~ 5 0 核酸塩基、9 ~ 4 0 核酸塩基、9 ~ 3 5 核酸塩基、9 ~ 3 0 核酸塩基、9 ~ 2 5 核酸塩基、9 ~ 2 0 核酸塩基、9 ~ 1 5 核酸塩基、1 0 ~ 5 0 核酸塩基、1 0 ~ 4 0 核酸塩基、1 0 ~ 3 5 核酸塩基、1 0 ~ 3 0 核酸塩基、1 0 ~ 2 5 核酸塩基、1 0 ~ 2 0 核酸塩基、1 0 ~ 1 5 核酸塩基、1 1 ~ 5 0 核酸塩基、1 1 ~ 4 0 核酸塩基、1 1 ~ 3 5 核酸塩基、1 1 ~ 3 0 核酸塩基、1 1 ~ 2 5 核酸塩基、1 1 ~ 2 0 核酸塩基、1 1 ~ 1 5 核酸塩基、1 2 ~ 5 0 核酸塩基、1 2 ~ 4 0 核酸塩基、1 2 ~ 3 5 核酸塩基、1 2 ~ 3 0 核酸塩基、1 2 ~ 2 5 核酸塩基、1 2 ~ 2 0 核酸塩基、又は 1 2 ~ 1 5 核酸塩基から成る。

【 0 0 4 6 】

[046]一部の態様では、方法は、薬剤をコードするベクターを細胞に接触させることを含み、ベクターはウイルスベクターである。

【 0 0 4 7 】

[047]一部の態様では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス (H S V) ウイルスベクター、又はレトロウイルスベクターを含む。

【 0 0 4 8 】

[048]一部の態様では、ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターを含む。

【 0 0 4 9 】

[049]一部の態様では、薬剤は修飾 s n R N A を含む。

【 0 0 5 0 】

[050]一部の態様では、修飾ヒト s n R N A は修飾 U 1 s n R N A である。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

[051]一部の態様では、修飾ヒト s n R N A は修飾 U 7 s n R N A である。

【 0 0 5 2 】

[052]一部の態様では、修飾ヒト s n R N A の 1 本鎖ヌクレオチド配列の一部は、m R N A 前駆体の標的化部分に結合する配列を含む。

【 0 0 5 3 】

[053]一部の態様では、方法は、修飾 s n R N A をコードするベクターを細胞に接触させることを含む。

【 0 0 5 4 】

[054]一部の態様では、方法は、標的タンパク質の m R N A レベル又は発現レベルを評価することをさらに含む。 10

【 0 0 5 5 】

[055]一部の態様では、薬剤は治療剤である。

【 0 0 5 6 】

[056]本明細書に記載される治療剤又は本明細書に記載される治療剤をコードするベクターと、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物も本明細書で提供される。

【 0 0 5 7 】

[057]治療剤又は治療剤をコードするベクターと、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物であって、治療剤が、配列番号 4 ~ 1 8 0 から成る群より選択される配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーを含む、前記医薬組成物も本明細書で提供される。 20

【 0 0 5 8 】

[058]一部の態様では、治療剤は、配列番号 5 5 ~ 1 8 0 から成る群より選択される配列に対して少なくとも 8 0 % 、少なくとも 9 0 % 、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーを含む。

【 0 0 5 9 】

[059]一部の態様では、医薬組成物は、脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、髄腔内注射、皮下注射、経口投与、滑膜注射、硝子体内投与、網膜下注射、局所適用、移植、又は静脈内注射用に製剤化される。

【 0 0 6 0 】

[060]一部の態様では、医薬組成物は、髄腔内注射又は脳脊髄内注射用に製剤化される。 30

【 0 0 6 1 】

[061]一部の態様では、医薬組成物は第 2 の治療剤をさらに含む。

【 0 0 6 2 】

[062]一部の態様では、第 2 の治療剤は低分子を含む。

【 0 0 6 3 】

[063]一部の態様では、第 2 の治療剤はアンチセンスオリゴマーを含む。

【 0 0 6 4 】

[064]一部の態様では、第 2 の治療剤はイントロン保持を是正する。 40

【 0 0 6 5 】

[065]配列番号 4 ~ 1 8 0 から成る群より選択される配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーを含む組成物であって、アンチセンスオリゴマーは、骨格修飾、糖部分修飾、又はそれらの組合せを含む、前記組成物も本明細書で提供される。

【 0 0 6 6 】

[066]アンチセンスオリゴマーを含むポリヌクレオチドをコードするウイルスベクターを含む組成物であって、アンチセンスオリゴマーが、配列番号 4 ~ 1 8 0 から成る群より選択される配列からなる、前記組成物も本明細書で提供される。

【 0 0 6 7 】

[067]一部の態様では、ポリヌクレオチドは修飾 snRNA をさらに含む。

【0068】

[068]一部の態様では、修飾ヒト snRNA は修飾 U1 snRNA である。

【0069】

[069]一部の態様では、修飾ヒト snRNA は修飾 U7 snRNA である。

【0070】

[070]一部の態様では、アンチセンスオリゴマーは、配列番号 55 ~ 180 から成る群より選択される配列に対して少なくとも 80%、少なくとも 90%、又は 100% の配列同一性を有する。

【0071】

[071]疾患若しくは病態を処置すること又は疾患若しくは病態を発生する可能性を低下させることを必要とする対象の細胞内で標的タンパク質の発現を調節することによって、対象において疾患若しくは病態を処置するか又は疾患若しくは病態を発生する可能性を低下させる方法であって、対象の細胞に本明細書に記載される医薬組成物を接触させることを含む、前記方法も本明細書で提供される。

【0072】

[072]一部の態様では、疾患又は病態は、PHIP 遺伝子における機能喪失型変異に関連する。

【0073】

[073]一部の態様では、疾患又は病態は、PHIP 遺伝子のハプロ不全に関連し、対象は、機能性 PHIP タンパク質をコードする第 1 のアレル、及び PHIP タンパク質が産生されないか若しくは低減したレベルで産生される第 2 のアレル、又は非機能性 PHIP タンパク質若しくは部分的に機能性 PHIP タンパク質をコードする第 2 のアレルを有する。

【0074】

[074]一部の態様では、疾患又は病態は知的障害疾患又は病態を含む。

【0075】

[075]一部の態様では、疾患又は病態は、Chung - Jansen 症候群 (CHUJANS)、常染色体優性障害、知的障害、発話遅延、不安、自閉症スペクトラム障害 (ASD)、注意欠陥多動性障害 (ADHD)、攻撃行動 (aggression)、顔面異形、カフェオレ斑、PHIP ハプロ不全によって引き起こされる過体重症候群、発達遅延、肥満、又は異形症を含む。

【0076】

[076]一部の態様では、疾患又は病態は Chung - Jansen 症候群を含む。

【0077】

[077]一部の態様では、疾患又は病態は知的障害を含む。

【0078】

[078]一部の態様では、疾患又は病態は PHIP 遺伝子の常染色体劣性変異に関連し、対象は、(i) PHIP タンパク質が産生されないか、若しくは野生型アレルと比較して低減したレベルで産生される、又は (ii) 産生される PHIP タンパク質が非機能性であるか、若しくは野生型アレルと比較して部分的に機能性である、第 1 のアレル、及び (iii) PHIP タンパク質が野生型アレルと比較して低減したレベルで産生され、産生される PHIP タンパク質が野生型アレルと比較して少なくとも部分的に機能性である、又は (iv) 産生される PHIP タンパク質が野生型アレルと比較して部分的に機能性である、第 2 のアレルを有する。

【0079】

[079]一部の態様では、対象はヒトである。

【0080】

[080]一部の態様では、対象は非ヒト動物である。

【0081】

10

20

30

40

50

[081]一部の態様では、対象は胎児、胚、又は小児である。

【0082】

[082]一部の態様では、細胞はエクスピボである。

【0083】

[083]一部の態様では、医薬組成物は、脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、髄腔内注射、皮下注射、経口投与、滑膜注射、硝子体内投与、網膜下注射、局所適用、移植、又は静脈内注射によって投与される。

【0084】

[084]一部の態様では、医薬組成物は、髄腔内注射又は脳脊髄内注射によって投与される。

【0085】

[085]一部の態様では、方法は疾患又は病態を処置する。

【0086】

[086]標的遺伝子から転写されかつナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソン(NMDエクソン)を含むmRNA前駆体からのNMDエクソンのスプライシングを調節し、それにより、mRNA前駆体からプロセシングされるプロセシングされたmRNAのレベルを調節し、そしてmRNA前駆体を有する細胞内で標的タンパク質の発現を調節する薬剤又は該薬剤をコードするベクターを含む組成物であって、標的遺伝子はPHIP遺伝子である、前記組成物も本明細書で提供される。

【0087】

[087]標的遺伝子から転写されかつナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソン(NMDエクソン)を含むmRNA前駆体からのNMDエクソンのスプライシングを調節し、それにより、mRNA前駆体からプロセシングされるプロセシングされたmRNAのレベルを調節し、そして疾患又は病態の処置を必要とする対象の細胞において標的タンパク質の発現を調節することによって、対象において疾患又は病態を処置する薬剤又は該薬剤をコードするベクターを含む組成物であって、標的遺伝子はPHIP遺伝子である、前記組成物も本明細書で提供される。

【0088】

[088]本明細書に記載される組成物と、薬学的に許容される賦形剤及び/又は送達ビヒクルとを含む医薬組成物も本明細書で提供される。

【0089】

[089]一部の態様では、標的タンパク質はプレクストリン相同ドメイン相互作用タンパク質(PHIP)である。

援用

[090]本明細書において言及される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、個々の各刊行物、特許、又は特許出願が援用されることが具体的かつ個別的に指示される場合と同程度に、本明細書に援用される。

図面の簡単な説明

[091]本開示の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲において詳細に記載される。本開示の特徴及び利点のより良好な理解は、本開示の原理が利用される例証的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、及び添付の図面を参照することによって得られるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0090】

【図1】[092]図1A~1Bは、ナンセンス変異依存mRNA分解機構誘導エクソンを含有する標的mRNA(NMDエクソンmRNA)、及び全長標的タンパク質又は機能性RNAの発現を増加させる、ナンセンス変異依存mRNA分解機構誘導エクソンの治療剤媒介排除の概略図である。図1Aは、核及び細胞質区画に分けられた細胞を示す。核において、標的遺伝子のmRNA前駆体転写物はスプライシングを受けてmRNAを生成し、このmRNAは、細胞質へ輸送され標的タンパク質に翻訳される。この標的遺伝子に関して、mRNAの一部の画分は、細胞質において分解されるナンセンス変異依存mRNA分解

10

20

30

40

50

機構誘導エクソンを含有し（NMDエクソン含有成熟mRNA）、したがって標的タンパク質産生をもたらさない。図1Bは、核及び細胞質区画に分けられた同じ細胞の1例を示す。治療剤、例えばアンチセンスオリゴマー（ASO）を用いる処理は、ナンセンス変異依存mRNA分解機構誘導エクソンの排除を促進し、生産的mRNAの増加をもたらし、次に、生産的mRNAはより高いレベルの標的タンパク質に翻訳される。

【図2】[093]図2は、ナンセンス変異依存分解機構（NMD）によって分解された非生産的mRNA転写物をもたらすPHIP遺伝子において同定された新規なNMDエクソン包含事象（エクソンX）の例示的な概略図を示す。

【図3】[094]図3は、陰の付いた部分及び上部の黒色棒によって示されるNMD誘導エクソン包含事象（GRCh38/hg38:chr6 79004373~79004436）を含有するPHIP遺伝子における領域のUCSCゲノムブラウザスナップショットを示す（エクソンは長方形であり、イントロンは矢頭を有する線である）。RNA配列決定は、シクロヘキシミド（CHX）又はDMSO対照を用いて処理したヒト神経系前駆細胞（ReN）及びヒトアストロサイトに由来する。

【図4A】[095]図4Aは、HEK293、SK-N-AS、及びReN VM細胞株におけるピューロマイシン又はシクロヘキシミド処理を介したNMD誘導エクソンの確認を示す。水処理（H）、DMSO処理（D）、ピューロマイシン処理（P）、又はシクロヘキシミド処理（C）細胞に由来する総RNAを使用するRT-PCR分析により、PHIP遺伝子のNMD誘導エクソン15x（GRCh38/hg38:chr6 79004373~79004436）に対応するバンドの存在を確認した。

【図4B】[096]図4Bは、U87細胞株及びアストロサイトにおけるピューロマイシン又はシクロヘキシミド処理を介したNMD誘導エクソンの確認を示す。水処理（H）、DMSO処理（D）、ピューロマイシン処理（P）、又はシクロヘキシミド処理（C）細胞に由来する総RNAを使用するRT-PCR分析により、PHIP遺伝子のNMD誘導エクソン15x（GRCh38/hg38:chr6 79004373~79004436）に対応するバンドの存在を確認した。

【図4C】[097]図4Cは、マウス胚性線維芽細胞におけるピューロマイシン又はシクロヘキシミド処理を介したNMD誘導エクソンの確認を示す。水処理（H）、DMSO処理（D）、ピューロマイシン処理（P）、又はシクロヘキシミド処理（C）細胞に由来する総RNAを使用するRT-PCR分析により、PHIP遺伝子のNMD誘導エクソン15x（GRCh38/hg38:chr6 79004373~79004436）に対応するバンドの存在を確認した。

【図5】[098]図5は、非ヒト霊長類におけるNMDエクソン事象（15X）の保存を示す。

【図6】[099]図6は、PHIPエクソン15x（GRCh38/hg38:chr6 79004373~79004436）領域周辺における例示的なASO歩行を示す。PHIPエクソン15x（GRCh38/hg38:chr6 79004373~79004436）領域周辺に関して、3'スプライス部位の上流の配列、3'スプライス部位を横断する配列、エクソン15x、5'スプライス部位を横断する配列、及び5'スプライス部位の下流の配列を標的として実施したASO歩行のグラフィック表示を示す。ASOは、1度に5ヌクレオチド、又はエクソンの始端若しくは終端とスプライス部位領域を横断する隣接ASOとの間では3ヌクレオチド移動することによってこれらの領域を網羅するように設計した。

【図7】[100]図7は、シクロヘキシミドの存在下において3µMの適応のASOをヌクレオフェクトしたReN VM細胞におけるTaqman RT-qPCR（生産的mRNA変化倍数に関して）及びRT-PCR（非生産的mRNA変化倍数に関して）によって評価したPHIPエクソン15x（GRCh38/hg38:chr6 79004373~79004436）領域ASO歩行を示す。対照遺伝子と比べたPHIP生産的mRNA産物のゲル画像及び変化倍数のグラフをプロットする。

【図8】[101]図8は、シクロヘキシミドの非存在下において3µMの適応のASOをヌ

10

20

30

40

50

クレオフェクトしたRen細胞におけるTaqman RT-qPCRによって評価したPHIPエクソン15x (GRCh38/hg38: chr6 79004373 79004436)領域ASO歩行を示す。対照遺伝子と比べた、ゲル画像、並びにPHIP非生産的mRNA産物の%、カノニカルなPHIP mRNAの変化倍数、及び総PHIP mRNAの変化倍数のグラフをプロットする。

【図9】[102]図9は、シクロヘキシミドの存在下において120nMの適応のASOをトランスフェクトしたHEK293細胞におけるTaqman RT-qPCRによって評価したPHIPエクソン15x (GRCh38/hg38: chr6 79004373 79004436)領域ASO歩行を示す。対照遺伝子と比べたPHIP生産的mRNA産物のゲル画像及び変化倍数のグラフをプロットする。

10

【図10A】[103]図10A~10Dは、シクロヘキシミドの非存在下において120nMの適応のASOをトランスフェクトしたHEK293細胞におけるTaqman RT-qPCRによって評価したPHIPエクソン15x (GRCh38/hg38: chr6 79004373 79004436)領域ASO歩行を示す。対照遺伝子と比べた、ゲル画像(図10A~10C)、並びにPHIP非生産的mRNA産物の%、カノニカルなPHIP mRNAの変化倍数、及び総PHIP mRNAの変化倍数のグラフ(図10D)をプロットする。

【図10B】図10A~10Dは、シクロヘキシミドの非存在下において120nMの適応のASOをトランスフェクトしたHEK293細胞におけるTaqman RT-qPCRによって評価したPHIPエクソン15x (GRCh38/hg38: chr6 79004373 79004436)領域ASO歩行を示す。対照遺伝子と比べた、ゲル画像(図10A~10C)、並びにPHIP非生産的mRNA産物の%、カノニカルなPHIP mRNAの変化倍数、及び総PHIP mRNAの変化倍数のグラフ(図10D)をプロットする。

20

【図10C】図10A~10Dは、シクロヘキシミドの非存在下において120nMの適応のASOをトランスフェクトしたHEK293細胞におけるTaqman RT-qPCRによって評価したPHIPエクソン15x (GRCh38/hg38: chr6 79004373 79004436)領域ASO歩行を示す。対照遺伝子と比べた、ゲル画像(図10A~10C)、並びにPHIP非生産的mRNA産物の%、カノニカルなPHIP mRNAの変化倍数、及び総PHIP mRNAの変化倍数のグラフ(図10D)をプロットする。

30

【図10D】図10A~10Dは、シクロヘキシミドの非存在下において120nMの適応のASOをトランスフェクトしたHEK293細胞におけるTaqman RT-qPCRによって評価したPHIPエクソン15x (GRCh38/hg38: chr6 79004373 79004436)領域ASO歩行を示す。対照遺伝子と比べた、ゲル画像(図10A~10C)、並びにPHIP非生産的mRNA産物の%、カノニカルなPHIP mRNAの変化倍数、及び総PHIP mRNAの変化倍数のグラフ(図10D)をプロットする。

【図11】[104]図11は、PHIPエクソン15x (GRCh38/hg38: chr6 79004373~79004436)領域周辺における例示的なASOマイクロ歩行を示す。

40

【図12】[105]図12は、シクロヘキシミドの存在下において3µMの適応のASOをヌクレオフェクトしたRen細胞におけるTaqman RT-qPCRによって評価したPHIPエクソン15x (GRCh38/hg38: chr6 79004373~79004436)領域ASOマイクロ歩行を示す。対照遺伝子と比べたPHIP生産的mRNA産物のゲル画像及び変化倍数のグラフをプロットする。

【図13】[106]図13は、シクロヘキシミドの存在下において120nMの適応のASOをトランスフェクトしたHEK293細胞におけるTaqman RT-qPCRによって評価したPHIPエクソン15x (GRCh38/hg38: chr6 79004373~79004436)領域ASOマイクロ歩行を示す。対照遺伝子と比べたPHIP

50

P 生産的 mRNA 産物のゲル画像及び変化倍数のグラフをプロットする。

【図 1 4】[107] 図 1 4 A は、異なる濃度の例示的な ASO による PHIP mRNA 前駆体からのエクソン 15 x のスプライシングの調節を実証するゲル画像を示す。図 1 4 B は、異なる濃度の例示的な ASO を用いる処理に応答した、カノニカルな PHIP mRNA の量の変化倍数及び非生産的 PHIP mRNA の量の変化の定量化をまとめる棒グラフである。

【図 1 5】[108] 図 1 5 A 及び 1 5 B は、例示的な ASO (I V S 1 4 X : - 3、I V S 1 4 X - E x 1 5 X X : 7、E x 1 5 X : 1 9、及び E x 1 5 X : 2 3) が PHIP タンパク質レベルの増加を引き起こしたことを実証する。図 1 5 A は、異なる処理条件下における PHIP タンパク質のウェスタンブロッティング画像を示し、図 1 5 B は、異なる処理に
10

応答した PHIP タンパク質レベルの変化の定量化をまとめる棒グラフである。
【図 1 6 A】[109] 図 1 6 A ~ 1 6 D は、ヌクレオフェクションを介した例示的な ASO を用いる処理が、エクソン 15 x を有する非生産的 PHIP 転写物の量の減少 (図 1 6 B) と、エクソン 15 及びエクソン 1 6 (カノニカル ; 図 1 6 C) 並びにエクソン 3 5 及び
20

エクソン 3 6 (G E ; 図 1 6 D) にまたがるプローブを使用する Taqman qPCR によって示されるエクソン 15 x を有しない PHIP 転写物の量の増加とをもたらしたことを実証する。図 1 6 A は、異なる処理条件下における RT - PCR 増幅産物のゲル画像を示す
。

【図 1 6 C】図 1 6 A ~ 1 6 D は、ヌクレオフェクションを介した例示的な ASO を用いる処理が、エクソン 15 x を有する非生産的 PHIP 転写物の量の減少 (図 1 6 B) と、
30

エクソン 15 及びエクソン 1 6 (カノニカル ; 図 1 6 C) 並びにエクソン 3 5 及びエクソン 3 6 (G E ; 図 1 6 D) にまたがるプローブを使用する Taqman qPCR によって示されるエクソン 15 x を有しない PHIP 転写物の量の増加とをもたらしたことを実証する。図 1 6 A は、異なる処理条件下における RT - PCR 増幅産物のゲル画像を示す
。

【図 1 7 A】[110] 図 1 7 A ~ 1 7 D は、自由取込みを介した例示的な ASO を用いる処理が、エクソン 15 x を有する非生産的 PHIP 転写物の量の減少 (図 1 7 B) と、
40

エクソン 15 及びエクソン 1 6 (カノニカル ; 図 1 7 C) 並びにエクソン 3 5 及びエクソン 3 6 (G E ; 図 1 7 D) にまたがるプローブを使用する Taqman qPCR によって示される
50

17Aは、異なる処理条件下におけるRT-PCR増幅産物のゲル画像を示す。

【図17C】図17A～17Dは、自由取込みを介した例示的なASOを用いる処理が、エクソン15xを有する非生産的PHIP転写物の量の減少(図17B)と、エクソン15及びエクソン16(カノニカル; 図17C)並びにエクソン35及びエクソン36(GE; 図17D)にまたがるプローブを使用するTaqman-qPCRによって示されるエクソン15xを有しないPHIP転写物の量の増加とをもたらしたことを実証する。図17Aは、異なる処理条件下におけるRT-PCR増幅産物のゲル画像を示す。

【図17D】図17A～17Dは、自由取込みを介した例示的なASOを用いる処理が、エクソン15xを有する非生産的PHIP転写物の量の減少(図17B)と、エクソン15及びエクソン16(カノニカル; 図17C)並びにエクソン35及びエクソン36(GE; 図17D)にまたがるプローブを使用するTaqman-qPCRによって示されるエクソン15xを有しないPHIP転写物の量の増加とをもたらしたことを実証する。図17Aは、異なる処理条件下におけるRT-PCR増幅産物のゲル画像を示す。

【発明を実施するための形態】

【0091】

[111](プレクストリン相同相互作用タンパク質)PHIP遺伝子における選択的スプライシング事象は、異常な又は低減したタンパク質発現をもたらし得る非生産的mRNA転写物をもたらす可能性があり、PHIP遺伝子における選択的スプライシング事象を標的とすることができる治療剤は、Chung-Janssen症候群(CHUJANS)患者において機能性タンパク質の発現レベルを調節する、及び/又は異常なタンパク質発現を阻害することができる。そのような治療剤は、PHIPタンパク質欠損によって引き起こされる病態を処置するために使用することができる。

【0092】

[112]非生産的mRNA転写物をもたらす可能性がある選択的スプライシング事象の1つは、ナンセンス変異依存mRNA分解機構を誘導し得る、mRNA転写物への追加のエクソンの包含である。本開示は、PHIPの選択的スプライシングを調節して、タンパク質をコードする成熟mRNA、したがって、翻訳された機能性PHIPタンパク質の産生を増加させるための組成物及び方法を提供する。これらの組成物及び方法は、エクソンスキッピング、例えば偽エクソンスキッピングを引き起こし、PHIP mRNA前駆体の構成的スプライシングを促進することができるアンチセンスオリゴマー(ASO)を含む。様々な実施形態では、機能性PHIPタンパク質を、本開示の方法を使用して増加させて、PHIPタンパク質欠損によって引き起こされる病態を処置することができる。

mRNAスプライシング

[113]RNA配列における介在配列又はイントロンは、スプライソソームと称される、大きく、高度に動的なRNA-タンパク質複合体によって除去され、スプライソソームは、1次転写物と、核内低分子RNA(snRNA)と、多数のタンパク質との間の複雑な相互作用を調整する。スプライソソームは、その都度各イントロン上に規則正しく集合し、U1-snRNAによる5'スプライス部位(5'ss)又はU2経路による3'スプライス部位(3'ss)の認識から開始し、U2経路では、U2補助因子(U2AF)が3'ss領域に結合して、U2が分岐点配列(BPS)に結合することを容易にする。U2AFは、ポリピリミジントラクト(PPT)に結合するU2AF2によってコードされる65kDのサブユニット(U2AF65)、及び3'ssにおいて高度に保存されたAGジヌクレオチドと相互作用し、U2AF65結合を安定化させる、U2AF1によってコードされる35kDのサブユニット(U2AF35)から構成される安定なヘテロ2量体である。正確なスプライシングは、BPS/PPTユニット及び3'ss/5'ssに加えて、イントロン又はエクソンスプライシングエンハンサー若しくはサイレンサーとして公知の、スプライス部位認識を活性化又は抑制する補助配列又は構造を必要とする。これらのエレメントは、同じ配列を有するが本来の部位よりも10倍多い、高等真核生物のゲノムにおける非常に過剰な潜在的又は偽部位の中から、真のスプライス部位が認識されることを可能にする。エレメントはしばしば制御機能を有するが、その活性化又は抑制の厳密な機

構は、十分に理解されていない。

【0093】

[114] スプライスするか否かの決定は、最も明確なスプライシングシグナルでさえ時折誤ってスプライスすることがあるように、典型的には、決定的な過程というよりはむしろ確率的な過程としてモデル化することができる。しかしながら、通常の条件下では、mRNA前駆体スプライシングは驚くほど高い忠実度で行われる。これは、部分的には、隣接するシス作用性補助エクソン及びイントロンのスプライシング制御エレメント（ESR又はISR）の活性に起因すると考えられる。典型的には、これらの機能的エレメントは、スプライシングを刺激又は阻害する能力に基づいて、それぞれエクソン又はイントロンスプライシングエンハンサー（ESE又はISE）又はサイレンサー（ESS又はISS）のいずれかに分類される。現在、一部の補助的なシス作用性エレメントはスプライソソーム集合の動力学、例えばU1 snRNPと5' splice siteとの間における複合体の布置に影響を及ぼすことによって作用し得るという証拠が存在するが、多くのエレメントはトランス作用性RNA結合タンパク質（RBP）と協調的に機能するという可能性は、非常に高いように思われる。例えば、RBPのセリン及びアルギニンが豊富なファミリー（SRタンパク質）は、エクソンを規定することにおいて重要な役割を有するタンパク質の保存されたファミリーである。SRタンパク質は、プレスプライソソームの成分を隣接するスプライス部位に動員することによって、又はその近傍においてESSの効果を弱めることによってエクソン認識を促進する。ESSの抑制効果は、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質（hnRNP）ファミリーのメンバーによって媒介されることがあり、コアスプライシング因子の隣接するスプライス部位への動員を変更させることができる。サイレンサーエレメントは、スプライシング制御における役割に加えて、エクソンの典型的な間隔を有するが機能的なオープンリーディングフレームを有しない数組のデコイントロンスプライス部位である偽エクソンの抑制における役割を有することが示唆される。ESE及びESSは、それらの同族のトランス作用性RBPと共に、mRNAがその前駆体から組み立てられる方法、場所、及び時を指定する1組のスプライシング統御因子における重要な成分の代表である。

10

20

【0094】

[115] 選択的スプライシングは、単一の遺伝子から転写される単一の1次mRNA転写物からプロセシングされる成熟mRNA転写物の複数のアイソフォーム、及びその結果として生じる、複数の成熟mRNAアイソフォームの少なくとも一部から翻訳される複数のタンパク質を結果的にもたらし得る、遺伝子発現の間の制御された過程である。この過程において、遺伝子の特定のエクソンは、その遺伝子から産生される最終的なプロセシングされたmRNAに含まれている場合も、そこから排除されている場合もある。その結果、選択的にスプライスされたmRNAから翻訳されたタンパク質は、それらのアミノ酸配列、及び場合によっては、それらの生物学的機能における差を含有し得る。

30

【0095】

[116] エクソン-イントロン境界を示す配列は、ヒト遺伝子内に高頻度で生じ得る、様々な強さの縮重したシグナルである。多エクソン遺伝子では、異なる対のスプライス部位が多く異なる組合せで互いに連結して、単一の遺伝子から多種多様な転写物を作り出すことができる。これは一般的に選択的mRNA前駆体スプライシングと称される。選択的スプライシングによって産生される大半のmRNAアイソフォームは、核から輸送され、機能性ポリペプチドに翻訳されることができるが、単一の遺伝子に由来する異なるmRNAアイソフォームは、その翻訳効率に大きくばらつきがあることがある。エクソン接合部複合体の少なくとも50bp上流に未成熟終止コドン（PTC）を有するそれらのmRNAアイソフォームは、ナンセンス変異依存mRNA分解機構（NMD）経路による分解の標的となる可能性が高い。伝統的な（BPS/PPT/3' splice site/5' splice site）及び補助的なスプライシングモチーフにおける変異は、異常なスプライシング、例えばエクソンスキッピング、又は潜在的（又は偽）エクソン包含若しくはスプライス部位活性化を引き起こし、ヒトの罹患率及び死亡率の重大な一因となることがある。異常なスプライシングパター

40

50

ンと選択的スプライシングパターンはいずれも、エクソン及びイントロンにおける天然の DNA バリエーションによって影響を及ぼされ得る。

【0096】

[117]エクソン-イントロン境界がコドンの3つの位置のいずれかで生じ得ることを考慮すると、選択的スプライシング事象のサブセットのみがカノニカルなオープンリーディングフレームを維持することができることは明らかである。例えば、3で割り切れるエクソンのみが、リーディングフレームの一切の変更なしに、スキップされるか、又は mRNA に包含されることができる。適合性のあるフェーズを有しないスプライシング事象は、フレームシフトを誘導し得る。下流の事象によって取り消されない限り、フレームシフトは確実に1つ又は複数の PTC をもたらし、おそらく NMD によるその後の分解を結果的にもたらすだろう。NMD は、PTC を含有する mRNA を除外する翻訳連動機構 (translation-coupled mechanism) である。NMD は、全ての真核生物に存在する監視経路として機能することができる。NMD は、未成熟停止コドンを含む mRNA 転写物を除外することによって、遺伝子発現における失敗を減らすことができる。これらの異常な mRNA の翻訳は、場合によっては、生じたタンパク質の有害な機能獲得型又はドミナントネガティブ活性をもたらす。NMD は、PTC を有する転写物だけでなく、多くの内在性の遺伝子から発現した幅広い mRNA アイソフォームも標的とし、このことは、NMD が細胞における定常状態の RNA レベルの微細な調整と大まかな調整の両方を駆動する主要制御因子であることを示唆する。

【0097】

[118]NMD 誘導エクソン (「NIE」又は「NMD エクソン」) は、エクソン、又はイントロン内の領域である偽エクソンであり、成熟 RNA 転写物に包含される場合、NMD 経路を活性化することができる。構成的スプライシング事象では、NMD エクソンを含むイントロンは通例切り出されるが、選択的又は異常なスプライシング事象の間には、イントロン又はその部分 (例えば NMD エクソン) は保持されることがある。そのような NMD エクソンを含む成熟 mRNA 転写物は、NMD 経路を誘導するフレームシフトのために、非生産的であり得る。成熟 RNA 転写物への NMD エクソンの包含は、遺伝子発現を下方制御し得る。NMD エクソンを含む mRNA 転写物は、本開示において、「NIE 含有 mRNA」又は「NMD エクソン mRNA」と称される場合がある。

【0098】

[119]潜在的 (又は偽スプライス部位) は、真のスプライス部位と同じスプライシング認識配列を有するが、スプライシング反応において使用されない。それらはヒトゲノムにおける真のスプライス部位よりも10倍多く、通常は、今のところ十分に理解されていない分子機構によって抑制される。潜在的5'スプライス部位は、コンセンサスな NNN / GUNNNN 又は NNN / GCNNNN を有し、ここで、N は任意のヌクレオチドであり、/N はエクソン-イントロン境界である。潜在的3'スプライス部位は、コンセンサスな NAG / N を有する。それらの活性化は、それらを本来のスプライス部位の最適なコンセンサス、すなわち、それぞれ、MAG / GURAGU 及び YAG / G により類似させる周囲のヌクレオチドによって正に影響を及ぼされ、ここで、M は C 又は A であり、R は G 又は A であり、Y は C 又は U である。

【0099】

[120]スプライス部位及びその制御配列は、当業者であれば、例えば Kralovicova, J. 及び Vorechovsky, I. (2007) Global control of aberrant splice site activation by auxiliary splicing sequences: evidence for a gradient in exon and intron definition. *Nucleic Acids Res.*, 35, 6399~6413 頁に列挙されている公的に利用可能な好適なアルゴリズムを使用して容易に同定することができる。

【0100】

[121]潜在的スプライス部位又はスプライシング制御配列は、U2AF 等の RNA 結合

10

20

30

40

50

タンパク質に関して、NMDエクソンのスプライス部位と競合し得る。一部の実施形態では、薬剤は、潜在的スプライス部位又はスプライシング制御配列に結合して、RNA結合タンパク質の結合を妨げ、それによりNMDエクソンスプライス部位へのRNA結合タンパク質の結合を有利にし得る。

【0101】

[122]一部の実施形態では、潜在的スプライス部位は、NMDエクソンの5'又は3'スプライス部位を含まない場合がある。一部の実施形態では、潜在的スプライス部位は、NMDエクソン5'スプライス部位の少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、又は少なくとも200ヌクレオチド上流であり得る。一部の実施形態では、潜在的スプライス部位は、NMDエクソン3'スプライス部位の少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも200ヌクレオチド下流であり得る。

10

標的転写物

[123]一部の実施形態では、本開示の方法及び組成物は、PHIP遺伝子から転写されたmRNA前駆体におけるNMDエクソンの存在を活用する。機能性成熟PHIP mRNAを産生する、同定されたPHIP NMDエクソンmRNA前駆体種のスプライシングは、NMDエクソンのエクソンスキッピングを刺激するASO等の薬剤を使用して誘導することができる。エクソンスキッピングの誘導は、NMD経路の阻害をもたらすことができる。生じた成熟PHIP mRNAは、通常はNMD経路を活性化させることなく翻訳され、それにより患者の細胞内でPHIPタンパク質の量を増加させ、PHIP欠損に関連する病態又は疾患、例えばChung-Janssen症候群(CHUJANS)、常染色体優性障害、知的障害、発話遅延、不安、自閉症スペクトラム障害(ASD)、注意欠陥多動性障害(ADHD)、攻撃行動、顔面異形、カフェオレ斑、PHIPハプロ不全によって引き起こされる過体重症候群、発達遅延、肥満、又は異形症の症状を軽減することができる。

20

【0102】

[124]一部の実施形態では、本明細書に開示される方法又は組成物を使用して処置又は改善することができる疾患又は病態は、治療剤が標的とする標的タンパク質(遺伝子)に直接的には関連しない。一部の実施形態では、本明細書で提供される治療剤は、疾患又は病態に直接的には関連しないタンパク質(遺伝子)を標的とし得るが、標的タンパク質(遺伝子)の発現の調節は、疾患又は病態を処置又は改善することができる。

30

【0103】

[125]様々な実施形態では、本開示は、PHIP mRNA前駆体転写物を標的として、スプライシング又はタンパク質発現レベルを調節することができる治療剤を提供する。治療剤は、低分子、ポリヌクレオチド、又はポリペプチドであり得る。一部の実施形態では、治療剤はASOである。PHIP mRNA前駆体の様々な領域又は配列が、治療剤、例えばASOによって標的化され得る。一部の実施形態では、ASOは、NMDエクソンを含有するPHIP mRNA前駆体転写物を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体転写物のNMDエクソン内の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体転写物のNMDエクソンの5'末端(3'ss)から上流(又は5'側)の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体転写物のNMDエクソンの3'末端(5'ss)から下流(又は3'側)の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体転写物のNMDエクソンの5'末端に隣り合うイントロン内の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体転写物のNMDエクソンの3'末端と隣り合うイントロン内の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体転写物のNMDエクソン-イントロン境界を含む配列を標的とする。NMDエクソン-イントロン境界は、イントロン配列とNMDエクソン領域との接合部を指す場合がある。イントロン配列は、NMDエクソンの5'末端又はNMDエクソンの

40

50

3'末端と隣り合っている。一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体転写物のエクソン内の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体転写物のイントロン内の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、イントロンの一部分とPHIP mRNA前駆体転写物のエクソンの一部分との両方を含む配列を標的とする。

【0104】

[126]一部の実施形態では、ASOは、NMDエクソンの5'末端から約4~約300ヌクレオチド上流(又は5'側)の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、NMDエクソン領域の5'末端から約1~約20ヌクレオチド、約20~約50ヌクレオチド、約50~約100ヌクレオチド、約100~約150ヌクレオチド、約150~約200ヌクレオチド、約200~約250ヌクレオチド、又は約250~約300ヌクレオチド上流(又は5'側)の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、NMDエクソンの5'末端から300ヌクレオチド超上流の配列を標的としてもよい。一部の実施形態では、ASOは、NMDエクソンの3'末端から約4~約300ヌクレオチド下流(又は3'側)の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、NMDエクソンの3'末端から約1~約20ヌクレオチド、約20~約50ヌクレオチド、約50~約100ヌクレオチド、約100~約150ヌクレオチド、約150~約200ヌクレオチド、約200~約250ヌクレオチド、又は約250~約300ヌクレオチド下流の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、NMDエクソンの3'末端から300ヌクレオチド超下流の配列を標的とする。

10

20

【0105】

[127]一部の実施形態では、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体転写物は、配列番号1に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる。一部の実施形態では、PHIP NMDエクソンmRNA前駆体転写物は、配列番号3に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。

【0106】

[128]一部の実施形態では、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体転写物(又はNMDエクソンmRNA)は、配列番号3に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体転写物(又はNMDエクソンmRNA)は、配列番号3に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性を有する配列によってコードされる。一部の実施形態では、NMDエクソンmRNAの標的化部分は、配列番号3の少なくとも8個の連続的な核酸を含む領域に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0107】

[129]一部の実施形態では、ASOは、NIEエクソン15を含むPHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体のNIEエクソン15(エクソン15x)を含むPHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体のエクソン15xを標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIPのエクソン(GRCh38/hg38:chr6:79004373~79004436)を標的とする。

40

【0108】

[130]一部の実施形態では、ASOは、PHIPのエクソン15xであるPHIPのエクソン15xの5'末端から約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド上流(又は5'側)の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PH

50

IPのGRCh38/hg38:chr6_79004373から約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド上流(又は5'側)の配列を標的とする。

【0109】

[131]一部の実施形態では、ASOは、PHIPのエクソン15xの5'末端から最大で約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド上流(又は5'側)の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIPのGRCh38/hg38:chr6_79004373から最大で約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド上流(又は5'側)の配列を標的とする。

【0110】

[132]一部の実施形態では、ASOは、PHIPのエクソン15xの3'末端から約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド下流(又は3'側)の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIPのGRCh38/hg38:chr6_79004436から約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド下流(又は3'側)の配列を標的とする。

【0111】

[133]一部の実施形態では、ASOは、PHIPのエクソン15xの3'末端から最大で約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド下流(又は3'側)の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIPのGRCh38/hg38:chr6_79004436から最大で約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド下流(又は3'側)の配列を標的とする。

【0112】

[134]一部の実施形態では、ASOは、配列番号3に記載のNMDエクソンmRNAの標的化部分に対して相補的な配列を有する。

【0113】

[135]一部の実施形態では、ASOは、NMDエクソンの5'末端から上流の配列を標的とする。例えば、NMDエクソン(例えば、PHIPのエクソン(GRCh38/hg38:chr6_79004373~79004436))の5'末端から上流の配列を標的とするASOは、配列番号3に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0114】

[136]一部の実施形態では、ASOは、エクソン-イントロン境界（又は接合部）を含有する配列を標的とする。例えば、エクソン-イントロン境界を含有する配列を標的とするASOは、配列番号3の少なくとも8個の連続的な核酸に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%相補的（complimentary）である配列を含むことができる。一部の実施形態では、ASOは、NMDエクソンの3'末端から下流の配列を標的とする。例えば、NMDエクソン（例えば、PHIPのエクソン15x）の3'末端から下流の配列を標的とするASOは、配列番号3、又は配列番号3の少なくとも8個の連続的な核酸に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むことができる。例えば、NMDエクソン（例えば、PHIPのエクソン（GRCh38/hg38:chr6_79004373~79004436））の3'末端から下流の配列を標的とするASOは、配列番号3、又は配列番号3の少なくとも8個の連続的な核酸に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むことができる。一部の実施形態では、ASOは、NMDエクソン内の配列を標的とする。

10

【0115】

[137]一部の実施形態では、ASOは、エクソン15を含むPHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体のエクソン15x、NIEエクソン16を含むPHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体のNIEエクソン15xを標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体のエクソン15xの5'末端から下流（又は3'側）の配列を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体のエクソン15xの3'末端から上流（又は5'側）の配列を標的とする。

20

【0116】

[138]一部の実施形態では、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分は、イントロン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、又は39にある。一部の実施形態では、NMDエクソンmRNA前駆体の標的化部分に対するASOのハイブリダイゼーションは、イントロン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、又は39内の少なくとも1個のNMDエクソンのエクソンスキッピングをもたらし、その後PHIPタンパク質産生を増加させる。一部の実施形態では、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分は、PHIPのイントロン15にある。一部の実施形態では、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分は、PHIPのイントロン（GRCh38/hg38:chr6_79003858~79015082）である。

30

【0117】

[139]一部の実施形態では、本開示の方法及び組成物は、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体の偽エクソンのエクソンスキッピングを誘導することによってPHIPの発現を増加させるために使用される。一部の実施形態では、偽エクソンは、イントロン1~39のいずれかの内部の配列である。一部の実施形態では、偽エクソンは、イントロン1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、又は39のいずれかの内部の配列である。一部の実施形態では、偽エクソンは、PHIPイントロン又はその一部分であり得る。一部の実施形態では、偽エクソンはPHIPのイントロン15内にある。一部の実施形態では、偽エクソンは、PHIPのイントロン（GRCh38/hg38:chr6_79003858_79015082）内にある。

40

【0118】

50

[140]一部の実施形態では、PHIP mRNA前駆体転写物は、配列番号1に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる。一部の実施形態では、PHIP mRNA前駆体転写物は、配列番号3に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。

【0119】

[141]一部の実施形態では、PHIP mRNA前駆体転写物（又はNMDエクソンmRNA）は、配列番号3に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、PHIP mRNA前駆体転写物（又はNMDエクソンmRNA）は、配列番号3に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性を有する配列によってコードされる。一部の実施形態では、PHIP mRNA前駆体の標的化部分は、配列番号3の少なくとも8個の連続的な核酸を含む領域に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0120】

[142]一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体のエクソン15を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体のエクソン（GRCh38/hg38:chr6:79015081-79015216）を標的とする。一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体のエクソン16を標的とし、ASOは、PHIP mRNA前駆体のエクソン（GRCh38/hg38:chr6:79003729-79003858）を標的とする。

20

【0121】

[143]一部の実施形態では、ASOは、配列番号3に記載のNMDエクソンmRNAの標的化部分に対して相補的な配列を有する。

タンパク質発現

[144]一部の実施形態では、本明細書に記載される方法は、機能性PHIPタンパク質又はRNAの産生を増加させるために使用される。本明細書で使用する場合、「機能性」という用語は、処置される病態又は疾患、例えば、Chung-Janssen症候群のいずれかが1つ以上の症状を除外するのに必要なPHIPタンパク質又はRNAの活性又は機能の量を指す。一部の実施形態では、方法は、部分的に機能性PHIPタンパク質又はRNAの産生を増加させるために使用される。本明細書で使用する場合、「部分的に機能性」という用語は、疾患又は病態のいずれかが1つ以上の症状を除外又は防止するのに必要な活性又は機能の量よりも少ない、PHIPタンパク質又はRNAの活性又は機能の任意の量を指す。一部の実施形態では、部分的に機能性タンパク質又はRNAは、完全機能性タンパク質又はRNAと比べて少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%低い活性を有し得る。

30

【0122】

[145]一部の実施形態では、方法は、PHIP mRNA前駆体を有する対象の細胞によるPHIPタンパク質の発現を増加させる方法であり、対象は、PHIPタンパク質の活性の欠損量によって引き起こされた疾患又は病態、例えば、Chung-Janssen症候群を有し、PHIPタンパク質の欠損量は、PHIPタンパク質のハプロ不全によって引き起こされる。そのような実施形態では、対象は、機能性PHIPタンパク質をコードする第1のアレル、及びPHIPタンパク質が産生されない第2のアレルを有する。別のそのような実施形態では、対象は、機能性PHIPタンパク質をコードする第1のアレル、及び非機能性PHIPタンパク質をコードする第2のアレルを有する。別のそのような実施形態では、対象は、機能性PHIPタンパク質をコードする第1のアレル、及び部分的に機能性PHIPタンパク質をコードする第2のアレルを有する。これらの実施形態

40

50

のいずれかにおいて、アンチセンスオリゴマーは、第2のアレルから転写されたPHIP mRNA前駆体の標的化部分に結合し、それによりmRNA前駆体からの偽エクソンのエクソスキッピングを誘導し、機能性PHIPタンパク質をコードする成熟mRNAのレベルの増加、及び対象の細胞におけるPHIPタンパク質の発現の増加を引き起こす。

【0123】

[146]一部の実施形態では、方法は、PHIP mRNA前駆体を有する対象の細胞によるPHIPタンパク質の発現を増加させる方法であり、対象は、PHIPタンパク質の活性の欠損量によって引き起こされた疾患又は病態を有し、PHIPタンパク質の欠損量は、常染色体劣性遺伝によって引き起こされる。

【0124】

[147]一部の実施形態では、方法は、PHIP mRNA前駆体を有する対象の細胞によるPHIPタンパク質の発現を増加させる方法であり、対象は、PHIPタンパク質の活性の欠損量によって引き起こされた疾患又は病態、例えば、Chung - Jansen症候群を有し、PHIPタンパク質の欠損量は、常染色体優性遺伝によって引き起こされる。

【0125】

[148]関連する実施形態では、方法は、ASOを使用して、タンパク質又は機能性RNAの発現を増加させる方法である。一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体を有する対象の細胞内でPHIPタンパク質の発現を増加させるために使用することができ、対象は、PHIPタンパク質の量又は機能における欠損、例えば、Chung - Jansen症候群を有する。

【0126】

[149]一部の実施形態では、疾患又は病態の原因となるタンパク質をコードするmRNA前駆体転写物は、本明細書に記載される薬剤、例えばオリゴヌクレオチドによって標的とされる。場合によっては、それは、本明細書に記載される薬剤、例えばオリゴヌクレオチドによって標的とされるNMDエクソン含有mRNA前駆体転写物である。一部の実施形態では、疾患の原因とならないタンパク質をコードするNMDエクソン含有mRNA前駆体転写物は、ASOによって標的とされる。例えば、特定の経路における第1のタンパク質の変異又は欠損の結果である疾患は、第2のタンパク質をコードするmRNA前駆体を標的とし、それにより第2のタンパク質の産生を増加させることによって改善し得る。一部の実施形態では、第2のタンパク質の機能は、第1のタンパク質の変異又は欠損（これは疾患又は病態の原因となる）を補償することができる。

【0127】

[150]一部の実施形態では、対象は、(a)(i)PHIPタンパク質が、野生型アレルからの産生と比較して低減したレベルで産生される、(ii)PHIPタンパク質が、同等の野生型タンパク質と比較して低減した機能を有する形態で産生される、又は(iii)PHIPタンパク質若しくは機能性RNAが産生されない、第1の変異アレル、及び(b)(i)PHIPタンパク質が、野生型アレルからの産生と比較して低減したレベルで産生される、(ii)PHIPタンパク質が、同等の野生型タンパク質と比較して低減した機能を有する形態で産生される、又は(iii)PHIPタンパク質が産生されない、第2の変異アレルを有し、NMDエクソン含有mRNA前駆体は、第1のアレル及び/又は第2のアレルから転写される。これらの実施形態では、ASOは、第1のアレル又は第2のアレルから転写されたNMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分に結合し、それによりNMDエクソン含有mRNA前駆体からの偽エクソンのエクソスキッピングを誘導し、PHIPタンパク質をコードするmRNAのレベルの増加、及び対象の細胞内で標的タンパク質又は機能性RNAの発現の増加を引き起こす。これらの実施形態では、NMDエクソン含有mRNA前駆体からの偽エクソンのエクソスキッピングの結果として生じる発現レベルの増加を有する標的タンパク質又は機能性RNAは、同等の野生型タンパク質と比較して低減した機能（部分的に機能性）を有するか、又は同等の野生型タンパク質と比較して完全な機能（完全機能性）を有する形態であり得る。

10

20

30

40

50

【0128】

【151】一部の実施形態では、PHIPタンパク質をコードするmRNAのレベルは、対照細胞、例えば、アンチセンスオリゴマーを用いて処理されない細胞、又はPHIP mRNA前駆体の標的化部分に結合しないアンチセンスオリゴマーを用いて処理される細胞において産生されるPHIPタンパク質をコードするmRNAの量と比較した場合、1.1～10倍増加する。

【0129】

【152】一部の実施形態では、本開示の方法を使用して処置される対象は、1つのアレルから部分的に機能性PHIPタンパク質を発現し、部分的に機能性PHIPタンパク質は、フレームシフト変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異、又は部分的遺伝子欠失によって引き起こされ得る。一部の実施形態では、本開示の方法を使用して処置される対象は、1つのアレルから非機能性PHIPタンパク質を発現し、非機能性PHIPタンパク質は、1つのアレルにおけるフレームシフト変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異、部分的遺伝子欠失によって引き起こされ得る。一部の実施形態では、本開示の方法を使用して処置される対象は、1つのアレルにおけるPHIP全遺伝子欠失を有する。

エクソン包含

【153】本明細書で使用する場合、「NMDエクソン含有mRNA前駆体」は、少なくとも1個の偽エクソンを含有するmRNA前駆体転写物である。選択的又は異常なスプライシングは、成熟mRNA転写物への少なくとも1個の偽エクソンの包含をもたらすことができる。「成熟mRNA」及び「完全スプライスマRNA」という用語は、本明細書では交換可能に使用されて、完全にプロセシングされたmRNAを表す。少なくとも1個の偽エクソンの包含は、非生産的mRNAとなり、成熟mRNAのNMDをもたらし得る。NMDエクソン含有成熟mRNAは、時折異常なタンパク質発現をもたらす場合がある。

【0130】

【154】一部の実施形態では、包含偽エクソン(included pseudo-exon)は、細胞内で標的タンパク質をコードする遺伝子から転写されたNMDエクソン含有mRNA前駆体の集団において最も大量に存在する偽エクソンである。一部の実施形態では、包含偽エクソンは、細胞内で標的タンパク質をコードする遺伝子から転写されたNMDエクソン含有mRNA前駆体の集団において最も大量に存在する偽エクソンであり、NMDエクソン含有mRNA前駆体の集団は、2個以上の包含偽エクソンを含む。一部の実施形態では、標的タンパク質をコードするNMDエクソン含有mRNA前駆体の集団において最も大量に存在する偽エクソンを標的にするアンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴマーが標的にするか又は結合する偽エクソンを含む、集団における1個又は2個以上の偽エクソンのエクソンスキッピングを誘導する。一部の実施形態では、標的化領域は、PHIPタンパク質をコードするNMDエクソン含有mRNA前駆体において最も大量に存在する偽エクソンである偽エクソンにある。

【0131】

【155】エクソン包含の程度は、エクソン包含率、例えば、所与の偽エクソンが包含されている転写物の百分率として表現することができる。簡潔に述べれば、エクソン包含%は、エクソン包含を有するRNA転写物の量の、エクソン包含を有するRNA転写物の量の平均とエクソン排除を有するRNA転写物の量の平均との合計に対する百分率として算出することができる。

【0132】

【156】一部の実施形態では、包含偽エクソンは、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、又は少なくとも約50%の包含率という決定に基づいて、包含偽エクソンとして同定されるエクソンである。実施形態では、包含偽エクソンは、約5%～約100%、約5%～約95%、約5%～約90%、約5%～約85%、約5%～約80%、約5%～約75%、約5%～約70%、約5%～約65%、約5%～約60%、約5%～約55%、約5%～約50%、約5%

~ 約 4 5 %、約 5 % ~ 約 4 0 %、約 5 % ~ 約 3 5 %、約 5 % ~ 約 3 0 %、約 5 % ~ 約 2 5
 %、約 5 % ~ 約 2 0 %、約 5 % ~ 約 1 5 %、約 1 0 % ~ 約 1 0 0 %、約 1 0 % ~ 約 9 5 %
 、約 1 0 % ~ 約 9 0 %、約 1 0 % ~ 約 8 5 %、約 1 0 % ~ 約 8 0 %、約 1 0 % ~ 約 7 5 %
 、約 1 0 % ~ 約 7 0 %、約 1 0 % ~ 約 6 5 %、約 1 0 % ~ 約 6 0 %、約 1 0 % ~ 約 5 5 %
 、約 1 0 % ~ 約 5 0 %、約 1 0 % ~ 約 4 5 %、約 1 0 % ~ 約 4 0 %、約 1 0 % ~ 約 3 5 %
 、約 1 0 % ~ 約 3 0 %、約 1 0 % ~ 約 2 5 %、約 1 0 % ~ 約 2 0 %、約 1 5 % ~ 約 1 0 0
 %、約 1 5 % ~ 約 9 5 %、約 1 5 % ~ 約 9 0 %、約 1 5 % ~ 約 8 5 %、約 1 5 % ~ 約 8 0
 %、約 1 5 % ~ 約 7 5 %、約 1 5 % ~ 約 7 0 %、約 1 5 % ~ 約 6 5 %、約 1 5 % ~ 約 6 0
 %、約 1 5 % ~ 約 5 5 %、約 1 5 % ~ 約 5 0 %、約 1 5 % ~ 約 4 5 %、約 1 5 % ~ 約 4 0
 %、約 1 5 % ~ 約 3 5 %、約 1 5 % ~ 約 3 0 %、約 1 5 % ~ 約 2 5 %、約 2 0 % ~ 約 1 0
 0 %、約 2 0 % ~ 約 9 5 %、約 2 0 % ~ 約 9 0 %、約 2 0 % ~ 約 8 5 %、約 2 0 % ~ 約 8
 0 %、約 2 0 % ~ 約 7 5 %、約 2 0 % ~ 約 7 0 %、約 2 0 % ~ 約 6 5 %、約 2 0 % ~ 約 6
 0 %、約 2 0 % ~ 約 5 5 %、約 2 0 % ~ 約 5 0 %、約 2 0 % ~ 約 4 5 %、約 2 0 % ~ 約 4
 0 %、約 2 0 % ~ 約 3 5 %、約 2 0 % ~ 約 3 0 %、約 2 5 % ~ 約 1 0 0 %、約 2 5 % ~ 約
 9 5 %、約 2 5 % ~ 約 9 0 %、約 2 5 % ~ 約 8 5 %、約 2 5 % ~ 約 8 0 %、約 2 5 % ~ 約
 7 5 %、約 2 5 % ~ 約 7 0 %、約 2 5 % ~ 約 6 5 %、約 2 5 % ~ 約 6 0 %、約 2 5 % ~ 約
 5 5 %、約 2 5 % ~ 約 5 0 %、約 2 5 % ~ 約 4 5 %、約 2 5 % ~ 約 4 0 %、又は約 2 5 %
 ~ 約 3 5 % の包含率という決定に基づいて、包含偽エクソンとして同定されるエクソンで
 ある。ENCODER データ (例えば、Tilgnerら、2012、「Deep sequencing of subcellular RNA fractions sho
 ws splicing to be predominantly co-trans
 criptional in the human genome but ineff
 icient for lncRNAs」、Genome Research 22(9
): 1616 ~ 25 頁に記載されている) は、エクソン包含の同定を補佐するために使用
 することができる。

10

20

【0133】

[157] 一部の実施形態では、細胞を、PHIP mRNA 前駆体転写物の標的化部分に
 対して相補的である ASO と接触させることは、ASO の非存在 / 処理の非存在下におけ
 る細胞によって産生されるタンパク質の量と比較して、少なくとも 10、20、30、4
 0、50、60、80、100、150、200、250、300、350、400、4
 50、500、又は 1000 % の、産生される PHIP タンパク質の量の増加をもたらす
 。一部の実施形態では、アンチセンスオリゴマーを接触させた細胞によって産生される P
 HIP タンパク質の総量は、対照化合物によって産生される標的タンパク質の量と比較し
 て、約 20 % ~ 約 300 %、約 50 % ~ 約 300 %、約 100 % ~ 約 300 %、約 150
 % ~ 約 300 %、約 20 % ~ 約 50 %、約 20 % ~ 約 100 %、約 20 % ~ 約 150 %、
 約 20 % ~ 約 200 %、約 20 % ~ 約 250 %、約 50 % ~ 約 100 %、約 50 % ~ 約 1
 50 %、約 50 % ~ 約 200 %、約 50 % ~ 約 250 %、約 100 % ~ 約 150 %、約 1
 00 % ~ 約 200 %、約 100 % ~ 約 250 %、約 150 % ~ 約 200 %、約 150 % ~
 約 250 %、約 200 % ~ 約 250 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少な
 くとも約 50 %、少なくとも約 100 %、少なくとも約 150 %、少なくとも約 200 %
 、少なくとも約 250 %、又は少なくとも約 300 % 増加する。一部の実施形態では、ア
 ンチセンスオリゴマーを接触させた細胞によって産生される PHIP タンパク質の総量は
 、対照化合物によって産生される標的タンパク質の量と比較して、約 1.1 ~ 約 10 倍、
 約 1.5 ~ 約 10 倍、約 2 ~ 約 10 倍、約 3 ~ 約 10 倍、約 4 ~ 約 10 倍、約 1.1 ~ 約
 5 倍、約 1.1 ~ 約 6 倍、約 1.1 ~ 約 7 倍、約 1.1 ~ 約 8 倍、約 1.1 ~ 約 9 倍、約
 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍
 、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 約
 9 倍、少なくとも約 1.1 倍、少なくとも約 1.5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約
 2.5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3.5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約
 5 倍、又は少なくとも約 10 倍増加する。対照化合物は、例えば、mRNA 前駆体の標的

30

40

50

化部分に対して相補的でないオリゴヌクレオチドであり得る。

【0134】

[158]一部の実施形態では、細胞を、PHIP mRNA前駆体転写物の標的化部分に対して相補的であるASOと接触させることは、標的タンパク質をコードする成熟mRNAを含むPHIPをコードするmRNAの量の増加をもたらす。一部の実施形態では、PHIPタンパク質をコードするmRNA、又はPHIPタンパク質をコードする成熟mRNAの量は、ASOの非存在/処理の非存在下における細胞によって産生されるタンパク質の量と比較して、少なくとも10、20、30、40、50、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、500、又は1000%増加する。一部の実施形態では、PHIPタンパク質をコードするmRNA、又はアンチセンスオリゴマーを接触させた細胞において産生されるPHIPタンパク質をコードする成熟mRNAの総量は、未処理細胞、例えば、未処理細胞又は対照化合物を用いて処理された細胞において産生される成熟RNAの量と比較して、約20%~約300%、約50%~約300%、約100%~約300%、約150%~約300%、約20%~約50%、約20%~約100%、約20%~約150%、約20%~約200%、約20%~約250%、約50%~約100%、約50%~約150%、約50%~約200%、約50%~約250%、約100%~約150%、約100%~約200%、約100%~約250%、約150%~約200%、約150%~約250%、約200%~約250%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約50%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、又は少なくとも約300%増加する。一部の実施形態では、PHIPタンパク質をコードするmRNA、又はアンチセンスオリゴマーを接触させた細胞において産生されるPHIPタンパク質をコードする成熟mRNAの総量は、未処理細胞、例えば、未処理細胞又は対照化合物を用いて処理された細胞において産生される成熟RNAの量と比較して、約1.1~約10倍、約1.5~約10倍、約2~約10倍、約3~約10倍、約4~約10倍、約1.1~約5倍、約1.1~約6倍、約1.1~約7倍、約1.1~約8倍、約1.1~約9倍、約2~約5倍、約2~約6倍、約2~約7倍、約2~約8倍、約2~約9倍、約3~約6倍、約3~約7倍、約3~約8倍、約3~約9倍、約4~約7倍、約4~約8倍、約4~約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、又は少なくとも約10倍増加する。対照化合物は、例えば、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分に対して相補的でないオリゴヌクレオチドであり得る。

【0135】

[159]NMDエクソンは任意の長さであり得る。一部の実施形態では、NMDエクソンはイントロンの完全な配列を含み、その場合、それはイントロン保持と称することができる。一部の実施形態では、NMDエクソンはイントロンの一部分であり得る。一部の実施形態では、NMDエクソンは、5'ss配列を含むイントロンの5'末端部分であり得る。一部の実施形態では、NMDエクソンは、3'ss配列を含むイントロンの3'末端部分であり得る。一部の実施形態では、NMDエクソンは、5'ss配列の包含を伴わないイントロン内の一部分であり得る。一部の実施形態では、NMDエクソンは、3'ss配列の包含を伴わないイントロン内の一部分であり得る。一部の実施形態では、NMDエクソンは、5'ss又は3'ss配列のいずれかの包含も伴わないイントロン内の一部分であり得る。一部の実施形態では、NMDエクソンは、5ヌクレオチド~10ヌクレオチド長、10ヌクレオチド~15ヌクレオチド長、15ヌクレオチド~20ヌクレオチド長、20ヌクレオチド~25ヌクレオチド長、25ヌクレオチド~30ヌクレオチド長、30ヌクレオチド~35ヌクレオチド長、35ヌクレオチド~40ヌクレオチド長、40ヌクレオチド~45ヌクレオチド長、45ヌクレオチド~50ヌクレオチド長、50ヌクレオチド~55ヌクレオチド長、55ヌクレオチド~60ヌクレオチド長、60ヌクレオチド~65ヌクレオチド長、65ヌクレオチド~70ヌクレオチド長、70ヌクレオチド~75ヌク

レオチド長、75ヌクレオチド～80ヌクレオチド長、80ヌクレオチド～85ヌクレオチド長、85ヌクレオチド～90ヌクレオチド長、90ヌクレオチド～95ヌクレオチド長、又は95ヌクレオチド～100ヌクレオチド長であり得る。一部の実施形態では、NMDエクソンは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド長、少なくとも90ヌクレオチド、又は少なくとも100ヌクレオチド長であり得る。一部の実施形態では、NMDエクソンは、100～200ヌクレオチド長、200～300ヌクレオチド長、300～400ヌクレオチド長、400～500ヌクレオチド長、500～600ヌクレオチド長、600～700ヌクレオチド長、700～800ヌクレオチド長、800～900ヌクレオチド長、900～1,000ヌクレオチド長であり得る。一部の実施形態では、NMDエクソンは1,000ヌクレオチド長より長くてもよい。

【0136】

[160]偽エクソンの包含は、フレームシフト、及び成熟mRNA転写物への未成熟終止コドン(PIC)の導入をもたらす、転写物をNMDの標的にし得る。NMDエクソンを含有する成熟mRNA転写物は、タンパク質発現をもたらさない非生産的mRNA転写物であり得る。PICは、NMDエクソンの下流の任意の位置に存在することができる。一部の実施形態では、PICは、NMDエクソンの下流の任意のエクソンに存在することができる。一部の実施形態では、PICは、NMDエクソン内に存在することができる。例えば、PHIP遺伝子によってコードされるmRNA転写物へのPHIPのエクソン15xの包含は、PICをmRNA転写物に誘導し得る。例えば、PHIPによってコードされるmRNA転写物へのPHIPのエクソン(GRCh38/hg38:chr6:79004373～79004436)の包含。

治療剤

[161]本開示の様々な実施形態では、PHIPのタンパク質発現レベルを調節する治療剤を含む組成物及び方法が提供される。一部の実施形態では、PHIP mRNA前駆体の選択的スプライシングを調節する組成物及び方法が本明細書で提供される。一部の実施形態では、PHIP mRNA前駆体のスプライシングにおいてエクソンスキッピングを誘導する、例えば、PHIP mRNA前駆体のスプライシングの間に偽エクソンのスキッピングを誘導する組成物及び方法が本明細書で提供される。他の実施形態では、治療剤は、エクソンの包含を誘導してタンパク質発現レベルを減少させるために使用してもよい。

【0137】

[162]本明細書に開示される治療剤は、NIE抑制剤であり得る。治療剤はポリ核酸ポリマーを含んでもよい。

【0138】

[163]本開示の一態様によれば、機能性PHIPタンパク質欠損に関連する病態又は疾患を処置又は防止する方法であって、NIE抑制剤を対象に投与して機能性PHIPタンパク質のレベルを増加させることを含み、薬剤が、mRNA前駆体転写物の領域に結合して成熟転写物へのNMDエクソンの包含を減少させる、前記方法が本明細書で提供される。例えば、機能性PHIPタンパク質欠損に関連する病態を処置又は防止する方法であって、NIE抑制剤を対象に投与して機能性PHIPタンパク質のレベルを増加させることを含み、薬剤が、mRNA前駆体転写物のNMDエクソン(例えば、PHIPのエクソン15x)を含有するイントロンの領域、又は同じイントロンにおけるNMDエクソン活性化制御配列に結合する、前記方法が本明細書で提供される。例えば、機能性PHIPタンパク質欠損に関連する病態を処置又は防止する方法であって、NIE抑制剤を対象に投与して機能性PHIPタンパク質のレベルを増加させることを含み、薬剤が、mRNA前駆体転写物のNMDエクソンを含有するイントロン(例えば、PHIPのエクソン(GRCh38/hg38:chr6:79004373～79004436))の領域、又は同じイントロンにおけるNMDエクソン活性化制御配列に結合する、前記方法が本明細書で

提供される。

【0139】

[164]成熟 mRNA への NMD エクソン 包含を低減させることについて言及する場合、低減は、完全、例えば 100% であっても、部分的であってもよい。低減は臨床的に有意であってもよい。低減 / 是正は、処置を有しない対象における NMD エクソン 包含のレベルと比べたものであっても、同様の対象の集団における NMD エクソン 包含の量と比べたものであってもよい。低減 / 是正は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 10% 少ない NMD エクソン 包含であり得る。低減は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 20% 少ない NMD エクソン 包含であり得る。低減は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 40% 少ない NMD エクソン 包含であり得る。低減は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 50% 少ない NMD エクソン 包含であり得る。低減は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 60% 少ない NMD エクソン 包含であり得る。低減は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 80% 少ない NMD エクソン 包含であり得る。低減は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 90% 少ない NMD エクソン 包含であり得る。

10

【0140】

[165]活性 PHIP タンパク質レベルを増加させることについて言及する場合、増加は臨床的に有意であってもよい。増加は、処置を有しない対象における活性 PHIP タンパク質のレベルと比べたものであっても、同様の対象の集団における活性 PHIP タンパク質の量と比べたものであってもよい。増加は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 10% 多い活性 PHIP タンパク質であり得る。増加は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 20% 多い活性 PHIP タンパク質であり得る。増加は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 40% 多い活性 PHIP タンパク質であり得る。増加は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 50% 多い活性 PHIP タンパク質であり得る。増加は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 80% 多い活性 PHIP タンパク質であり得る。増加は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 100% 多い活性 PHIP タンパク質であり得る。増加は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 200% 多い活性 PHIP タンパク質であり得る。増加は、平均的な対象、又は処置前の対象と比べて少なくとも 500% 多い活性 PHIP タンパク質であり得る。

20

30

【0141】

[166]NIE 抑制剤がポリ核酸ポリマーを含む実施形態では、ポリ核酸ポリマーは約 50 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 45 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 40 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 35 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 30 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 24 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 25 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 20 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 19 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 18 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 17 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 16 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 15 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 14 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 13 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 12 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 11 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 10 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 10 ~ 約 50 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 10 ~ 約 45 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 10 ~ 約 40 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 10 ~ 約 35 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 10 ~ 約 30 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 10 ~ 約 25 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 10 ~ 約 20 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 15 ~ 約 25 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 15 ~ 約 30 ヌクレオチド長であり得る。ポリ核酸ポリマーは約 12 ~ 約 30 ヌクレオチド長であり得る。

40

50

チド長であり得る。

【0142】

[167]ポリ核酸ポリマーの配列は、mRNA転写物、例えば部分的にプロセシングされたmRNA転写物の標的配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は99.5%相補的であり得る。ポリ核酸ポリマーの配列は、mRNA前駆体転写物の標的配列に対して100%相補的であってもよい。

【0143】

[168]ポリ核酸ポリマーの配列は、mRNA前駆体転写物の標的配列に対して4つ以下のミスマッチを有してもよい。ポリ核酸ポリマーの配列は、mRNA前駆体転写物の標的配列に対して3つ以下のミスマッチを有してもよい。ポリ核酸ポリマーの配列は、mRNA前駆体転写物の標的配列に対して2つ以下のミスマッチを有してもよい。ポリ核酸ポリマーの配列は、mRNA前駆体転写物の標的配列に対して1つ以下のミスマッチを有してもよい。ポリ核酸ポリマーの配列は、mRNA前駆体転写物の標的配列に対してミスマッチを有しなくてもよい。

10

【0144】

[169]ポリ核酸ポリマーは、mRNA前駆体転写物の標的配列に特異的にハイブリダイズし得る。例えば、ポリ核酸ポリマーは、mRNA前駆体転写物の標的配列に対して91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、又は100%の配列相補性を有し得る。ハイブリダイゼーションは、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で行われ得る。

20

【0145】

[170]ポリ核酸ポリマーは、配列番号2～5から成る群より選択される配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は99.5%の配列同一性を有する配列を含む。ポリ核酸ポリマーは、配列番号3に対して100%の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0146】

[171]ポリ核酸ポリマー配列について言及する場合、当業者は、1つ以上の置換が許容されてもよく、任意選択で2つの置換が配列において許容されてもよく、置換は、ポリ核酸ポリマー配列が、標的配列にハイブリダイズする能力、又は、置換が標的配列にある場合は、標的配列として認識される能力を維持するようなものであることを理解するだろう。配列同一性の基準は、標準/初期パラメーターを使用するBLAST配列アラインメントによって決定してもよい。例えば、配列は、99%の同一性を有し、なおも本開示に従って機能することができる。他の実施形態では、配列は、98%の同一性を有し、なおも本開示に従って機能することができる。別の実施形態では、配列は、95%の同一性を有し、なおも本開示に従って機能することができる。別の実施形態では、配列は、90%の同一性を有し、なおも本開示に従って機能することができる。

30

アンチセンスオリゴマー

[172]PHIP mRNA前駆体、例えば、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分に結合することによってエクソスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴマーを含む組成物が本明細書で提供される。本明細書で使用する場合、「ASO」及び「アンチセンスオリゴマー」という用語は、交換可能に使用され、ワトソン・クリック塩基対形成又はゆらぎ塩基対形成(G-U)によって標的核酸(例えば、PHIP mRNA前駆体、例えば、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体)配列にハイブリダイズする核酸塩基を含むポリヌクレオチド等のオリゴマーを指す。ASOは、標的配列に対して相補的な厳密な配列又は非常に高い相補性(near complementarity)(例えば、標的配列に結合するのに十分で、スプライス部位でのスプライシングを増強する相補性)を有し得る。ASOは、標的核酸(例えば、mRNA前駆体転写物の標的化部分)に結合(ハイブリダイズ)し、生理的条件下でハイブリダイズしたままでいるように設計さ

40

50

れる。典型的には、ASOは、意図された（標的化）核酸配列以外の部位にハイブリダイズする場合、限られた数の、標的核酸ではない配列（標的核酸以外の少数の部位）にハイブリダイズする。ASOの設計は、ASOが他の部位に結合し、「オフターゲット」効果を引き起こす可能性が限定されるように、ゲノム又は細胞のmRNA前駆体若しくはトランスクリプトーム中の他の場所における、mRNA前駆体転写物の標的化部分の核酸配列又は十分に類似した核酸配列の存在を考慮に入れることができる。当技術分野で公知の（例えば、本明細書に援用される、「Reducing Nonsense-Mediated mRNA Decay」という名称の、WO2015/035091として公開されているPCT/US2014/054151における）任意のアンチセンスオリゴマーは、本明細書に記載される方法を実施するために使用することができる。

10

【0147】

[173]一部の実施形態では、ASOは、標的核酸又はPHIP mRNA前駆体、例えば、NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分に「特異的にハイブリダイズする」又は「特異的」である。典型的には、そのようなハイブリダイゼーションは、37より実質的に高い、好ましくは少なくとも50、典型的には60～およそ90のT_mで行われる。そのようなハイブリダイゼーションは、好ましくは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件に相当する。所与のイオン強度及びpHで、T_mは、標的配列の50%が相補的なオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする温度である。

【0148】

[174]オリゴマー、例えばオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションが2本の1本鎖ポリヌクレオチド間で、逆平行配置で行われる場合、互いに「相補的」である。2本鎖ポリヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションが第1のポリヌクレオチドの鎖の一方と第2のポリヌクレオチドとの間で行われ得る場合、別のポリヌクレオチドに対して「相補的」であり得る。相補性（1本のポリヌクレオチドが別のポリヌクレオチドと相補的である程度）は、一般に許容される塩基対形成則に従って、互いに水素結合を形成することが予期される対向する鎖における塩基の割合（例えば、百分率）の点から定量化可能である。アンチセンスオリゴマー（ASO）の配列は、ハイブリダイズする標的核酸の配列に対して100%相補的である必要はない。ある特定の実施形態では、ASOは、標的にする標的核酸配列内の標的領域に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列相補性を含むことができる。例えば、オリゴマー化合物の20個の核酸塩基のうち18個が標的領域に対して相補的である、したがって特異的にハイブリダイズし得るASOであれば、90%の相補性を表す。この例において、残りの非相補的な核酸塩基は、一緒にクラスター形成していても相補的な核酸塩基が間に散在していてもよく、互いに対しても相補的な核酸塩基に対しても連続的である必要はない。標的核酸の領域とのASOの相補%は、当技術分野で公知のBLASTプログラム（基本的局所アラインメント検索ツール）及びPowerBLASTプログラム（Altschulら、J. Mol. Biol.、1990、215、403～410ページ、Zhang及びMadden、Genome Res.、1997、7、649～656頁）を使用して慣例的に決定することができる。

20

30

40

【0149】

[175]ASOは標的配列における全ての核酸塩基にハイブリダイズする必要はなく、ASOがハイブリダイズする核酸塩基は連続的であっても非連続的であってもよい。ASOは、介在又は隣接するセグメントがハイブリダイゼーション事象（例えば、ループ構造又はヘアピン構造が形成され得る）に関与しないように、mRNA前駆体転写物の1つ以上のセグメントにわたってハイブリダイズしてもよい。ある特定の実施形態では、ASOは、標的mRNA前駆体転写物における非連続的な核酸塩基にハイブリダイズする。例えば、ASOは、ASOがハイブリダイズしない1個以上の核酸塩基によって分離している、mRNA前駆体転写物における核酸塩基にハイブリダイズすることができる。

【0150】

50

[176]本明細書に記載されるASOは、PHIP mRNA前駆体、例えば、NMDエクスオン含有mRNA前駆体の標的部分に存在する核酸塩基に対して相補的である核酸塩基を含む。ASOという用語には、オリゴヌクレオチド、及び標的mRNAの相補的な核酸塩基にハイブリダイズすることができる核酸塩基を含むが、糖部分、例えばペプチド核酸(PNA)を含まない任意の他のオリゴマー分子が含まれる。ASOは、天然に存在するヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、修飾ヌクレオチド、又は先行するものの2つ若しくは3つの任意の組合せを含んでもよい。「天然に存在するヌクレオチド」という用語には、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドが含まれる。「修飾ヌクレオチド」という用語には、修飾若しくは置換糖基を有する、及び/又は修飾骨格を有するヌクレオチドが含まれる。一部の実施形態では、ASOの全てのヌクレオチドは修飾ヌクレオチドである。本明細書に記載される方法及び組成物と適合性があるASO又はASOの成分の化学修飾は、当業者に明白であり得、例えば、その全体が本明細書に援用される、米国特許第8,258,109B2号、米国特許第5,656,612号、米国特許公開第2012/0190728号、並びにDias及びStein、Mol. Cancer Ther. 2002、347~355頁に見出され得る。

10

【0151】

[177]ASOの1個以上の核酸塩基は、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、及びウラシル等の任意の天然に存在する非修飾核酸塩基であっても、標的mRNA前駆体に存在する核酸塩基と水素結合することができるほど十分に非修飾核酸塩基に類似した任意の合成若しくは修飾核酸塩基であってもよい。修飾核酸塩基の例としては、限定されないが、ヒポキサンチン、キサンチン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、及び5-ヒドロキシメチルシトシン(hydroxymethylcytosine)が挙げられる。

20

【0152】

[178]本明細書に記載されるASOはまた、オリゴマーの成分を接続する骨格構造も含む。「骨格構造」及び「オリゴマー連結」という用語は、交換可能に使用することができる、ASOのモノマー間の接続を指す。天然に存在するオリゴヌクレオチドにおいて、骨格は、オリゴマーの糖部分を接続する3'-5'ホスホジエステル連結を含む。本明細書に記載されるASOの骨格構造又はオリゴマー連結としては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニラデート、及びホスホロアミデート等が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Laplancher、Nucleic Acids Res. 14:9081ページ(1986); Stec、J. Am. Chem. Soc. 106:6077ページ(1984)、Stein、Nucleic Acids Res. 16:3209ページ(1988)、Zon、Anti-Cancer Drug Design 6:539ページ(1991); Zon、Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach、87~108頁(F. Eckstein編、Oxford University Press、Oxford England(1991)); Stec、米国特許第5,151,510号; Uhlmann及びPeyman、Chemical Reviews 90:543(1990)を参照のこと。一部の実施形態では、ASOの骨格構造は、リンを含有せず、むしろ、例えば、ペプチド核酸(PNA)、又はカルバメート、アミド、並びに直鎖状及び環式炭化水素基が挙げられる連結基にペプチド結合を含有する。一部の実施形態では、骨格修飾はホスホロチオエート連結である。一部の実施形態では、骨格修飾はホスホロアミデート連結である。

30

40

【0153】

[179]一部の実施形態では、ASO骨格のリンヌクレオチド間連結(phosphorus internucleotide linkage)の各々における立体化学はランダムである。一部の実施形態では、ASO骨格のリンヌクレオチド間連結の各々における立体化学は統御されており、ランダムではない。例えば、参照によって本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2

50

014/0194610号、「Methods for the Synthesis of Functionalized Nucleic Acids」は、核酸オリゴマー中の各リン原子におけるキラリティーの掌性を独立して選択するための方法を記載している。一部の実施形態では、本明細書で表5及び6に記載される任意のASOが挙げられるがこれらに限定されない、本開示の方法において使用されるASOは、ランダムではないリンヌクレオチド間連結を有するASOを含む。一部の実施形態では、本開示の方法において使用される組成物は、純粋なジアステレオマーのASOを含む。一部の実施形態では、本開示の方法において使用される組成物は、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、約100%、約90%～約100%、約91%～約100%、約92%～約100%、約93%～約100%、約94%～約100%、約95%～約100%、約96%～約100%、約97%～約100%、約98%～約100%、又は約99%～約100%のジアステレオマー純度を有するASOを含む。

【0154】

[180]一部の実施形態では、ASOは、そのリンヌクレオチド間連結においてRp及びSp配置のランダムではない混合物を有する。例えば、Rp及びSpの混合は、アンチセンスオリゴヌクレオチドにおいて、良好な活性とヌクレアーゼ安定性との間の均衡を達成するために必要とされることが示唆されている(本明細書に援用される、Wanら、2014、「Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages」、Nucleic Acids Research 42(22):13456～13468頁)。一部の実施形態では、本明細書で配列番号3に記載される任意のASOが挙げられるがこれらに限定されない、本開示の方法において使用されるASOは、約5～100%のRp、少なくとも約5%のRp、少なくとも約10%のRp、少なくとも約15%のRp、少なくとも約20%のRp、少なくとも約25%のRp、少なくとも約30%のRp、少なくとも約35%のRp、少なくとも約40%のRp、少なくとも約45%のRp、少なくとも約50%のRp、少なくとも約55%のRp、少なくとも約60%のRp、少なくとも約65%のRp、少なくとも約70%のRp、少なくとも約75%のRp、少なくとも約80%のRp、少なくとも約85%のRp、少なくとも約90%のRp、若しくは少なくとも約95%のRpとその残りのSp、又は約100%のRpを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される任意のASOが挙げられるがこれらに限定されない、本開示の方法において使用されるASOは、配列番号3のいずれか1つの少なくとも8個の連続的な核酸を含む領域に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性を有する配列を含み、約10%～約100%のRp、約15%～約100%のRp、約20%～約100%のRp、約25%～約100%のRp、約30%～約100%のRp、約35%～約100%のRp、約40%～約100%のRp、約45%～約100%のRp、約50%～約100%のRp、約55%～約100%のRp、約60%～約100%のRp、約65%～約100%のRp、約70%～約100%のRp、約75%～約100%のRp、約80%～約100%のRp、約85%～約100%のRp、約90%～約100%のRp、又は約95%～約100%のRp、約20%～約80%のRp、約25%～約75%のRp、約30%～約70%のRp、約40%～約60%のRp、又は約45%～約55%のRpとその残りのSpを含む。

【0155】

[181]一部の実施形態では、本明細書に記載される任意のASOが挙げられるがこれらに限定されない、本開示の方法において使用されるASOは、配列番号3の少なくとも8個の連続的な核酸を含む領域に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性を有する配列を含み、約5～100%のSp、少なくと

も約5%のSp、少なくとも約10%のSp、少なくとも約15%のSp、少なくとも約20%のSp、少なくとも約25%のSp、少なくとも約30%のSp、少なくとも約35%のSp、少なくとも約40%のSp、少なくとも約45%のSp、少なくとも約50%のSp、少なくとも約55%のSp、少なくとも約60%のSp、少なくとも約65%のSp、少なくとも約70%のSp、少なくとも約75%のSp、少なくとも約80%のSp、少なくとも約85%のSp、少なくとも約90%のSp、若しくは少なくとも約95%のSpとその残りのRp、又は約100%のSpを含む。実施形態では、本明細書で記載される任意のASOが挙げられるがこれらに限定されない、本開示の方法において使用されるASOは、配列番号3の少なくとも8個の連続的な核酸を含む領域に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、又は100%の配列同一性を有する配列を含み、約10%~約100%のSp、約15%~約100%のSp、約20%~約100%のSp、約25%~約100%のSp、約30%~約100%のSp、約35%~約100%のSp、約40%~約100%のSp、約45%~約100%のSp、約50%~約100%のSp、約55%~約100%のSp、約60%~約100%のSp、約65%~約100%のSp、約70%~約100%のSp、約75%~約100%のSp、約80%~約100%のSp、約85%~約100%のSp、約90%~約100%のSp、又は約95%~約100%のSp、約20%~約80%のSp、約25%~約75%のSp、約30%~約70%のSp、約40%~約60%のSp、又は約45%~約55%のSpとその残りのRpを含む。

【0156】

[182]本明細書に記載される任意のASOは、天然に存在するヌクレオチドに存在するような、リボース若しくはデオキシリボースを含む糖部分、又はモルホリン環を含む、修飾糖部分若しくは糖類似体を含んでもよい。修飾糖部分の非限定的な例としては、2'置換基、例えば2'-O-メチル(2'-O-Me)、2'-O-メトキシエチル(2'MOE)、2'-O-アミノエチル、2'F; 2'-NMA部分; N3' P5'ホスホロアミデート、2'ジメチルアミノオキシエトキシ、2'ジメチルアミノエトキシエトキシ、2'-グアニジニウム(guanidinidium)、2'-O-グアニジニウムエチル、カルバメート修飾糖、及び2環式修飾糖が挙げられる。本明細書で使用する場合、「2'-NMA」は、リボシル糖部分の2'-OH基に代わる-O-CH₂-C(=O)-NH-CH₃基を意味し得る。「2'-NMA糖部分」又は「2'-NMA部分」は、リボシル糖部分の2'-OH基の代わりに2'-O-CH₂-C(=O)-NH-CH₃基を有する糖部分である。別段の指示がない限り、2'-NMA糖部分は-D配置である。「NMA」は、O-N-メチルアセトアミドを意味し得る。一部の実施形態では、糖部分修飾は、2'-O-Me、2'F、2'-NMA、及び2'MOEから選択される。一部の実施形態では、糖部分修飾は、例えばロックド核酸(LNA)における追加の架橋結合である。一部の実施形態では、糖類似体は、モルホリン環、例えばホスホロジアミデートモルホリノ(PMO)を含有する。一部の実施形態では、糖部分は、リボフラノシル(ribofuransyl)又は2'デオキシリボフラノシル(deoxyribofuransyl)修飾を含む。一部の実施形態では、糖部分は、2'4'-拘束2'O-メチルオキシエチル(cMOE)修飾を含む。一部の実施形態では、糖部分は、cEt 2', 4'拘束2'-OエチルBNA修飾を含む。一部の実施形態では、糖部分は、トリシクロDNA(tcDNA)修飾を含む。一部の実施形態では、糖部分は、エチレン核酸(ENA)修飾を含む。一部の実施形態では、糖部分は、MCE修飾を含む。修飾は当技術分野で公知であり、文献、例えば、この目的のために参照によって本明細書に組み込まれる、Jarverら、2014、「A Chemical View of Oligonucleotides for Exon Skipping and Related Drug Applications」、Nucleic Acid Therapeutics 24(1): 37~47頁に記載されている。

【0157】

[183]一部の実施形態では、ASOの各モノマーは同様に修飾され、例えば、ASOの骨格の各連結がホスホロチオエート連結を含むか、又は各リボース糖部分が2'-O-Me

チル修飾を含む。A S Oのモノマー成分の各々に存在するそのような修飾は、「均一修飾」と称される。一部の例において、異なる修飾の組合せが所望されてもよく、例えば、A S Oは、ホスホロジアミデート連結とモルホリン環（モルホリノ）を含む糖部分との組合せを含んでもよい。A S Oへの異なる修飾の組合せは、「混合修飾」又は「混合化学」と称される。

【0158】

[184]一部の実施形態では、A S Oは、1つ以上の骨格修飾を含む。一部の実施形態では、A S Oは、1つ以上の糖部分修飾を含む。一部の実施形態では、A S Oは、1つ以上の骨格修飾、及び1つ以上の糖部分修飾を含む。一部の実施形態では、A S Oは、2' M O E修飾及びホスホロチオエート骨格を含む。一部の実施形態では、A S Oは、ホスホロ 10
 ジアミデートモルホリノ（P M O）を含む。一部の実施形態では、A S Oは、ペプチド核酸（P N A）を含む。本明細書に記載されるA S Oのいずれか、又はA S Oの任意の成分（例えば、核酸塩基、糖部分、骨格）は、A S Oの所望の特性若しくは活性を達成するため、又はA S Oの望ましくない特性若しくは活性を低減させるために修飾されてもよい。例えば、A S O又は任意のA S Oの1つ以上の成分は、m R N A前駆体転写物の標的配列に対する結合親和性を増強するため、任意の非標的配列への結合を低減させるため、細胞のヌクレアーゼ（すなわちR NアーゼH）による分解を低減させるため、細胞内及び/若しくは細胞の核内へのA S Oの取込みを向上させるため、A S Oの薬物動態若しくは薬力学を変更するため、並びに/又はA S Oの半減期を調節するために修飾されてもよい。

【0159】

[185]一部の実施形態では、A S Oは、2' - O - (2 - メトキシエチル) (M O E)
 ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドで構成される。そのようなヌクレオチドで構成されるA S Oは、本明細書に開示される方法にとりわけよく適しており、そのような修飾を有するオリゴマーは、ヌクレアーゼ分解に対する著しく増強された抵抗性及び増加したパイ 20
 オアベイラビリティを有し、これにより、例えば本明細書に記載される一部の実施形態における経口送達に好適なものになることが示されている。例えば、G e a r yら、J P h a r m a c o l E x p T h e r . 2 0 0 1 ; 2 9 6 (3) : 8 9 0 ~ 7 頁、G e a r yら、J P h a r m a c o l E x p T h e r . 2 0 0 1 ; 2 9 6 (3) : 8 9 8 ~ 9 0 4 頁を参照のこと。

【0160】

[186]A S Oを合成する方法は、当業者に公知である。代替的に又は付加的に、A S Oは商業的供給業者から入手してもよい。

【0161】

[187]別段の定めのない限り、1本鎖核酸（例えば、m R N A前駆体転写物、オリゴヌクレオチド、A S O等）配列の左手末端は5'末端であり、1本鎖又は2本鎖核酸配列の左手方向は5'方向と称される。同様に、核酸配列（1本鎖又は2本鎖）の右手末端又は方向は、3'末端又は方向である。一般に、核酸中の基準点に対して5'側にある領域又は配列は「上流」と称され、核酸中の基準点に対して3'側にある領域又は配列は「下流」と称される。一般に、m R N Aの5'方向又は末端は、開始又は出発コドンが位置する場所であり、3'末端又は方向は、終止コドンが位置する場所である。一部の態様では、核酸中の基準点の上流にあるヌクレオチドは負の数によって明示されてもよく、基準点の下流にあるヌクレオチドは正の数によって明示されてもよい。例えば、基準点（例えば、m R N Aにおけるエクソン - エクソン接合部）は「ゼロ」部位として明示されてもよく、その際、基準点に直に隣接する上流のヌクレオチドは「マイナス1」、例えば「- 1」と明示され、基準点に直に隣接する下流のヌクレオチドは「プラス1」、例えば「+ 1」と明示される。

【0162】

[188]一部の実施形態では、A S Oは、P H I P m R N A前駆体における包含エクソンの5'スプライス部位（又はN M Dエクソンの3'末端）の下流（3'方向）（例えば、5'スプライス部位に対して正の数によって明示される方向）にある、P H I P m R N 40
 50

A前駆体、例えば、PHI P NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分に対して相補的である（及び結合する）。一部の実施形態では、ASOは、包含エクソンの5'スプライス部位（又は3'末端）に対して約+1~約+500の領域内にあるPHI P mRNA前駆体、例えば、PHI P NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分に対して相補的である。一部の実施形態では、ASOは、包含エクソンの5'スプライス部位（又は3'末端）に対して+6~+40,000のヌクレオチドの領域内にあるPHI P mRNA前駆体、例えば、PHI P NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分に対して相補的であり得る。一部の態様では、ASOは、包含エクソンの5'スプライス部位（又は3'末端）に対して約+1~約+40,000、約+1~約+30,000、約+1~約+20,000、約+1~約+15,000、約+1~約+10,000、約+1~約+5,000、約+1~約+4,000、約+1~約+3,000、約+1~約+2,000、約+1~約+1,000、約+1~約+500、約+1~約+490、約+1~約+480、約+1~約+470、約+1~約+460、約+1~約+450、約+1~約+440、約+1~約+430、約+1~約+420、約+1~約+410、約+1~約+400、約+1~約+390、約+1~約+380、約+1~約+370、約+1~約+360、約+1~約+350、約+1~約+340、約+1~約+330、約+1~約+320、約+1~約+310、約+1~約+300、約+1~約+290、約+1~約+280、約+1~約+270、約+1~約+260、約+1~約+250、約+1~約+240、約+1~約+230、約+1~約+220、約+1~約+210、約+1~約+200、約+1~約+190、約+1~約+180、約+1~約+170、約+1~約+160、約+1~約+150、約+1~約+140、約+1~約+130、約+1~約+120、約+1~約+110、約+1~約+100、約+1~約+90、約+1~約+80、約+1~約+70、約+1~約+60、約+1~約+50、約+1~約+40、約+1~約+30、又は約+1~約+20の領域内にある標的化部分に対して相補的である。一部の態様では、ASOは、包含エクソンの5'スプライス部位（又は3'末端）に対して約+1~約+100、約+100~約+200、約+200~約+300、約+300~約+400、又は約+400~約+500の領域内にある標的化部分に対して相補的である。

10
20

【0163】

[189]一部の実施形態では、ASOは、PHI P mRNA前駆体、例えば、PHI P NMDエクソン含有mRNA前駆体における包含エクソンの5'スプライス部位（又は3'末端）の上流（5'方向）（例えば、5'スプライス部位に対して負の数によって明示される方向）にある、PHI P mRNA前駆体、例えば、PHI P NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分に対して相補的である（又は結合する）。一部の実施形態では、ASOは、包含エクソンの5'スプライス部位（又は3'末端）に対して約-4~約-270の領域内にある、PHI P mRNA前駆体、例えば、PHI P NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分に対して相補的である。一部の実施形態では、ASOは、包含エクソンの5'スプライス部位（又は3'末端）に対して-1~-40,000のヌクレオチドの領域内にある、PHI P mRNA前駆体、例えば、PHI P NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分に対して相補的であり得る。一部の態様では、ASOは、包含エクソンの5'スプライス部位（又は3'末端）に対して約-1~約-40,000、約-1~約-30,000、約-1~約-20,000、約-1~約-15,000、約-1~約-10,000、約-1~約-5,000、約-1~約-4,000、約-1~約-3,000、約-1~約-2,000、約-1~約-1,000、約-1~約-500、約-1~約-490、約-1~約-480、約-1~約-470、約-1~約-460、約-1~約-450、約-1~約-440、約-1~約-430、約-1~約-420、約-1~約-410、約-1~約-400、約-1~約-390、約-1~約-380、約-1~約-370、約-1~約-360、約-1~約-350、約-1~約-340、約-1~約-330、約-1~約-320、約-1~約-310、約-1~約-300、約-1~約-290、約-1~約-280、約-1~約-270、約-1~約-

30
40
50

260、約-1~約-250、約-1~約-240、約-1~約-230、約-1~約-220、約-1~約-210、約-1~約-200、約-1~約-190、約-1~約-180、約-1~約-170、約-1~約-160、約-1~約-150、約-1~約-140、約-1~約-130、約-1~約-120、約-1~約-110、約-1~約-100、約-1~約-90、約-1~約-80、約-1~約-70、約-1~約-60、約-1~約-50、約-1~約-40、約-1~約-30、又は約-1~約-20の領域内にある標的化部分に対して相補的である。

【0164】

[190]一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体における包含エクソンの3'スプライス部位(又は5'末端)の上流(5'方向)(例えば、負の数によって明示される方向)にある、PHIP mRNA前駆体、例えば、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分に対して相補的である。一部の実施形態では、ASOは、包含エクソンの3'スプライス部位(又は5'末端)に対して約-1~約-500の領域内にある、PHIP mRNA前駆体、例えば、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分に対して相補的である。一部の実施形態では、ASOは、包含エクソンの3'スプライス部位に対して-1~40,000の領域内にあるPHIP mRNA前駆体の標的化部分に対して相補的である。一部の態様では、ASOは、包含エクソンの3'スプライス部位に対して約-1~約-40,000、約-1~約-30,000、約-1~約-20,000、約-1~約-15,000、約-1~約-10,000、約-1~約-5,000、約-1~約-4,000、約-1~約-3,000、約-1~約-2,000、約-1~約-1,000、約-1~約-500、約-1~約-490、約-1~約-480、約-1~約-470、約-1~約-460、約-1~約-450、約-1~約-440、約-1~約-430、約-1~約-420、約-1~約-410、約-1~約-400、約-1~約-390、約-1~約-380、約-1~約-370、約-1~約-360、約-1~約-350、約-1~約-340、約-1~約-330、約-1~約-320、約-1~約-310、約-1~約-300、約-1~約-290、約-1~約-280、約-1~約-270、約-1~約-260、約-1~約-250、約-1~約-240、約-1~約-230、約-1~約-220、約-1~約-210、約-1~約-200、約-1~約-190、約-1~約-180、約-1~約-170、約-1~約-160、約-1~約-150、約-1~約-140、約-1~約-130、約-1~約-120、約-1~約-110、約-1~約-100、約-1~約-90、約-1~約-80、約-1~約-70、約-1~約-60、約-1~約-50、約-1~約-40、約-1~約-30、又は約-1~約-20の領域内にある標的化部分に対して相補的である。一部の態様では、ASOは、包含エクソンの3'スプライス部位に対して約-1~約-100、約-100~約-200、約-200~約-300、約-300~約-400、又は約-400~約-500の領域内にある標的化部分に対して相補的である。

【0165】

[191]一部の実施形態では、ASOは、PHIP mRNA前駆体、例えば、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体における包含エクソンの3'スプライス部位(5'末端)の下流(3'方向)(例えば、正の数によって明示される方向)にある、PHIP mRNA前駆体、例えば、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体の標的化部分に対して相補的である。一部の実施形態では、ASOは、包含エクソンの3'スプライス部位に対して約+1~約+40,000の領域内にあるPHIP mRNA前駆体の標的化部分に対して相補的である。一部の態様では、ASOは、包含エクソンの3'スプライス部位に対して約+1~約+40,000、約+1~約+30,000、約+1~約+20,000、約+1~約+15,000、約+1~約+10,000、約+1~約+5,000、約+1~約+4,000、約+1~約+3,000、約+1~約+2,000、約+1~約+1,000、約+1~約+500、約+1~約+490、約+1~約+480、約+1~約+470、約+1~約+460、約+1~約+450、約+1~約+440、約+1~約+430、約+1~約+420、約+1~約+410、約+1~約+400、

約 + 1 ~ 約 + 3 9 0、約 + 1 ~ 約 + 3 8 0、約 + 1 ~ 約 + 3 7 0、約 + 1 ~ 約 + 3 6 0、
 約 + 1 ~ 約 + 3 5 0、約 + 1 ~ 約 + 3 4 0、約 + 1 ~ 約 + 3 3 0、約 + 1 ~ 約 + 3 2 0、
 約 + 1 ~ 約 + 3 1 0、約 + 1 ~ 約 + 3 0 0、約 + 1 ~ 約 + 2 9 0、約 + 1 ~ 約 + 2 8 0、
 約 + 1 ~ 約 + 2 7 0、約 + 1 ~ 約 + 2 6 0、約 + 1 ~ 約 + 2 5 0、約 + 1 ~ 約 + 2 4 0、
 約 + 1 ~ 約 + 2 3 0、約 + 1 ~ 約 + 2 2 0、約 + 1 ~ 約 + 2 1 0、約 + 1 ~ 約 + 2 0 0、
 約 + 1 ~ 約 + 1 9 0、約 + 1 ~ 約 + 1 8 0、約 + 1 ~ 約 + 1 7 0、約 + 1 ~ 約 + 1 6 0、
 約 + 1 ~ 約 + 1 5 0、約 + 1 ~ 約 + 1 4 0、約 + 1 ~ 約 + 1 3 0、約 + 1 ~ 約 + 1 2 0、
 約 + 1 ~ 約 + 1 1 0、約 + 1 ~ 約 + 1 0 0、約 + 1 ~ 約 + 9 0、約 + 1 ~ 約 + 8 0、約 +
 1 ~ 約 + 7 0、約 + 1 ~ 約 + 6 0、約 + 1 ~ 約 + 5 0、約 + 1 ~ 約 + 4 0、約 + 1 ~ 約 +
 3 0、又は約 + 1 ~ 約 + 2 0、又は約 + 1 ~ 約 + 1 0 の領域内にある標的化部分に対して 10
 相補的である。

【 0 1 6 6 】

[192] 一部の実施形態では、P H I P m R N A 前駆体、例えば、P H I P N M D エクソン含有 m R N A 前駆体の標的化部分は、包含エクソンの 5 ' スプライス部位 (3 ' 末端) に対して + 1 0 0 から包含エクソンの 3 ' スプライス部位 (5 ' 末端) に対して - 1 0 0 の領域内にある。一部の実施形態では、P H I P N M D エクソン含有 m R N A 前駆体の標的化部分は N M D エクソン内にある。一部の実施形態では、P H I P N M D エクソン含有 m R N A 前駆体の標的化部分は、偽エクソンとイントロンとの境界を含む。

【 0 1 6 7 】

[193] A S O は、特異的結合及びスプライシングの効果的な増強に好適な任意の長さで 20
 あり得る。一部の実施形態では、A S O は、8 ~ 5 0 核酸塩基からなる。例えば、A S O は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、又は50核酸塩基長であり得る。一部の実施形態では、A S O は、50核酸塩基超から成る。一部の実施形態では、A S O は、8 ~ 5 0 核酸塩基、8 ~ 4 0 核酸塩基、8 ~ 3 5 核酸塩基、8 ~ 3 0 核酸塩基、8 ~ 2 5 核酸塩基、8 ~ 2 0 核酸塩基、8 ~ 1 5 核酸塩基、9 ~ 5 0 核酸塩基、9 ~ 4 0 核酸塩基、9 ~ 3 5 核酸塩基、9 ~ 3 0 核酸塩基、9 ~ 2 5 核酸塩基、9 ~ 2 0 核酸塩基、9 ~ 1 5 核酸塩基、10 ~ 5 0 核酸塩基、10 ~ 4 0 核酸塩基、10 ~ 3 5 核酸塩基、10 ~ 3 0 核酸塩基、10 ~ 2 5 核酸塩基、10 ~ 2 0 核酸塩基、10 ~ 1 5 核酸塩基、11 ~ 5 0 核酸塩基、11 ~ 4 0 核酸塩基、11 ~ 3 5 核酸塩基、11 ~ 3 0 核酸塩基、11 ~ 2 5 核酸塩基、11 ~ 2 0 核酸塩基、11 ~ 1 5 核酸塩基、12 ~ 5 0 核酸塩基、12 ~ 4 0 核酸塩基、12 ~ 3 5 核酸塩基、12 ~ 3 0 核酸塩基、12 ~ 2 5 核酸塩基、12 ~ 2 0 核酸塩基、12 ~ 1 5 核酸塩基、13 ~ 5 0 核酸塩基、13 ~ 4 0 核酸塩基、13 ~ 3 5 核酸塩基、13 ~ 3 0 核酸塩基、13 ~ 2 5 核酸塩基、13 ~ 2 0 核酸塩基、14 ~ 5 0 核酸塩基、14 ~ 4 0 核酸塩基、14 ~ 3 5 核酸塩基、14 ~ 3 0 核酸塩基、14 ~ 2 5 核酸塩基、14 ~ 2 0 核酸塩基、15 ~ 5 0 核酸塩基、15 ~ 4 0 核酸塩基、15 ~ 3 5 核酸塩基、15 ~ 3 0 核酸塩基、15 ~ 2 5 核酸塩基、15 ~ 2 0 核酸塩基、20 ~ 5 0 核酸塩基、20 ~ 4 0 核酸塩基、20 ~ 3 5 核酸塩基、20 ~ 3 0 核酸塩基、20 ~ 2 5 核酸塩基、25 ~ 5 0 核酸塩基、25 ~ 4 0 核酸塩基、25 ~ 3 5 核酸塩基、又は25 ~ 3 0 核酸塩基長である。一 40
 部の実施形態では、A S O は 1 8 ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、A S O は 1 5 ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、A S O は 2 5 ヌクレオチド長である。

【 0 1 6 8 】

[194] 一部の実施形態では、異なる化学的性質を有するが、m R N A 前駆体、例えば、N M D エクソン含有 m R N A 前駆体の同じ標的化部分に対して相補的な 2 種以上の A S O が使用される。一部の実施形態では、m R N A 前駆体、例えば、N M D エクソン含有 m R N A 前駆体の異なる標的化部分に対して相補的である 2 種以上の A S O が使用される。

【 0 1 6 9 】

[195] 一部の実施形態では、本開示のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、1 つ以上の部分又はコンジュゲート、例えば、オリゴヌクレオチドの活性又は細胞の取込みを増強す 50

る、標的とする部分又は他のコンジュゲートに化学的に連結する。そのような部分としては、例えば、コレステロール部分、コレステリル部分としての脂質部分、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオール若しくはウンデシル残基、ポリアミン若しくはポリエチレングリコール鎖、又はアダマンタン酢酸が挙げられるが、これらに限定されない。親油性部分を含むオリゴヌクレオチド、及び調製方法は、公開文献に記載されている。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、脱塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、例えばN - アセチルガラクトサミン (GalNAc)、N - Ac - グルコサミン (GluNAc)、若しくはマンノース (例えば、マンノース - 6 - ホスフェート)、脂質、又はポリ炭化水素化合物が挙げられるがこれらに限定されない部分とコンジュゲートする。コンジュゲートは、当技術分野で理解され、文献に記載されているように、例えばリンカーを使用して、糖、塩基、又はリン酸基のいくつかの位置のいずれかにおいて、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む任意のヌクレオチドの1個以上に連結することができる。リンカーとしては、2価又は3価の分枝リンカーを挙げることができる。実施形態では、コンジュゲートは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの3'末端に結合される。オリゴヌクレオチドコンジュゲートを調製する方法は、例えば、本明細書に援用される米国特許第8,450,467号、「Carbohydrate conjugates as delivery agents for oligonucleotides」に記載されている。

【0170】

[196]一部の実施形態では、ASOによって標的とされる核酸は、細胞、例えば真核細胞において発現するPHIP mRNA前駆体、例えば、NMDエクソン含有mRNA前駆体である。一部の実施形態では、「細胞」という用語は細胞の集団を指す場合がある。一部の実施形態では、細胞は対象内にある。一部の実施形態では、細胞は対象から単離される。一部の実施形態では、細胞はエキスピボである。一部の実施形態では、細胞は、病態又は疾患関連細胞又は細胞株である。一部の実施形態では、細胞はインビトロ (例えば、細胞培養物中) である。

医薬組成物

[197]記載される組成物の、及び記載される方法のいずれかにおける使用のための薬剤、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物又は製剤は、医薬業界において周知かつ公開文献に記載されている従来の技法に従って調製することができる。実施形態では、対象を処置するための医薬組成物又は製剤は、本明細書に記載されるような有効量の任意のアンチセンスオリゴマー、又は薬学的に許容されるその塩、溶媒和物、水和物、又はエステルを含む。アンチセンスオリゴマーを含む医薬製剤は、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、又は担体をさらにもよい。

【0171】

[198]薬学的に許容される塩は、過度の毒性、刺激作用、アレルギー応答等を伴わないためにヒト及び下等動物の組織との接触における使用に好適であり、妥当な利益/危険比に相当する。(例えば、この目的のために本明細書に援用されるS.M.Bergers、J.Pharmaceutical Sciences、66:1~19頁(1977))を参照のこと。塩は、化合物の最終単離及び精製の間in situで、又は遊離塩基形態を好適な有機酸と反応させることによって別個に調製することができる。薬学的に許容される非毒性酸付加塩の例は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸、及び過塩素酸等の無機酸、又は酢酸、シュウ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸、若しくはマロン酸等の有機酸を用いて、あるいはイオン交換等の他の文書化された方法論を使用することによって形成されたアミノ基の塩である。他の薬学的に許容される塩としては、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ニグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素酸塩、2 - ヒドロキシ - エタンスルホン酸

塩、ラクチオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パルモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩等が挙げられる。代表的なアルカリ又はアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム等が挙げられる。さらなる薬学的に許容される塩としては、適切な場合、ハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、低級アルキルスルホン酸塩、及びアリアルスルホン酸塩等の対イオンを使用して形成された、非毒性アンモニウム、第四級アンモニウム、及びアミンカチオンが挙げられる。

10

【0172】

[199]一部の実施形態では、組成物は、これらに限定されないが、錠剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、液体シロップ剤、軟ゲル、坐剤、及び浣腸剤等の多くの可能な剤形のいずれかに製剤化される。実施形態では、組成物は、水性、非水性、又は混合媒体中の懸濁剤として製剤化される。水性懸濁剤は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、及び/又はデキストランを含む、懸濁剤の粘度を増加させる物質をさらに含有してもよい。懸濁剤はまた、安定剤を含有してもよい。実施形態では、本開示の医薬製剤又は組成物としては、溶液、エマルジョン、マイクロエマルジョン、泡状物、又はリポソーム含有製剤（例えば、カチオン性又は非カチオン性リポソーム）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0173】

[200]本明細書に記載される医薬組成物又は製剤は、適宜、当業者に周知又は公開文献に記載されている、1種以上の浸透増強剤、担体、賦形剤、又は他の活性若しくは不活性成分を含んでもよい。実施形態では、リポソームとしては、立体的に安定化したリポソーム、例えば、1種以上の特殊化した脂質を含むリポソームも挙げられる。これらの特殊化した脂質は、増強した循環寿命を有するリポソームを結果的にもたらず。実施形態では、立体的に安定化したリポソームは、1種以上の糖脂質を含むか、又は1種以上の親水性ポリマー、例えばポリエチレングリコール（PEG）部分を用いて誘導体化される。一部の実施形態では、界面活性剤が医薬製剤又は組成物に含まれる。薬物生成物、製剤、及びエマルジョンにおける界面活性剤の使用は、当技術分野で周知である。実施形態では、本開示は、浸透増強剤を用いて、アンチセンスオリゴヌクレオチドの効率的な送達をもたらす、例えば、細胞膜を越える拡散を助ける、及び/又は親油性の薬物の透過性を増強させる。一部の実施形態では、浸透増強剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、又は非キレート非界面活性剤である。

30

【0174】

[201]一部の実施形態では、医薬製剤は複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、別の薬物又は治療剤と組み合わせて投与される。

併用療法

40

[202]一部の実施形態では、本開示に開示されるASOは、1種以上のさらなる治療剤と組み合わせて使用することができる。一部の実施形態では、1種以上のさらなる治療剤は低分子を含むことができる。例えば、1種以上のさらなる治療剤は、その全体が本明細書に援用される、WO2016128343A1、WO2017053982A1、WO2016196386A1、WO201428459A1、WO201524876A2、WO2013119916A2、及びWO2014209841A2に記載されている低分子を含むことができる。一部の実施形態では、1種以上のさらなる治療剤は、イントロン保持を是正するために使用することができるASOを含む。

対象の処置

[203]本明細書で提供される組成物のいずれも、個体に投与することができる。「個体

50

」は、「対象」又は「患者」と交換可能に使用することができる。個体は、哺乳動物、例えば、ヒト、又は非ヒト霊長類、げっ歯類、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ロバ、ヤギ、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、若しくはヒツジ等の動物であり得る。実施形態では、個体はヒトである。実施形態では、個体は胎児、胚、又は小児である。他の実施形態では、個体は別の真核性生物、例えば植物であり得る。一部の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、細胞にエクスピボで投与される。

【0175】

[204]一部の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、疾患又は障害を処置する方法として個体に投与される。一部の実施形態では、個体は、遺伝子疾患、例えば本明細書に記載される疾患のいずれかを有する。一部の実施形態では、個体は、疾患、例えば本明細書に記載される疾患のいずれかを有する危険がある。一部の実施形態では、個体は、不十分な量のタンパク質又はタンパク質の不十分な活性によって引き起こされる疾患又は障害を有する増加した危険がある。個体が不十分な量のタンパク質又はタンパク質の不十分な活性によって引き起こされる疾患又は障害を有する「増加した危険がある」場合、方法は防止又は予防的処置を伴う。例えば、個体は、疾患の家族歴のために、そのような疾患又は障害を有する増加した危険がある場合がある。典型的には、そのような疾患又は障害を有する増加した危険がある個体は、予防的処置から（例えば、疾患又は障害の発症又は進行を防止するか、又は遅延させることによって）恩恵を受ける。実施形態では、胎児は、子宮内で、例えば、ASO組成物を胎児に直接的に又は間接的に（例えば母親を介して）投与することによって処置される。

【0176】

[205]場合によっては、主題の医薬組成物及び方法は、PHIP欠損に関連する病態又は疾患の処置に適用可能である。場合によっては、主題の医薬組成物及び方法は、Chung - Jansen症候群（CHUJANS）、常染色体優性障害、知的障害、発話遅延、不安、自閉症スペクトラム障害（ASD）、注意欠陥多動性障害（ADHD）、攻撃行動、顔面異形、カフェオレ斑、PHIPハプロ不全によって引き起こされる過体重症候群、発達遅延、肥満、又は異形症の処置に適用可能である。

【0177】

[206]場合によっては、治療剤は、オリゴヌクレオチドを含む。場合によっては、治療剤は、標的ペプチド配列をコードするmRNA前駆体の標的化領域に結合するオリゴヌクレオチドを発現するベクター、例えばウイルスベクターを含む。本明細書で提供される方法は、薬剤、例えばオリゴヌクレオチドをコードするベクターを細胞に接触させることに適合させることができ、その結果、薬剤は、細胞におけるmRNA前駆体に結合し、mRNA前駆体のプロセッシングを調節する。場合によっては、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス（HSV）ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、又は任意の適用可能なウイルスベクターを含む。場合によっては、治療剤は、非効率的な翻訳領域をコードする遺伝子領域が欠失されるように標的ペプチド配列をコードする遺伝子を修飾するように構成されている遺伝子編集ツールを含む。場合によっては、遺伝子編集ツールは、CRISPR-Cas9、TALEN、ジンクフィンガー、又は他の適用可能な技術に基づく遺伝子編集のためのベクター、例えばウイルスベクターを含む。

【0178】

[207]本開示のASOの好適な投与経路は、ASOの送達が所望される細胞型に応じて変えてもよい。本開示のASOは、患者に非経口的に、例えば、硝子体内注射、髄腔内注射、脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、又は静脈内注射によって投与され得る。

【0179】

[208]実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、血液脳関門を越える対象のアンチセンスオリゴヌクレオチドの浸透を促進することができる1種以上の薬剤と共に、当該技術分野で公知の任意の方法によって投与される。例えば、筋肉組織の運動ニューロン

へのアデノウイルスベクターの投与による薬剤の送達は、本明細書に援用される米国特許第6,632,427号、「Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons」に記載されている。脳、例えば、線条体、視床、海馬、又は黒質へのベクターの直接の送達は、例えば、本明細書に援用される米国特許第6,756,523号、「Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain」に記載されている。

【0180】

[209]一部の実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、望ましい医薬的又は薬力学的特性を提供する薬剤と連結又はコンジュゲートされる。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、血液脳関門を越える浸透又は運搬を促進する、当技術分野で公知の物質、例えばトランスフェリン受容体に対する抗体とカップリングされる。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ウイルスベクターと連結して、例えば、アンチセンス化合物をより効果的にするか、又は血液脳関門を越える運搬を増加させる。複数の実施形態では、浸透圧による血液脳関門破壊は、糖、例えば、メソエリスリトール、キシリトール、D(+)ガラクトース、D(+)ラクトース、D(+)キシロース、ダルシトール、ミオイノシトール、L(-)フルクトース、D(-)マンニトール、D(+)グルコース、D(+)アラビノース、D(-)アラビノース、セロピオース、D(+)マルトース、D(+)ラフィノース、L(+)ラムノース、D(+)メリピオース、D(-)リボース、アドニトール、D(+)アラビトール、L(-)アラビトール、D(+)フコース、L(-)フコース、D(-)リキソース、L(+)リキソース、及びL(-)リキソース、又はアミノ酸、例えば、グルタミン、リシン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、チロシン、バリン、及びタウリンの注入によって補助される。血液脳関門浸透を増強させるための方法及び材料は、例えば、各々が本明細書に援用される、米国特許第9,193,969号、「Compositions and methods for selective delivery of oligonucleotide molecules to specific neuron types」、米国特許第4,866,042号、「Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier」、米国特許第6,294,520号、「Material for passage through the blood-brain barrier」、及び米国特許第6,936,589号「Parenteral delivery systems」に記載されている。

【0181】

[210]場合によっては、治療剤は、修飾snRNA、例えば修飾ヒトsnRNAを含む。場合によっては、治療剤は、修飾snRNAをコードするベクター、例えばウイルスベクターを含む。一部の実施形態では、修飾snRNAは修飾U1 snRNAである(例えば、Alanisら、Human Molecular Genetics、2012、第21巻、第11号2389~2398頁を参照のこと)。一部の実施形態では、修飾snRNAは修飾U7 snRNAである(例えば、Gadgilら、J Gene Med、2021;23:e3321を参照のこと)。一部の実施形態では、修飾snRNAは、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体にハイブリダイズする1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾されている。一部の実施形態では、修飾snRNAは、本明細書に開示されるASOの1つ又は2つ以上の配列を含む1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾されている。一部の実施形態では、修飾snRNAは、変異を有するPHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体の配列にハイブリダイズする1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾されている。一部の実施形態では、修飾snRNAは、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体の2つ以上の標的領域にハイブリダイズする2つ以上の配

列を含む1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾されている。例えば、修飾 snRNA は、PHIP NMDエクソン含有 mRNA 前駆体の少なくとも8個の連続的な核酸にハイブリダイズする1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾することができる。一部の実施形態では、修飾 snRNA は、本明細書に開示される PHIP NMDエクソン含有 mRNA 前駆体の任意の標的領域にハイブリダイズする1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾されている。一部の実施形態では、修飾 snRNA は、PHIP NMDエクソン含有 mRNA 前駆体の2つ以上の標的領域にハイブリダイズする2つ以上の配列を含む1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾されている。例えば、修飾 snRNA は、mRNA 前駆体転写物の NMDエクソン（例えば、PHIP のエクソン 15x（例えば、PHIP のエクソン（GRCh38/hg38: chr6 79004373~79004436）））を含有するイントロンの1つ若しくは2つ以上の配列、又は同じイントロンにおける NMDエクソン活性化制御配列にハイブリダイズする1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾することができる。例えば、修飾 snRNA は、NMDエクソン内の領域又は NMDエクソン（例えば、PHIP のエクソン 15x（例えば、PHIP のエクソン（GRCh38/hg38: chr6 79004373~79004436）））の上流若しくは下流の領域にハイブリダイズする1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾することができる。一部の実施形態では、修飾 snRNA は、PHIP NMDエクソン含有 mRNA 前駆体にハイブリダイズする1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾されている5'領域を有する。

10

【0182】

20

[211] 例えば、修飾 snRNA は、NMDエクソン及びNMDエクソン（例えば、PHIP のエクソン 15x（例えば、PHIP のエクソン（GRCh38/hg38: chr6 79004373~79004436）））の上流のイントロンと重複する領域にハイブリダイズする1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾することができる。例えば、修飾 snRNA は、NMDエクソン及びNMDエクソン（例えば、PHIP のエクソン 15x（例えば、PHIP のエクソン（GRCh38/hg38: chr6 79004373~79004436）））の下流のイントロンと重複する領域にハイブリダイズする1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾することができる。

【0183】

[212] 例えば、修飾 snRNA は、NMDエクソン（例えば、PHIP のエクソン 15x（例えば、PHIP のエクソン（GRCh38/hg38: chr6 79004373~79004436）））の下流にあるイントロン配列に対して相補的である1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾することができる。例えば、修飾 snRNA は、NMDエクソン（例えば、PHIP のエクソン 15x（例えば、PHIP のエクソン（GRCh38/hg38: chr6 79004373~79004436）））の上流又は下流にあるイントロン配列の3'スプライス部位に対して相補的である1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾することができる。例えば、修飾 snRNA は、NMDエクソン（例えば、PHIP のエクソン 15x（例えば、PHIP のエクソン（GRCh38/hg38: chr6 79004373~79004436）））の下流にあるイントロン配列の5'スプライス部位に対して相補的である1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾することができる。

30

40

【0184】

[213] 例えば、修飾 snRNA は、NMDエクソン（例えば、PHIP のエクソン 15x（例えば、PHIP のエクソン（GRCh38/hg38: chr6 79004373~79004436）））の上流にあるイントロン配列に対して相補的である1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾することができる。例えば、修飾 snRNA は、NMDエクソン（例えば、PHIP のエクソン 15x（例えば、PHIP のエクソン（GRCh38/hg38: chr6 79004373~79004436）））の上流にあるイントロン配列のスプライス部位に対して相補的である1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾することができる。例えば、修飾 snRNA は、NMDエクソン（例えば、PHIP のエクソン 15x（例えば、PHIP のエクソン（GRCh38/hg38: chr6 79004373~79004436）））の上流にあるイントロン配列のスプライス部位に対して相補的である1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾することができる。

50

Pのエクソン15x(例えば、PHIPのエクソン(GRCh38/hg38:chr679004373~79004436))の上流にあるイントロン配列の3'スプライス部位に対して相補的である1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾することができる。例えば、修飾snRNAは、NMDエクソン(例えば、PHIPのエクソン15x(例えば、PHIPのエクソン(GRCh38/hg38:chr679004373~79004436))の上流にあるイントロン配列の5'スプライス部位に対して相補的である1本鎖ヌクレオチド配列を含むように修飾することができる。

【0185】

[214]一部の実施形態では、方法及び組成物を使用して処置される対象は、状態の向上に関して、当技術分野で公知かつ記載されている任意の方法を使用して評価される。

10

エクソンスキッピングを誘導するさらなるASOを同定する方法

[215]PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体のエクソンスキッピング誘導するASOを同定又は決定するための方法も、本開示の範囲内である。例えば、方法は、PHIP NMDエクソン含有mRNA前駆体の偽エクソンスキッピング誘導するASOを同定又は決定することを含むことができる。mRNA前駆体の標的領域内の異なるヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするASOは、標的イントロンのスプライシングの速度及び/又は範囲を向上させるASOを同定又は決定するためにスクリーニングされてもよい。一部の実施形態では、ASOは、スプライシングリプレッサー/サイレンサーの結合部位を遮断又は干渉してもよい。当技術分野で公知の任意の方法は、エクソンの標的領域にハイブリダイズした場合に所望の効果(例えば、偽エクソンスキッピング、タンパク質又は機能性RNA産生)を結果的にもたらすASOを同定(決定)するために使用してもよい。これらの方法は、包含エクソン又は非包含エクソンと隣り合うイントロンにおける標的化領域に結合することによって包含エクソンのエクソンスキッピングを誘導するASOを同定するためにも使用することができる。使用され得る方法の1例は以下に提供される。

20

【0186】

[216]ASO「歩行」と称される1ラウンドのスクリーニングは、mRNA前駆体の標的領域にハイブリダイズするように設計されたASOを使用して実施してもよい。例えば、ASO歩行に使用されるASOは、包含エクソンの3'スプライス部位のおよそ100ヌクレオチド上流(例えば、標的/包含エクソンの上流に位置するエクソンの配列の一部)から標的/包含エクソンの3'スプライス部位のおよそ100ヌクレオチド下流まで、及び/又は包含エクソンの5'スプライス部位のおよそ100ヌクレオチド上流から標的/包含エクソンの5'スプライス部位のおよそ100ヌクレオチド下流(例えば、標的/包含エクソンの下流に位置するエクソンの配列の一部)まで、5ヌクレオチドごとにタイリングすることができる。例えば、15ヌクレオチド長の第1のASOは、標的/包含エクソンの3'スプライス部位に対して+6~+20の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もよい。第2のASOは、標的/包含エクソンの3'スプライス部位に対して+11~+25の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もよい。ASOは、mRNA前駆体の標的領域にまたがるようなものとして設計される。実施形態では、ASOはより綿密に、例えば、1、2、3、又は4ヌクレオチドごとにタイリングすることができる。さらに、ASOは、5'スプライス部位の100ヌクレオチド下流から3'スプライス部位の100ヌクレオチド上流までタイリングすることができる。一部の実施形態では、ASOは、3'スプライス部位の約1,160ヌクレオチド上流から5'スプライス部位の約500ヌクレオチド下流までタイリングすることができる。一部の実施形態では、ASOは、3'スプライス部位の約500ヌクレオチド上流から3'スプライス部位の約1,920ヌクレオチド下流までタイリングすることができる。

30

40

【0187】

[217]1種以上のASO、又は対照ASO(標的領域にハイブリダイズすることが予期されていない配列であるスクランブル配列を有するASO)は、例えばトランスフェクシ

50

ョンによって、標的 mRNA 前駆体（例えば、本明細書に記載される NMD エクソン含有 mRNA 前駆体）を発現する疾患関連細胞株へ送達される。各々の ASO のエクソンスキッピング効果は、当技術分野で公知の任意の方法によって、例えばスプライス接合部にまたがるプライマーを使用する逆転写（RT）-PCR によって、実施例 2 に記載されるように評価してもよい。ASO 処理細胞における、包含エクソンを含有する（例えば NMD エクソンの隣り合うエクソンを含む）領域にまたがるプライマーを使用して産生された、対照 ASO 処理細胞と比較してより長い RT-PCR 産物の低減又は非存在は、標的 NMD エクソンのスプライシングが增強されたことを指し示す。一部の実施形態では、エクソンスキッピング効率（又は NMD エクソンを含有するイントロンをスプライスするスプライシング効率）、スプライスされた mRNA 前駆体のスプライスされていない mRNA 前駆体に対する比、スプライシングの速度、又はスプライシングの範囲は、本明細書に記載される ASO を使用して向上させ得る。標的 mRNA 前駆体によってコードされるタンパク質又は機能性 RNA の量もまた、各 ASO が所望の効果を達成したか（例えば、機能性タンパク質産生を增強したか）否かを決定するために評価することができる。タンパク質産生を評価及び/又は定量化するための当技術分野で公知の任意の方法、例えばウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡法、及び ELISA が使用され得る。

10

【0188】

[218] ASO 「マイクロ歩行」と称される第 2 ラウンドのスクリーニングは、mRNA 前駆体の標的領域にハイブリダイズするように設計された ASO を使用して実施してもよい。ASO マイクロ歩行に使用される ASO は、ASO とハイブリダイズした場合にエクソンスキッピング（又は NMD エクソンの增強されたスプライシング）を結果的にもたらず mRNA 前駆体のヌクレオチド酸配列をさらに改良するために、1 ヌクレオチドごとにタイリングされる。

20

【0189】

[219] 標的イントロンのスプライシングを促進する ASO によって規定された領域は、1 ヌクレオチドステップの間隔で並べられた ASO を伴う ASO 「マイクロ歩行」、及びより長い、典型的には 18 ~ 25 ヌクレオチドの ASO によって、より詳細に探索される。

【0190】

[220] 上で ASO 歩行に関して記載されたように、ASO マイクロ歩行は、1 種以上の ASO、又は対照 ASO（標的領域にハイブリダイズすることが予想されない配列であるスクランブル配列を有する ASO）を、例えばトランスフェクションによって、標的 mRNA 前駆体を発現する疾患関連細胞株へ送達することによって実施される。各々の ASO のスプライシング誘導効果は、当技術分野で公知の任意の方法によって、例えば NMD エクソンにまたがるプライマーを使用する逆転写（RT）-PCR によって、本明細書に記載されるように評価してもよい（例えば実施例 2 を参照のこと）。ASO 処理細胞における、NMD エクソンにまたがるプライマーを使用して産生された、対照 ASO 処理細胞におけるものと比較してより長い RT-PCR 産物の低減又は非存在は、エクソンスキッピング（又は NMD エクソンを含有する標的イントロンのスプライシング）が增強されたことを指し示す。一部の実施形態では、エクソンスキッピング効率（又は NMD エクソンを含有するイントロンをスプライスするスプライシング効率）、スプライスされた mRNA 前駆体のスプライスされていない mRNA 前駆体に対する比、スプライシングの速度、又はスプライシングの範囲は、本明細書に記載される ASO を使用して向上させ得る。標的 mRNA 前駆体によってコードされるタンパク質又は機能性 RNA の量もまた、各 ASO が所望の効果を達成したか（例えば、機能性タンパク質産生を增強したか）否かを決定するために評価することができる。タンパク質産生を評価及び/又は定量化するための当技術分野で公知の任意の方法、例えばウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡法、及び ELISA が使用され得る。

30

40

【0191】

50

[221] mRNA前駆体の領域にハイブリダイズした場合にエクソンスキッピング（又はNMDエクソンを含有するイントロンの増強されたスプライシング）及び増加したタンパク質産生を結果的にもたらずASOは、動物モデル、例えば、全長ヒト遺伝子がノックインされたトランスジェニックマウスモデル、又は疾患のヒト化マウスモデルを使用して、インビボで試験してもよい。ASOの好適な投与経路は、疾患、及び/又はASOの送達
10
が所望される細胞型に応じて変えてもよい。ASOは、例えば、硝子体内注射、髄腔内注射、脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、又は静脈内注射によって投与され得る。投与後、モデル動物の細胞、組織、及び/又は器官は、ASO処置の効果を決定するために、例えば当技術分野で公知かつ本明細書に記載されている方法によってスプライシング（例えば、効率、速度、範囲）及びタンパク質産生を評価することによって、評価
10
することができる。動物モデルはまた、疾患又は疾患重症度の任意の表現型又は行動指標にもなり得る。

【0192】

[222]NMD阻害剤、例えば、シクロヘキシミドの存在下においてNMD誘導エクソンを同定又は認証する方法も本開示の範囲内である。例示的な方法は、実施例3に提供される。

具体的な実施形態

実施形態1。 標的遺伝子から転写され、ナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソン（NMDエクソン）を含むmRNA前駆体を有する細胞において標的タンパク質の発現を調節する方法であって、薬剤又は薬剤をコードするベクターを細胞に接触させ、それ
20
によって薬剤がmRNA前駆体からのNMDエクソンのスプライシングを調節し、それにより、mRNA前駆体からプロセシングされるプロセシングされたmRNAのレベルを調節し、そして細胞において標的タンパク質の発現を調節することを含み、標的遺伝子はPHIP遺伝子である、前記方法。

【0193】

実施形態2。 薬剤が、
a. mRNA前駆体の標的化部分に結合するか、
b. NMDエクソンのスプライシングに関与する因子の結合を調節するか、又は
c. (a)及び(b)の組合せである、
実施形態1に記載の方法。
30

【0194】

実施形態3。 薬剤が、NMDエクソンのスプライシングに関与する因子の、標的化部分の領域への結合に干渉する、実施形態2に記載の方法。

【0195】

実施形態4。 mRNA前駆体の標的化部分がNMDエクソンの近位にある、実施形態2に記載の方法。

【0196】

実施形態5。 mRNA前駆体の標的化部分が、NMDエクソンの5'末端の、最大で約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約
40
300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド上流にある、実施形態2に記載の方法。

【0197】

実施形態6。 mRNA前駆体の標的化部分が、NMDエクソンの5'末端の、少なくとも約1500ヌクレオチド、約1000ヌクレオチド、約800ヌクレオチド、約700
50
ヌクレオチド、約600ヌクレオチド、約500ヌクレオチド、約400ヌクレオチド、約300ヌクレオチド、約200ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、約80ヌクレオチド、約70ヌクレオチド、約60ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約10ヌクレオチド、約5ヌクレオチド

チド、約 4 ヌクレオチド、約 2 ヌクレオチド、約 1 ヌクレオチド上流にある、実施形態 2 に記載の方法。

【0198】

実施形態 7。 mRNA 前駆体の標的化部分が、NMD エクソンの 3' 末端の、最大で約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド下流にある、実施形態 2 に記載の方法。

【0199】

実施形態 8。 mRNA 前駆体の標的化部分が、NMD エクソンの 3' 末端の、少なくとも約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド、約 40 ヌクレオチド、約 30 ヌクレオチド、約 20 ヌクレオチド、約 10 ヌクレオチド、約 5 ヌクレオチド、約 4 ヌクレオチド、約 2 ヌクレオチド、約 1 ヌクレオチド下流にある、実施形態 2 に記載の方法。

【0200】

実施形態 9。 mRNA 前駆体の標的化部分が、ゲノム部位 GRCh38/hg38: chr6:79004373 の、最大で約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド上流にある、実施形態 2 に記載の方法。

【0201】

実施形態 10。 mRNA 前駆体の標的化部分が、ゲノム部位 GRCh38/hg38: chr6:79004373 の、約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド上流にある、実施形態 2 に記載の方法。

【0202】

実施形態 11。 mRNA 前駆体の標的化部分が、ゲノム部位 GRCh38/hg38: chr6:79004436 の、最大で約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド下流にある、実施形態 2 に記載の方法。

【0203】

実施形態 12。 mRNA 前駆体の標的化部分が、ゲノム部位 GRCh38/hg38: chr6:79004436 の、約 1500 ヌクレオチド、約 1000 ヌクレオチド、約 800 ヌクレオチド、約 700 ヌクレオチド、約 600 ヌクレオチド、約 500 ヌクレオチド、約 400 ヌクレオチド、約 300 ヌクレオチド、約 200 ヌクレオチド、約 100 ヌクレオチド、約 80 ヌクレオチド、約 70 ヌクレオチド、約 60 ヌクレオチド、約 50 ヌクレオチド下流にある、実施形態 2 に記載の方法。

【0204】

実施形態 13。 mRNA 前駆体の標的化部分が、mRNA 前駆体の 2 つのカノニカルなエクソン領域の間のイントロン領域に位置し、イントロン領域が NMD エクソンを含む、実施形態 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0205】

実施形態14。 mRNA前駆体の標的化部分が、NMDエクソンと少なくとも部分的に重複する、実施形態2に記載の方法。

【0206】

実施形態15。 mRNA前駆体の標的化部分が、NMDエクソンの上流又は下流のイントロンと少なくとも部分的に重複する、実施形態2に記載の方法。

【0207】

実施形態16。 mRNA前駆体の標的化部分が、5' NMDエクソン - イントロン接合部又は3' NMDエクソン - イントロン接合部を含む、実施形態2に記載の方法。

【0208】

実施形態17。 mRNA前駆体の標的化部分がNMDエクソン内にある、実施形態2に記載の方法。

【0209】

実施形態18。 mRNA前駆体の標的化部分が、NMDエクソンの約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30個、又はそれより多い連続するヌクレオチドを含む、実施形態2に記載の方法。

【0210】

実施形態19。 NMDエクソンが、(a)配列番号2に対して少なくとも80%、少なくとも90%、若しくは100%の配列同一性を有するイントロン配列内にある、及び/又は(b)配列番号3に対して少なくとも80%、少なくとも90%、若しくは100%の配列同一性を有する配列を含む、実施形態1~18のいずれか1つに記載の方法。

【0211】

実施形態20。 NMDエクソンが配列番号3の配列を含む、実施形態1~18のいずれか1つに記載の方法。

【0212】

実施形態21。 mRNA前駆体の標的化部分が、ナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソンGRC h38 / hg38 : chr6 79004373 ~ 79004436内にある、実施形態2に記載の方法。

【0213】

実施形態22。 mRNA前駆体の標的化部分が、ナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソンGRC h38 / hg38 : chr6 79004373 ~ 79004436の上流又は下流にある、実施形態2に記載の方法。

【0214】

実施形態23。 mRNA前駆体の標的化部分が、ナンセンス変異依存RNA分解機構誘導エクソンGRC h38 / hg38 : chr6 79004373 ~ 79004436のエクソン - イントロン接合部を含む、実施形態2に記載の方法。

【0215】

実施形態24。 プロセッシングされたmRNAから発現する標的タンパク質が、全長PHIPタンパク質又は野生型PHIPタンパク質である、実施形態1~23のいずれか1つに記載の方法。

【0216】

実施形態25。 プロセッシングされたmRNAから発現する標的タンパク質が、機能性PHIPタンパク質である、実施形態1~23のいずれか1つに記載の方法。

【0217】

実施形態26。 プロセッシングされたmRNAから発現する標的タンパク質が、野生型PHIPタンパク質と比較して少なくとも部分的に機能性である、実施形態1~23のいずれか1つに記載の方法。

【0218】

実施形態27。 プロセッシングされたmRNAから発現する標的タンパク質が、全長野

10

20

30

40

50

生型 P H I P タンパク質と比較して少なくとも部分的に機能性である、実施形態 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 1 9 】

実施形態 2 8。 プロセシングされた m R N A から発現する標的タンパク質が、ナンセンス変異依存 R N A 分解機構誘導エクソン G R C h 3 8 / h g 3 8 : c h r 6 7 9 0 0 4 3 7 3 ~ 7 9 0 0 4 4 3 6 によってコードされるアミノ酸配列を欠く P H I P タンパク質である、実施形態 1 ~ 2 3 又は 2 5 ~ 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 2 0 】

実施形態 2 9。 m R N A 前駆体からの N M D エクソンの排除を促進する、実施形態 1 ~ 2 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【 0 2 2 1 】

実施形態 3 0。 薬剤と接触させた細胞における m R N A 前駆体からの N M D エクソンの排除が、薬剤が存在しない場合と比較して、約 1 . 1 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 5 ~ 約 1 0 倍、約 2 ~ 約 1 0 倍、約 3 ~ 約 1 0 倍、約 4 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 1 ~ 約 5 倍、約 1 . 1 ~ 約 6 倍、約 1 . 1 ~ 約 7 倍、約 1 . 1 ~ 約 8 倍、約 1 . 1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3 . 5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、又は少なくとも約 1 0 倍増加する、実施形態 2 9 に記載の方法。

20

【 0 2 2 2 】

実施形態 3 1。 細胞においてプロセシングされた m R N A のレベルの増加をもたらす、実施形態 1 ~ 3 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 2 3 】

実施形態 3 2。 薬剤と接触させた細胞におけるプロセシングされた m R N A のレベルが、薬剤が存在しない場合と比較して、約 1 . 1 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 5 ~ 約 1 0 倍、約 2 ~ 約 1 0 倍、約 3 ~ 約 1 0 倍、約 4 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 1 ~ 約 5 倍、約 1 . 1 ~ 約 6 倍、約 1 . 1 ~ 約 7 倍、約 1 . 1 ~ 約 8 倍、約 1 . 1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3 . 5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、又は少なくとも約 1 0 倍増加する、実施形態 3 1 に記載の方法。

30

【 0 2 2 4 】

実施形態 3 3。 細胞において標的タンパク質の発現の増加をもたらす、実施形態 1 ~ 3 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 2 5 】

実施形態 3 4。 薬剤と接触させた細胞におけるプロセシングされた m R N A から発現する標的タンパク質のレベルが、薬剤が存在しない場合と比較して、約 1 . 1 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 5 ~ 約 1 0 倍、約 2 ~ 約 1 0 倍、約 3 ~ 約 1 0 倍、約 4 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 1 ~ 約 5 倍、約 1 . 1 ~ 約 6 倍、約 1 . 1 ~ 約 7 倍、約 1 . 1 ~ 約 8 倍、約 1 . 1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3 . 5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、又は少なくとも約 1 0 倍増加する、実施形態 3 3 に記載の方法。

40

【 0 2 2 6 】

実施形態 3 5。 薬剤が、配列番号 4 ~ 1 8 0 から成る群より選択される配列に対して少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーを含む、実施形態 1 ~ 3 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

50

【0227】

実施形態36。薬剤が遺伝子編集分子をさらに含む、実施形態1～34のいずれか1つに記載の方法。

【0228】

実施形態37。遺伝子編集分子がCRISPR-Cas9を含む、実施形態36に記載の方法。

【0229】

実施形態38。薬剤がアンチセンスオリゴマー(ASO)であり、アンチセンスオリゴマーが、ホスホロチオエート連結又はホスホロジアミデート連結を含む骨格修飾を含む、実施形態1～37のいずれか1つに記載の方法。

10

【0230】

実施形態39。薬剤がアンチセンスオリゴマー(ASO)であり、アンチセンスオリゴマーが、ホスホロジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2'-O-メチル部分、2'-フルオロ部分、2'-NMA部分、又は2'-O-メトキシエチル部分を含む、実施形態1～38のいずれか1つに記載の方法。

【0231】

実施形態40。薬剤がアンチセンスオリゴマー(ASO)であり、アンチセンスオリゴマーが少なくとも1つの修飾糖部分を含む、実施形態1～39のいずれか1つに記載の方法。

【0232】

実施形態41。各糖部分が修飾糖部分である、実施形態40に記載の方法。

20

【0233】

実施形態42。薬剤がアンチセンスオリゴマー(ASO)であり、アンチセンスオリゴマーが、8～50核酸塩基、8～40核酸塩基、8～35核酸塩基、8～30核酸塩基、8～25核酸塩基、8～20核酸塩基、8～15核酸塩基、9～50核酸塩基、9～40核酸塩基、9～35核酸塩基、9～30核酸塩基、9～25核酸塩基、9～20核酸塩基、9～15核酸塩基、10～50核酸塩基、10～40核酸塩基、10～35核酸塩基、10～30核酸塩基、10～25核酸塩基、10～20核酸塩基、10～15核酸塩基、11～50核酸塩基、11～40核酸塩基、11～35核酸塩基、11～30核酸塩基、11～25核酸塩基、11～20核酸塩基、11～15核酸塩基、12～50核酸塩基、12～40核酸塩基、12～35核酸塩基、12～30核酸塩基、12～25核酸塩基、12～20核酸塩基、又は12～15核酸塩基から成る、実施形態1～41のいずれか1つに記載の方法。

30

【0234】

実施形態43。薬剤をコードするベクターを細胞に接触させることを含み、ベクターがウイルスベクターである、実施形態1に記載の方法。

【0235】

実施形態44。ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス(HSV)ウイルスベクター、又はレトロウイルスベクターを含む、実施形態43に記載の方法。

40

【0236】

実施形態45。ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを含む、実施形態43に記載の方法。

【0237】

実施形態46。薬剤が修飾snRNAを含む、実施形態1に記載の方法。

【0238】

実施形態47。修飾ヒトsnRNAが修飾U1 snRNAである、実施形態46に記載の方法。

【0239】

実施形態48。修飾ヒトsnRNAが修飾U7 snRNAである、実施形態46に

50

記載の方法。

【0240】

実施形態49。修飾ヒトsnRNAの1本鎖ヌクレオチド配列の一部が、mRNA前駆体の標的化部分に結合する配列を含む、実施形態46に記載の方法。

【0241】

実施形態50。修飾snRNAをコードするベクターを細胞に接触させることを含む、実施形態46～49のいずれか1つに記載の方法。

【0242】

実施形態51。標的タンパク質のmRNAレベル又は発現レベルを評価することをさらに含む、実施形態1～50のいずれか1つに記載の方法。

【0243】

実施形態52。薬剤が治療剤である、実施形態1～51のいずれか1つに記載の方法。

【0244】

実施形態53。実施形態52に記載の治療剤又は実施形態52に記載の治療剤をコードするベクターと、薬学的に許容される賦形剤とを含む、医薬組成物。

【0245】

実施形態54。治療剤又は治療剤をコードするベクターと、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物であって、治療剤が、配列番号4～180から成る群より選択される配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーを含む、前記医薬組成物。

【0246】

実施形態55。治療剤が、配列番号55～180から成る群より選択される配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%、又は100%の配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーを含む、実施形態54に記載の医薬組成物。

【0247】

実施形態56。脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、髄腔内注射、皮下注射、経口投与、滑膜注射、硝子体内投与、網膜下注射、局所適用、移植、又は静脈内注射用に製剤化される、実施形態53～55のいずれか1つに記載の医薬組成物。

【0248】

実施形態57。髄腔内注射又は脳脊髄内注射用に製剤化される、実施形態53～55のいずれか1つに記載の医薬組成物。

【0249】

実施形態58。第2の治療剤をさらに含む、実施形態53～57のいずれか1つに記載の医薬組成物。

【0250】

実施形態59。第2の治療剤が低分子を含む、実施形態58に記載の医薬組成物。

【0251】

実施形態60。第2の治療剤がアンチセンスオリゴマーを含む、実施形態58に記載の医薬組成物。

【0252】

実施形態61。第2の治療剤がイントロン保持を是正する、実施形態58に記載の医薬組成物。

【0253】

実施形態62。配列番号4～180から成る群より選択される配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーを含む組成物であって、アンチセンスオリゴマーが、骨格修飾、糖部分修飾、又はそれらの組合せを含む、前記組成物。

【0254】

実施形態63。アンチセンスオリゴマーを含むポリヌクレオチドをコードするウイルスベクターを含む組成物であって、アンチセンスオリゴマーが、配列番号4～180から成る群より選択される配列からなる、前記組成物。

10

20

30

40

50

【0255】

実施形態64。ポリヌクレオチドが修飾snRNAをさらに含む、実施形態63に記載の組成物。

【0256】

実施形態65。修飾ヒトsnRNAが修飾U1 snRNAである、実施形態64に記載の組成物。

【0257】

実施形態66。修飾ヒトsnRNAが修飾U7 snRNAである、実施形態64に記載の組成物。

【0258】

実施形態67。アンチセンスオリゴマーが、配列番号55～180から成る群より選択される配列に対して少なくとも80%、少なくとも90%、又は100%の配列同一性を有する、実施形態62又は63に記載の組成物。

【0259】

実施形態68。疾患若しくは病態を処置すること又は疾患若しくは病態を発生する可能性を低下させることを必要とする対象の細胞内で標的タンパク質の発現を調節することによって、対象において疾患若しくは病態を処置するか又は疾患若しくは病態を発生する可能性を低下させる方法であって、対象の細胞に実施形態53～61のいずれか1つに記載の医薬組成物を接触させることを含む、前記方法。

【0260】

実施形態69。疾患又は病態が、PHIP遺伝子における機能喪失型変異に関連する、実施形態68に記載の方法。

【0261】

実施形態70。疾患又は病態が、PHIP遺伝子のハプロ不全に関連し、対象が、機能性PHIPタンパク質をコードする第1のアレル、及びPHIPタンパク質が産生されないか若しくは低減したレベルで産生される第2のアレル、又は非機能性PHIPタンパク質若しくは部分的に機能性PHIPタンパク質をコードする第2のアレルを有する、実施形態68又は69に記載の方法。

【0262】

実施形態71。疾患又は病態が知的障害疾患又は病態を含む、実施形態68～70のいずれか1つに記載の方法。

【0263】

実施形態72。疾患又は病態が、Chung-Janssen症候群(CHUJANS)、常染色体優性障害、知的障害、発話遅延、不安、自閉症スペクトラム障害(ASD)、注意欠陥多動性障害(ADHD)、攻撃行動、顔面異形、カフェオレ斑、PHIPハプロ不全によって引き起こされる過体重症候群、発達遅延、肥満、又は異形症を含む、実施形態68～70のいずれか1つに記載の方法。

【0264】

実施形態73。疾患又は病態がChung-Janssen症候群を含む、実施形態68～70のいずれか1つに記載の方法。

【0265】

実施形態74。疾患又は病態が知的障害を含む、実施形態68～70のいずれか1つに記載の方法。

【0266】

実施形態75。疾患又は病態がPHIP遺伝子の常染色体劣性変異に関連し、対象が、(i)PHIPタンパク質が産生されないか、若しくは野生型アレルと比較して低減したレベルで産生される、又は(ii)産生されるPHIPタンパク質が非機能性であるか、若しくは野生型アレルと比較して部分的に機能性である、第1のアレル、及び

10

20

30

40

50

(i i i) P H I P タンパク質が野生型アレルと比較して低減したレベルで産生され、産生される P H I P タンパク質が野生型アレルと比較して少なくとも部分的に機能性である、又は

(i v) 産生される P H I P タンパク質が野生型アレルと比較して部分的に機能性である、
第 2 のアレル、
を有する、実施形態 6 8 又は 6 9 に記載の方法。

【 0 2 6 7 】

実施形態 7 9。対象がヒトである、実施形態 6 8 ~ 7 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 6 8 】

実施形態 8 0。対象が非ヒト動物である、実施形態 6 8 ~ 7 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 6 9 】

実施形態 8 1。対象が胎児、胚、又は小児である、実施形態 6 8 ~ 7 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 7 0 】

実施形態 8 2。細胞がエクスピボである、実施形態 6 8 ~ 7 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 7 1 】

実施形態 8 3。医薬組成物が、脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、髄腔内注射、皮下注射、経口投与、滑膜注射、硝子体内投与、網膜下注射、局所適用、移植、又は静脈内注射によって投与される、実施形態 6 8 ~ 7 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 7 2 】

実施形態 8 4。医薬組成物が、髄腔内注射又は脳脊髄内注射によって投与される、実施形態 6 8 ~ 7 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 7 3 】

実施形態 8 5。疾患又は病態を処置する、実施形態 6 8 ~ 7 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 7 4 】

実施形態 8 6。標的遺伝子から転写されかつナンセンス変異依存 RNA 分解機構誘導エクソン (N M D エクソン) を含む m R N A 前駆体からの N M D エクソンのスプライシングを調節し、それにより、m R N A 前駆体からプロセシングされるプロセシングされた m R N A のレベルを調節し、そして m R N A 前駆体を有する細胞において標的タンパク質の発現を調節する薬剤又は該薬剤をコードするベクターを含む組成物であって、標的遺伝子が P H I P 遺伝子である、前記組成物。

【 0 2 7 5 】

実施形態 8 7。標的遺伝子から転写されかつナンセンス変異依存 RNA 分解機構誘導エクソン (N M D エクソン) を含む m R N A 前駆体からの N M D エクソンのスプライシングを調節し、それにより、m R N A 前駆体からプロセシングされるプロセシングされた m R N A のレベルを調節し、そして疾患又は病態の処置を必要とする対象の細胞において標的タンパク質の発現を調節することによって、対象において疾患又は病態を処置する薬剤又は該薬剤をコードするベクターを含む組成物であって、標的遺伝子が P H I P 遺伝子である、前記組成物。

【 0 2 7 6 】

実施形態 8 8。実施形態 8 4 又は 8 5 に記載の組成物と、薬学的に許容される賦形剤及び / 又は送達ビヒクルとを含む、医薬組成物。

【 0 2 7 7 】

実施形態 8 9。標的タンパク質がプレクストリン相同ドメイン相互作用タンパク質 (P H I P) である、実施形態 1 ~ 8 8 のいずれか 1 つに記載の方法又は組成物又は医薬組成物。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0278】

[223]本開示は以下の実施例によってより具体的に例証されるだろう。しかしながら、本開示はこれらの実施例によっていかなる形でも限定されないことが理解されるべきである。

実施例1：配列決定を使用するRNAseqによる、転写物におけるNMD誘導エクソン包含事象の同定

[224]全トランスクリプトームショットガン配列決定を、RNA配列決定を使用して実行して、本明細書に記載される遺伝子によって産生された転写物のスナップショットを明らかにし、NMDエクソン包含事象を同定した。この目的のために、シクロヘキシミド(CHX)又はDMSO対照を用いて処理したヒト神経系前駆細胞(ReN)及びヒトアストロサイトの核及び細胞質画分に由来するポリA⁺ RNAを単離し、cDNAライブラリーを、IlluminaのTruSeqストランドmRNAライブラリー調製キットを使用して構築する。ライブラリーをペアエンド配列決定し、ヒトゲノム(2017年12月、GRCh38/hg38アセンブリ)にマッピングされる100ヌクレオチドの読取りを結果として得る。図3は、PHIP遺伝子における例示的なナンセンス変異依存mRNA分解機構(NMD)誘導エクソンの同定を示す。

10

【0279】

[225]例示的な遺伝子及びイントロン配列を表1にまとめる(配列番号は、遺伝子番号によって表される、対応するヌクレオチド配列を指し示す)。例示的なイントロンの配列を表2にまとめる。PHIPタンパク質配列を表3に提供する。表4、5及び6は、本開示のPHIPアンチセンスオリゴマーの配列を列挙する。

20

【0280】

【表1】

表1. 例示的な標的遺伝子配列の一覧

遺伝子名	遺伝子番号	配列番号	疾患	OMIM	遺伝的特徴	転写物
PHIP	55023	1	Chung-Jansen 症候群; 知的障害	612870	ハプロ不全	ENST00000275034

30

【0281】

【表2-1】

表2. mRNA前駆体転写物における例示的な標的イントロン/NMDエクソンの配列

遺伝子	配列番号	イントロン
PHIP イントロン 15配列	2	gtaattatcattctcttcattttatacctactaaagattgggagctttttgac aaagggtactctgcatgtcacaaggaaatccatttaaaaattggttcattat tgactttaaaattcccatcaataaagaatgatttattccacacttttattgacat gctgaatttaaaagaaaattaattgtgcataattacagtgcctgtacattgtgat aactgatacagttttatcagtttttagcagtgaaactttggaaattcacaagtat gaagatacaatatagagaagaaaaatacttggaaaaccatgtgaagaaattat aaataaatactcgtattattgtacttgtttaaatagtcttctagcacaatagaat tttactcaagtacactgattttaaaattaaggccaagaatcaagcatttcttg

40

【0282】

50

【表 2 - 2】

	<p>cttttaatcaattggtagtataatataatatttgagtttatactcttctctcac atthttgtttcttagatgttaacataatggccaagtatttgaattacaagtgtt taataatacacatacaacttacccagcagtgttcttactgtatgaagat taaggctctcctcaactactgcagtttggttagtcaattttttaaaagtctact ttctgtataatagagataccttccaacaaagaacaaaagaaaaaacagttcca ctatttcagcatgtttaaattttttaaaaaaccaattagaatacttttagta atgaaccataaaacaatacaattagtacctgtggtcagaattattttgccaat aaattatttcacaaaacagttgtgaacatggtttgtaaaaaattacacgaat gtgatgctatgcttgattgataatcagagtaaagttaattctatgctcgtgagta agcagataataatagcagatttttagtgagggaatagcttagctatctttaa ggctgtgcttagaatacattaggtaagaaataaggtttgtaaaaccctctatt tctagaaaacagtgtaattattttgggtgacactgttagtgaaggatggatt cctttgtgattgtattgagatttttttaaaagccactgtaaatagctagta aaaaataatctctgctttctatccttggtttctgatttgctctcttttgga tatctgttgaataaggaaattagtcattctcaatctgcttttagcttaaaa aaaataatagtgagctataataatactagtggcttcatttagtagtttgtat ttccaaaggacattattatgttagtagtgggtggagggaactttctccca taattgaataccgcttaactttcagttataaaagtgaaatttcccttact aggttaagttggtcacactaatactacctttcagtagatacaaaaaactgca gcaacttgagagtaagtgattgctcttagaccattaaaaattagtaagttaa ccaggagtagaagtcagccataataatgttataattttaaaaattagctgagg gattgggtacattactgcttcaaaaattggttattgtttaaataagagtgtaga taggataatttctggttctttttatggataagagataggaaaactcaaaaga gcagaagaacaaaacatagtataaagttgaaatggatagtagtattcagaaatg cagacagtgagcaaaacataaaccaaaaaagctaaaaaacagaaagtgagccac ccttctatctcaataaaaataagatactacctttaaattttttgtagtagtttaa tggtttccaaaaatgctcccacatattttacctcctttgggtctcatgaaaact tgtaagatgatcaagatagattttattttctggtcttaggaatggagaaact gtacattacagagataaagtgctttgccccaaattactgagttcacacagctat tatgogggcactggagcaataaccatgactctgggtgtagtactcaaatctgtc atggttggctttttgagctttttgtcaatggttactgcatagctaaacttttaacaa tactcagtttagtgaatgctcagaaagaaatggtttcacaatggtaataaatct gagtggaatctttgacatctactctttaaactgatttttttctctgctgctct tttatgagttatcattgcoctaaatctttttgctcttcaactctttttgttctt ttcatgctgtttttattatgggcaaatggaagataaagcattocagcattgct attaagaaaaataagagaaacaaatccagggaggccctgogttctcaactgcttg ctatcatgaaatgttagtatttggtataatattagctattttggctctctgtagc taatacaataagttttcagttactaaaaaccacgatacttgaatgcatacaaa tttaactccctaaatgtaagttgttagtagtaatacacaagttcagtttagtaata ttttttgagcacaatgtaagggcttagtcatatagtgctttggctctattag aggatgaagaattctggggaaactcctttttgactagaaaaggtaaaagt atgtgaagtaatttttaagattaaataatctcagtgactgttaaaactgaag ttataaaaacagataagtaaacaccattccaccctacagctagaaaaaagga atgtagactatacctttagaataacagtttttagtacaatacttcttaaaactggt ttttatcaagtaatttttaagaatacttttaataatctctctgctttttgaaata ataatgaaatcttccattggaaatttatcctttgcaaaagataatggaaatca tgtaacataataattagtattttgtattcactcagcaatcttactgcaatttttgt gtaattatggaaaatgtaaatctttttttgaaattttagaaatagccaaaaatc ctgttatgttaaaaagcctttcaagtgaaaaggtaaaccttcaaaatgctgttt gatacaatagtaattacattttaataatttttaaataaagattataaaacatta atatttttaattgcaactgtagtcatcattgtaataagtaattctaaatttttt ctgtaacaaagcctgacttatacttttaaaaaatctctgtgctttattttggga ccatctaaatttgtcagcaaattaaagagtttgagattgggaattgagataaag ctatttagttctttatgtttaaataatcttactcattctgaaactcttaaaat ggattctcaacttcaagtagtattctccagagaacttgaggggtttattttct ttgttttactgctaaacttctctcctaaatagaggatctcaatgataaaaagcag tggggagtggtgctgggtttgtttttgttaacttaataagaagtaatagacaagt gagatgagtttttaaaagagcctaaatagggcagtaaaatggaaatagacagta atgtagctttagtactccccctaccctttctgttctctcatcttaactaaaaact tttaaaagcacttattgggaaagcctttgtgggtctttttgttgttgttgttt tcttttttaagtgaaacaggagagaacaaagagaaatttgttagaaaaatata tgagacaactttatctttaaacaacaaactacattctagacctcagtag tttatcttcttaacgaatcaactgaacagctcttacaataacttgagtagtctcaga ggaatgtagtagtataatggatattttactgaagcaagtagttagtataataaga</p>
--	---

10

20

30

40

【 0 2 8 3 】

【表 2 - 4】

	<p>taattttaaattttggagtaatttcttaggtaagatgctttcttctaatgaacgg tgtgcttaaaaaaaaaaaaaaaaaaagaacaagacatactgaccctgctaa tagaattgaaataactcttagaagaggatggcttgccaaagatagccatattt ttaacocctctacttttggttaaggttttctagaagcataacttctcata caactctctgataatcttoatgattgataaattgagatcctgaaatttagtat gcattctgcttttaataacttcaactccagatttgccagttttttcaacat acctttcagaacctcagatggtaggattttagaactggattcttagtgatcatt atctccatcattccacagagattaggtagatttacctattactgtaggagatg ctctgggctcttcgacctcattcctctgctcaatcattcattctctgctcagg aaaattaagttagttggtatagtagcctccctcaaaaaaggatttagtattct ttccttaatgagctcctcagagctcttagctcataagtttttgatcattta atctctttaaagtttagtataaatctctaaatgcttaacaagtttatactactc atcttatggtagtatttataagaattcttttagtcagtagagaatttcaaaata gggagctcattattttaacacatctgactcctccatctcctccttttaaaaaaa aacaaaaatacaataatgctgaataacttttatttctcttttactcctcttat ctttttgaaagttttcacagttactggtaaaactgctctcagatattctcag ctaaaccttattgataatttaagtctatgagctttatgtaggcttttattctat atatacaaaaagaatgcataacaagcactctgattttatttagaggaatagttca cttaaaatgcaactattttgataatctctcattacttatttagtttcaactat cttaatttttaactacaactgcagtaagtgctagctagcagaagaatatagtat gtattaaattttatggtgacacattttcttgatagcagtgcaatttaattttat gataggcttatatacctttcatttggtgagagagggtattttctttctggtttt gaagataaaccttactgctttcttagtagatgtaataatcaaaatagtgcttca tttaaaattttgctcttgagaaatcttactcataaaactttgaccttggtta aaaagataaaattctttcttttgattggcttacttaactgtaacatacatttt aaaaccagttaggctatttttagttaataatagagaaagtaaaatatttctctg tttataatcaataactggtttggaagcctggcttggaacacctagctgcaattta tagatagggtggtttattgctgaggaatctataaaatagagagttggctctt ttaattgtagaagtttagaggcacttttctaacctggtcctagtagtaaacgagat ctttttaaagcctccttttagtaaaaaaggttaatacaaaataatctctttct ttttctgataatgattgaaataactttcattttctccatataaaaagtcactt tggagttaaacagatgcttataccaagaaaataatctgctctgccaattct acaatgaaatggtttatataaggacacacaggaatcttaaatatgattgctattt ttctttgctcttttagagctttataagcctcaactgctcccaagattattca gagatctactaactgtaaaatggtgcaacattgataaaataagggtaaggggt gatcagctcactctgcccgcacacctcaacccccaaaaagaaaaatggttggt taaacaacacatagaaggaatcacatgcttaggaacatttatacagatttctttga aatgctaaaatggactactttcaagctcctcactcacttcaaatgtaactt agacttgtaattacttctggaacattttatagagtagatttataaagtagt tgctttttgttctctctctggtctctgtgaaattttgagtgaaactgagttaa aaaaaaaaactttaacaacacataggcctaaggcagtttcaatccccataatttta gtttttgataaaaagctatttttagagggtactttgttcaatggtttgcttat ttataacagttcattgtaactttttttttatttgcttaggaaaacactgaaaaa taaagactgaaatcctgaaattgtacttatagtcttcaatttttgcaaaatgct tagctgtatggctcctggtgccccttaggtaacttggaagaaatagttatattct ttctgtttttgaaatggttttaaagtagacttggaatcagttacctctctctcc tatcttatcactcctcaactttctctcactcogagatataatcctggttcaact atgattcatttctcttctttcttaagtttttggtgataatataaacattagataat ttctcagttttatctataatggtttacatttttttaaaagttatcttctcttt ctattattgtaaccaatcaaaaagagcattataagcaactggtgcaacattct cttttttagcaagccaaaaggaagagctagctttctttttgagggcagctccatt tgtggtattgtattacttcttaggtaagctcctttcttttatagaaatatttt ctctttttacaaaaatgcaaaccttcttgagaaatcagttattctctctctga attttaactctctgcaattgggtgaaactgtacatccatccttatgcccacatttta atactaaagaagaagttactacctttctcttttccaagcatttctctgggata ttactaaataagctcaattgttctagatcagtggaatccggaaacagaaaggag gtattcttaacctgataatggtggtggttcogattctgctaaatccagaaatcc aacagcattgttgaaaaatcactccttagttggtattgttagggagtcactcc ctatttagttggttctgaaatcagctccctagatggtgctttagatagggtaga atttttacctctttcagaacactgctaagaagttttcaactggaacatagctct gaagaagcactgagagcaaaaaatcagagtggtgattggccacctctgtttga ttgacagGTTGCAGGGAGGAAACCCATTCGTTCTGGATTAATGGAAC TGGAAAA CAGAAAA CAATTATCAGGtaaaaaaaaaactttctttaaactttgaaatcacc atttaaagacgagtcagactaccagggaattttatccaaaaataataaaatc</p>
--	--

10

20

30

40

【 0 2 8 5 】

【表 2 - 5】

		tagtgtcatttgagcaatgatctctggctactacttccaagaattaccaaaaa tccgtacagttgctacatgtcagcttttgcagaaaggcatgattgaacggaga tagatggagtgtaagacataattatgtgttaaatctgagtttaaacatgaagc agaattctatgggtgggggagttggtattcttttatttctgaattgtgtttgg ctgtggatagaataactttatttttcaaggctattaatctggcacttttcatga atattcataaattttattactgtacaatgcttgttttacttaactttcacttca ttaggatgtatgcttttattcttaaaattattgtaataatagtgaccaattcttt tcattttaatggtagttttcttactgtttggttaaaatattttcag
PHIP NMD エクソン 配列	3	GTTCAGGGAGGAAACCCATTCGTTCTGGATTAATGGAAGCTGGAAAACAGAAAA CAATTATCAG

10

【 0 2 8 6 】

【表 3】

表 3. PHIP タンパク質配列

遺伝子	配列番号	タンパク質配列
PHIP	162	MSCERKGLSELRSELYFLIARFLEDGPCQQAQVLIREVAEKELLPRRTDWTGK EHPRTYQNLVKYYRHLAPDHLLOI CHRLGPLEQEIQSVPGVQTLGAGRQSL LRTNKSCKHVVWKGSAALHCGRPPESPVNYGSPPSIADTLFSRKLNGKYRLE RLVPTAVYQHMKMHKRI LGHLSVYCVTFDRTGRRI FTGSDDCLVKI WATDDGR LLATLRGHAAEISDMAVNYENTMIAAGSCDKMIRVWCLRTCAPLAVLQGHSAI TSLQFSPLCSGSKRYLSSTGADGTICFWLWDAGTLKINPRPAKFTEPRPGVQM ICSSFSAGGMFLATGSTDHIRVYFFGSGQPEKISELEFHDTKVDISIQFSNTSN RFVSGSRDGTARIWQFKRREWKSILLDMATRPAGQNLQGIEDIKTKMKVMTMAV DRHDNTVITAVNNMTLKVWNSYTGQLIHVLMGHEDEVFVLEPHFPDPRVLFSA HDGNVIVWDLARGVKIRSYFNMI EGQGHGAVFDCKCSPDGQHFACITD SHGHLI FGFGSSSKYDKIADQMFHSDYRPLIRDANNFVLDEQTOQAPHLMPPFLVDVD GNPHPSRYQRLVPGRENCREEQLIPQMGVTSSGLNQVLSQQANQEI SPLDSMIQ RLQQEQDLRRSGEAVISNTSRLSRGSI SSTSEVHSPPNVGLRRSGQIEGVRQMH SNAPRSEIATERDLVAWSRRVVPELSAGVASRQEERWAKGEEIEKTYRSEEK RKHLTVPKENKIPTVSKNHAHEHFLDLGESKKQQTQNHNYRTRSAL EETPRPSE EIENGSSSSDEGEVAVVSGGTSEEEERAWHSDGSSSDYSSDYSDWTADAGINLQ PPKKVPKNKTKKAESSSDEEESEKQKQKQIKKEKKKVNEEKDGPISPKKKPK ERKQKRLAVGELTENGTLLEWLPSTWITDTIPRRCPFVPMGDEVVYFRQGHE AYVEMARKNKIYSINPKQPWHKMLELREQELMKIVGIKYEVLPTLCLKLAFL DPDTGKLTGGSFTMKYHMPDVIDFLVLRQQFDDAKYRRWNI GDRFRSVIDD AWWFGTIESQEPLQLEYPDSLFCYNCVWDNGDTEKMSPWDMEIIPNNAVFPEELG TSVPLTDGECRSLIYKPLDGEWGTNPRDEECERIVAGINQLMTLDIASAFVAPV DLQAYPMYCTVVAYPTDLSTIKQRL ENRFYRRVSSLMWEVRYIEHNTRTFNEPG SPIVKS AKFVTDLLLHFIDKQTCYNIIPLYNSMKKKVLS DSEDEEKDADVPGTS TRKRKDHQPRRRLRNRAQSYDIQAWKKQCELLNLI FQCEDSEPRFPVDLLEY PDYRDIIDTPMDFATVRETLEAGNYESPMELCKDVRLIFSNSKAYTPSKRSRIY SMSLRLSAFFEEHISVLSDYKSALRFHKNRNTITKRRKKRNRSSSVSSAASSP ERKKRILKPQLKSESSTSAFSTPTRSIPPRHNAAQINGKTESSSVVTRSNRVV VDPVVTEQPSTSSAAKFTITKANASAI PGKTILENSVKHSKALNTLSSPGQSSF SHGTRNSAKENMEKEKPVKRKMKSSVLPKASTLSKSSAVIEQGDCKNNALVPG TIQVNGHGGQPSKLVKRGPGRKPKEVNTNSGEI IHKKRGRKPKKLQYAKPEDL EQNNVHPIRDEVLPSSCTCNFLSETNNVKEDLLQKKNRGGRKPKRKMKTKQLDAD LLVPASVKVLRNRNKKIDDPIDEEEEFEELKGS EPHMRTRNQGRRTAFYNEDD SEEEQRQLLFEDTSLTFGTSSRGRVRKLT EKAKANLIGW

20

30

40

【 0 2 8 7 】

実施例 2 : シクロヘキシミド / プューロマイシン / DMSO 処理を介した NMD エクソンの確認

[226]水 (H)、DMSO 処理 (D)、又はプューロマイシン (P)、若しくはシクロヘキシミド処理 (C) したヒト胎児腎臓細胞 (HEK 293)、ヒト神経芽細胞 (SK -

50

N - A S)、及びヒト神経系前駆細胞 (R e N) に由来する総 R N A、並びに P H I P 遺伝子のエクソン 1 5 及び 1 6 におけるプライマーを使用する R T - P C R 分析を使用して、N M D 誘導エクソンに対応するバンドの存在を確認した。バンドの密度測定分析を実施して、総転写物の N M D エクソン包含%を算出した。N M D を阻害するための、シクロヘキシミド又はピューロマイシンを用いる細胞の処理は、N M D 誘導エクソンに対応する産物の増加をもたらすことができる。図 4 A は、H E K、S K - N - A S、及び R e N V M 細胞それぞれにおいて D M S O、シクロヘキシミド、又はピューロマイシン処理を使用した、P H I P 遺伝子転写物における例示的な N M D エクソンの確認を示す。U 8 7 細胞及びアストロサイトを、シクロヘキシミド (C)、ピューロマイシン (P)、又は D M S O (D) を用いて同様に処理した。P H I P 遺伝子のエクソン 1 5 及び 1 6 におけるプライマーを使用して、N M D 誘導エクソンに対応するバンドの存在を確認した。U 8 7 細胞及びアストロサイトに関する結果を図 4 B に示す。

10

【 0 2 8 8 】

[227] 同様の結果が、水 (H 2 O)、D M S O、シクロヘキシミド (C H X)、及びピューロマイシンを用いて処理したマウス胚性線維芽 (M E F) 細胞において見出された。4 つの異なる増幅サイクル (2 6、2 9、3 2、及び 3 5) を示す。N M D エクソン 1 5 x 包含は、図 4 C に示すように、M E F 細胞において保存されていることが見出された。

実施例 3 : P H I P N M D 事象は非ヒト霊長類において保存される

[228] R N A を、カニクイザル (*Macaca fascicularis*) の指し示された脳領域から抽出した。c D N A を生成し、目的の産物を、エクソン 1 5 における順方向プライマー及びエクソン 1 6 における逆方向プライマーを使用する P C R によって増幅した。2 つの異なる増幅サイクル (2 8 及び 3 1) を図 5 に示す。

20

実施例 4 : N M D エクソン領域 A S O 歩行

[229] A S O 歩行を、N M D エクソン領域に関して、3' スプライス部位の直ぐ上流の配列、3' スプライス部位を横断する配列、N M D エクソン、5' スプライス部位を横断する配列、及び 5' スプライス部位の下流の配列を標的とし、P S 骨格の 2' - M O E A S O を使用して実施した。A S O は、3ヌクレオチド離れた最後の 3' スプライス部位 A S O と最初のエクソン A S O、及び最後のエクソン A S O と最初の 5' スプライス部位 A S O を除いて一度に 5ヌクレオチド移動することによって、これらの領域を網羅するように設計した。図 6 は、例示的な P H I P N M D エクソン領域に関する A S O 歩行を示す。

30

【 0 2 8 9 】

[230] A S O の表示は以下の通りに説明することができる : I V S 1 4 X = N M D エクソンの直前のカノニカルなエクソン (カノニカルなエクソン 1 5) の後ろのカノニカルなイントロン (カノニカルなイントロン 1 5) のイントロン型配列部分。E x 1 5 X = N M D エクソン (カノニカルなイントロン 1 5 内)。I V S 1 5 X = N M D エクソンの直後かつ N M D エクソンの直後のカノニカルなエクソン (カノニカルなエクソン 1 6) の前のカノニカルなイントロン (カノニカルなイントロン 1 5) のイントロン型配列部分。A S O 歩行については、上記の名称を参照のこと。I V S 1 4 X 及び E x 1 5 X にまたがるか又は E x 1 5 X 及び I V S 1 5 X にまたがる A S O は、「 X X 」として表示されることに留意されたい。完全に E x 1 5 X の内部にある A S O は「 X X 」として表示されない。

40

実施例 5 : R T - P C R によって評価した N M D エクソン領域 A S O 歩行

[231] A S O 歩行配列を R T - P C R 及び T a q M a n q P C R によって評価した。処理された対照 A S O (「 模 擬 」 又は 「 - 」)、又は以下の表 4 に示す P H I P N M D エクソン領域を標的とする 2' - M O E A S O を、H E K 2 9 3 細胞に L i p o f e c t a m i n e R N A i M a x を使用してトランスフェクトしたが、又は R e N 細胞にヌクレオフェクトした。P H I P 非生産的 m R N A (R T - P C R) 及び生産的 m R N A (T a q M a n) に対応する産物を定量化し、内部対照に対して正規化し、対照と比べた変化倍数をプロットした。図 7 は、R e N 細胞における例示的な N M D エクソン領域に対する様々な例示的な A S O 歩行の、R T - P C R 及び T a q M a n q P C R を介した評価を示す。P H I P m R N A の量の測定を、エクソン 1 5 及びエクソン 1 6 にまたがる P

50

ローブを使用する Taqman qPCR、並びにエクソン15及びエクソン16におけるプライマーを使用する RT-PCRによって、3時間のシクロヘキシミド処理後の、3 uMの例示的な ASO を用いた処理の24時間後の細胞に対して実行した。

【 0 2 9 0 】

【 表 4 - 1 】

表 4 : 例示的な ASO

配列番号	Chr	始端	終端	ASO 名	配列
4	chr6	79004521	79004539	IVS14X:-86	CTTTAGCAGTGTCTGAA
5	chr6	79004516	79004534	IVS14X:-81	AACTTCTTTAGCAGTGT
6	chr6	79004511	79004529	IVS14X:-76	TTGAAAACCTCTTTAGCA
7	chr6	79004506	79004524	IVS14X:-71	TCCAGTTGAAAACCTCTT
8	chr6	79004501	79004519	IVS14X:-66	TATGTTCCAGTTGAAAAC
9	chr6	79004496	79004514	IVS14X:-61	CAGACTATGTTCCAGTTG
10	chr6	79004491	79004509	IVS14X:-56	TTCTTCAGACTATGTTCC
11	chr6	79004486	79004504	IVS14X:-51	AGTGCTTCTTCAGACTAT
12	chr6	79004481	79004499	IVS14X:-46	CTCTCAGTGCTTCTTCAG
13	chr6	79004476	79004494	IVS14X:-41	TTTGTGCTCTCAGTGCTTC
14	chr6	79004471	79004489	IVS14X:-36	GAATTTTTTGTCTCTCAGT
15	chr6	79004466	79004484	IVS14X:-31	ACTCTGAATTTTTTGTCTC
16	chr6	79004461	79004479	IVS14X:-26	TCACCACCTCTGAATTTTT
17	chr6	79004456	79004474	IVS14X:-21	GCCAATCACCACCTCTGAA
18	chr6	79004451	79004469	IVS14X:-16	AGGTGGCCAATCACCACCT
19	chr6	79004446	79004464	IVS14X:-11	AACAGAGGTGGCCAATCA
20	chr6	79004441	79004459	IVS14X:-6	AATCAAACAGAGGTGGCC
21	chr6	79004436	79004454	IVS14X:-1	CTGTCAATCAAACAGAGG
22	chr6	79004431	79004449	IVS14X-Ex15XX:5	GCAACCTGTCATCAAAC
23	chr6	79004426	79004444	IVS14X-Ex15XX:10	TCCCTGCAACCTGTCAAT
24	chr6	79004421	79004439	IVS14X-Ex15XX:15	TTTCCTCCCTGCAACCTG
25	chr6	79004418	79004436	Ex15X:1	GGGTTTCCCTCCCTGCAAC
26	chr6	79004413	79004431	Ex15X:6	CGAATGGGTTTCCCTCCCT
27	chr6	79004408	79004426	Ex15X:11	CAGAACGAATGGGTTTCC
28	chr6	79004403	79004421	Ex15X:16	TAATCCAGAACGAATGGG
29	chr6	79004398	79004416	Ex15X:21	TCCATTAATCCAGAACGA
30	chr6	79004393	79004411	Ex15X:31	GTTTTCCAGTTCCATTAA
31	chr6	79004388	79004406	Ex15X:-11	TTTCTGTGTTTCCAGTTC
32	chr6	79004382	79004400	Ex15X:-6	AATGTTTTTCTGTTTTCC
33	chr6	79004377	79004395	Ex15X:-1	CTGATAATGTTTTCTGT
34	chr6	79004372	79004390	Ex15XX-IVS15X:-15	TACCTGATAATTGTTTTTC
35	chr6	79004369	79004387	Ex15XX-IVS15X:-10	TTTTTTACCTGATAATTG
36	chr6	79004364	79004382	Ex15XX-IVS15X:-5	AGGTTTTTTTTACCTGAT

10

20

30

40

【 0 2 9 1 】

50

【表 4 - 2】

37	chr6	79004359	79004377	IVS15X:1	AGAAAAGGTTTTTTTTTAC
38	chr6	79004354	79004372	IVS15X:6	GTTAAAGAAAAGGTTTTT
39	chr6	79004349	79004367	IVS15X:11	CAAAGGTAAAGAAAAGG
40	chr6	79004344	79004362	IVS15X:16	AATTTCAAAGGTTAAAGA
41	chr6	79004339	79004357	IVS15X:21	TGGTGAATTTCAAAGGTT
42	chr6	79004334	79004352	IVS15X:26	TTAAATGGTGAATTTCAA
43	chr6	79004329	79004347	IVS15X:31	GTCTTTTAAATGGTGAAT
44	chr6	79004324	79004342	IVS15X:36	GACTCGTCTTTTAAATGG
45	chr6	79004319	79004337	IVS15X:41	AGTCTGACTCGTCTTTTA
46	chr6	79004314	79004332	IVS15X:46	CTGGTAGTCTGACTCGTC
47	chr6	79004309	79004327	IVS15X:51	ATTCCCTGGTAGTCTGAC
48	chr6	79004304	79004322	IVS15X:56	AATAAATTCCTGGTAGT
49	chr6	79004299	79004317	IVS15X:61	TTGGTAATAAATTCCTCG
50	chr6	79004294	79004312	IVS15X:66	TATTTTTGGTAATAAAT
51	chr6	79004289	79004307	IVS15X:71	TTTATTATTTTTGGTAAT
52	chr6	79004284	79004302	IVS15X:76	TAGATTTTATTATTTTTG
53	chr6	79004279	79004297	IVS15X:81	GACACTAGATTTTATTAT
54	chr6	79004274	79004292	IVS15X:86	CAAATGACACTAGATTTT

10

20

【0292】

[232] 図 8 は、PHIP mRNA の量の測定を示す。分析を、エクソン 15 及びエクソン 16 (カノニカル) 並びにエクソン 35 及びエクソン 36 (GE) にまたがるプローブを使用する Taqman qPCR によって、シクロヘキシミド処理の非存在下における、3 μ M の少数の例示的な ASO を用いた処理の 24 時間後の Ren 細胞に対して実行した。様々な ASO が、カノニカル及び総 (GE) PHIP mRNA の産生を増加させ、産生される非生産的 mRNA の量を減少させた。

30

【0293】

[233] 図 9 は、HEK293 細胞における例示的な NMD エクソン領域に対する様々な例示的な ASO 歩行の、RT-PCR 及び TaqMan qPCR を介した評価を示す。PHIP mRNA の量の測定を、エクソン 15 及びエクソン 16 にまたがるプローブを使用する Taqman qPCR、並びにエクソン 15 及びエクソン 16 におけるプライマーを使用する RT-PCR によって、3 時間のシクロヘキシミド処理後の、120 nM の例示的な ASO を用いた処理の 24 時間後の細胞に対して実行した。

40

【0294】

[234] 図 10 A ~ 10 D は、例示的な NMD エクソン領域 15x に対する RT-PCR 及び TaqMan qPCR を介した少数の例示的な ASO の評価を示す。PHIP mRNA の量の測定を、シクロヘキシミドの非存在下における、80 nM の例示的な ASO を用いた処理の 24 時間後の細胞に対して実行した。図に示すように、様々な ASO が、カノニカルな PHIP mRNA 及び総 PHIP mRNA の産生を増加させ、産生される非生産的 mRNA の量を減少させた。

実施例 6 : RT-PCR 及び RT-qPCR によって評価した NMD エクソン領域 ASO マイクロ歩行

[235] 図 11 は、例示的な PHIP NMD エクソン領域に関する ASO マイクロ歩行を示す。ASO マイクロ歩行配列 (エクソン 15x を横断する) を RT-PCR によって

50

評価した。細胞に、処理された対照 A S O (S M N)、又は以下の表 5 に記載される、 P H I P N M D エクソン領域を標的とする 2' - M O E A S O をトランスフェクトした。 N M D エクソン包含及び全長に対応する産物を定量化し、 N M D エクソン包含 % をプロットした。図 1 2 は、 R e N 細胞における例示的な N M D エクソン領域に対する様々な例示的な A S O 歩行の評価を示す。 P H I P m R N A の量の測定を、エクソン 1 5 及びエクソン 1 6 にまたがるプローブを使用する T a q m a n q P C R によって、3 時間のシクロヘキシミド処理後の、3 μ M の例示的な A S O のトランスフェクションの 2 4 時間後の R e N 細胞に対して実行した (図 1 2)。

【 0 2 9 5 】

【 表 5 - 1 】

表 5 : 例示的な ASO 配列

配列番号	Chr	始端	終端	ASO 名	配列
55	chr6	79004441	79004459	IVS14X:-6	AATCAAACAGAGGTGGCC
56	chr6	79004440	79004458	IVS14X:-5	CAATCAAACAGAGGTGGC
57	chr6	79004439	79004457	IVS14X:-4	TCAATCAAACAGAGGTGG
58	chr6	79004438	79004456	IVS14X:-3	GTCAATCAAACAGAGGTG
59	chr6	79004437	79004455	IVS14X:-2	TGTCAATCAAACAGAGGT
60	chr6	79004436	79004454	IVS14X:-1	CTGTCAATCAAACAGAGG
61	chr6	79004435	79004453	IVS14X-Ex15XX:1	CCTGTCAATCAAACAGAG
62	chr6	79004434	79004452	IVS14X-Ex15XX:2	ACCTGTCAATCAAACAGA
63	chr6	79004433	79004451	IVS14X-Ex15XX:3	AACCTGTCAATCAAACAG
64	chr6	79004432	79004450	IVS14X-Ex15XX:4	CAACCTGTCAATCAAACA
65	chr6	79004431	79004449	IVS14X-Ex15XX:5	GCAACCTGTCAATCAAAC
66	chr6	79004430	79004448	IVS14X-Ex15XX:6	TGCAACCTGTCAATCAAA
67	chr6	79004429	79004447	IVS14X-Ex15XX:7	CTGCAACCTGTCAATCAA
68	chr6	79004428	79004446	IVS14X-Ex15XX:8	CCTGCAACCTGTCAATCA
69	chr6	79004427	79004445	IVS14X-Ex15XX:9	CCCTGCAACCTGTCAATC
70	chr6	79004426	79004444	IVS14X-Ex15XX:10	TCCTGCAACCTGTCAAT
71	chr6	79004425	79004443	IVS14X-Ex15XX:11	CTCCCTGCAACCTGTCAA
72	chr6	79004424	79004442	IVS14X-Ex15XX:12	CCTCCCTGCAACCTGTCA
73	chr6	79004423	79004441	IVS14X-Ex15XX:13	TCCTCCCTGCAACCTGTC
74	chr6	79004422	79004440	IVS14X-Ex15XX:14	TTCTCCCTGCAACCTGT
75	chr6	79004421	79004439	IVS14X-Ex15XX:15	TTTCTCCCTGCAACCTG
76	chr6	79004420	79004438	IVS14X-Ex15XX:16	GTTTCTCCCTGCAACCT
77	chr6	79004419	79004437	IVS14X-Ex15XX:17	GGTTTCTCCCTGCAACC
78	chr6	79004418	79004436	Ex15X:1	GGGTTTCTCCCTGCAAC
79	chr6	79004417	79004435	Ex15X:2	TGGGTTTCTCCCTGCAA
80	chr6	79004416	79004434	Ex15X:3	ATGGGTTTCTCCCTGCA
81	chr6	79004415	79004433	Ex15X:5	GAATGGGTTTCTCCCTG
82	chr6	79004414	79004432	Ex15X:6	CGAATGGGTTTCTCCCT
83	chr6	79004413	79004431	Ex15X:7	ACGAATGGGTTTCTCCC
84	chr6	79004412	79004430	Ex15X:8	AACGAATGGGTTTCTTCC
85	chr6	79004411	79004429	Ex15X:9	GAACGAATGGGTTTCTTC
86	chr6	79004410	79004428	Ex15X:10	AGAACGAATGGGTTTCTT
87	chr6	79004409	79004427	Ex15X:11	CAGAACGAATGGGTTTCC

10

20

30

40

50

【 0 2 9 6 】

【 表 5 - 2 】

88	chr6	79004408	79004426	Ex15X:12	CCAGAACGAATGGGTTTC
89	chr6	79004407	79004425	Ex15X:13	TCCAGAACGAATGGGTTT
90	chr6	79004406	79004424	Ex15X:14	ATCCAGAACGAATGGGTT
91	chr6	79004405	79004423	Ex15X:15	AATCCAGAACGAATGGGT
92	chr6	79004404	79004422	Ex15X:16	TAATCCAGAACGAATGGG
93	chr6	79004403	79004421	Ex15X:17	TTAATCCAGAACGAATGG
94	chr6	79004402	79004420	Ex15X:18	ATTAATCCAGAACGAATG
95	chr6	79004401	79004419	Ex15X:19	CATTAATCCAGAACGAAT
96	chr6	79004400	79004418	Ex15X:20	CCATTAATCCAGAACGAA
97	chr6	79004399	79004417	Ex15X:21	TCCATTAATCCAGAACGA
98	chr6	79004398	79004416	Ex15X:22	TTCCATTAATCCAGAACG
99	chr6	79004397	79004415	Ex15X:23	GTTCATTAATCCAGAAC
100	chr6	79004396	79004414	Ex15X:24	AGTTCCATTAATCCAGAA
101	chr6	79004395	79004413	Ex15X:25	CAGTTCCATTAATCCAGA
102	chr6	79004394	79004412	Ex15X:26	CCAGTTCCATTAATCCAG
103	chr6	79004393	79004411	Ex15X:27	TCCAGTTCCATTAATCCA
104	chr6	79004392	79004410	Ex15X:28	TTCCAGTTCCATTAATCC
105	chr6	79004391	79004409	Ex15X:29	TTTCCAGTTCCATTAATC
106	chr6	79004390	79004408	Ex15X:30	TTTTCCAGTTCCATTAAT
107	chr6	79004389	79004407	Ex15X:31	GTTTTCCAGTTCCATTAA

10

20

【 0 2 9 7 】

[236] 図 1 3 は、HEK 2 9 3 細胞における例示的な NMD エクソン領域に対する様々な例示的な ASO 歩行の評価を示す。PHIP mRNA の量の測定を、エクソン 1 5 及びエクソン 1 6 にまたがるプローブを使用する Taqman qPCR、並びにエクソン 1 5 及びエクソン 1 6 におけるプライマーを使用する RT-PCR によって、シクロヘキシミドを用いた 3 時間の処理後の、120 nM の例示的な ASO のトランスフェクションの 2 4 時間後の HEK 2 9 3 細胞に対して実行した (図 1 0)。

30

【 0 2 9 8 】

[237] 以下の表 6 は、さらなる例示的な PHIP NMD エクソン領域 ASO マイクロ歩行配列 (エクソン 1 5 x を横断する) を提供する。

【 0 2 9 9 】

40

50

【表 6 - 1】

表 6 : 例示的な ASO 配列

配列番号	Chr	始端	終端	名称	ASO 配列
108	chr6	79004441	79004459	IVS14X:-6	AATCAAACAGAGGTGGCC
109	chr6	79004440	79004458	IVS14X:-5	CAATCAAACAGAGGTGGC
110	chr6	79004439	79004457	IVS14X:-4	TCAATCAAACAGAGGTGG
111	chr6	79004438	79004456	IVS14X:-3	GTCATCAAACAGAGGTG
112	chr6	79004437	79004455	IVS14X:-2	TGTCAATCAAACAGAGGT
113	chr6	79004436	79004454	IVS14X:-1	CTGTCAATCAAACAGAGG
114	chr6	79004435	79004453	IVS14X-Ex15XX:1	CCTGTCAATCAAACAGAG
115	chr6	79004434	79004452	IVS14X-Ex15XX:2	ACCTGTCAATCAAACAGA
116	chr6	79004433	79004451	IVS14X-Ex15XX:3	AACCTGTCAATCAAACAG
117	chr6	79004432	79004450	IVS14X-Ex15XX:4	CAACCTGTCAATCAAACA
118	chr6	79004431	79004449	IVS14X-Ex15XX:5	GCAACCTGTCAATCAAAC
119	chr6	79004430	79004448	IVS14X-Ex15XX:6	TGCAACCTGTCAATCAAA
120	chr6	79004429	79004447	IVS14X-Ex15XX:7	CTGCAACCTGTCAATCAA
121	chr6	79004428	79004446	IVS14X-Ex15XX:8	CCTGCAACCTGTCAATCA
122	chr6	79004427	79004445	IVS14X-Ex15XX:9	CCCTGCAACCTGTCAATC
123	chr6	79004426	79004444	IVS14X-Ex15XX:10	TCCCTGCAACCTGTCAAT
124	chr6	79004425	79004443	IVS14X-Ex15XX:11	CTCCCTGCAACCTGTCAA
125	chr6	79004424	79004442	IVS14X-Ex15XX:12	CCTCCCTGCAACCTGTCA
126	chr6	79004423	79004441	IVS14X-Ex15XX:13	TCCTCCCTGCAACCTGTC
127	chr6	79004422	79004440	IVS14X-Ex15XX:14	TTCTCCCTGCAACCTGT
128	chr6	79004421	79004439	IVS14X-Ex15XX:15	TTCTCCCTGCAACCTG
129	chr6	79004420	79004438	IVS14X-Ex15XX:16	GTTCTCCCTGCAACCT
130	chr6	79004419	79004437	IVS14X-Ex15XX:17	GGTTCTCCCTGCAACC
131	chr6	79004418	79004436	Ex15X:1	GGGTTCTCCCTGCAAC
132	chr6	79004417	79004435	Ex15X:2	TGGGTTCTCCCTGCAA
133	chr6	79004416	79004434	Ex15X:3	ATGGGTTCTCCCTGCA
134	chr6	79004415	79004433	Ex15X:4	AATGGGTTCTCCCTGTC
135	chr6	79004414	79004432	Ex15X:5	GAATGGGTTCTCCCTG
136	chr6	79004413	79004431	Ex15X:6	CGAATGGGTTCTCCCT
137	chr6	79004412	79004430	Ex15X:7	ACGAATGGGTTCTCCCT
138	chr6	79004411	79004429	Ex15X:8	AACGAATGGGTTCTCTC
139	chr6	79004410	79004428	Ex15X:9	GAACGAATGGGTTCTCTC
140	chr6	79004409	79004427	Ex15X:10	AGAACGAATGGGTTCTCT

10

20

30

40

【 0 3 0 0 】

50

【表 6 - 2】

141	chr6	79004408	79004426	Ex15X:11	CAGAACGAATGGGTTTCC
142	chr6	79004407	79004425	Ex15X:12	CCAGAACGAATGGGTTTCC
143	chr6	79004406	79004424	Ex15X:13	TCCAGAACGAATGGGTTT
144	chr6	79004405	79004423	Ex15X:14	ATCCAGAACGAATGGGTT
145	chr6	79004404	79004422	Ex15X:15	AATCCAGAACGAATGGGT
146	chr6	79004403	79004421	Ex15X:16	TAATCCAGAACGAATGGG
147	chr6	79004402	79004420	Ex15X:17	TTAATCCAGAACGAATGG
148	chr6	79004401	79004419	Ex15X:18	ATTAATCCAGAACGAATG
149	chr6	79004400	79004418	Ex15X:19	CATTAATCCAGAACGAAT
150	chr6	79004399	79004417	Ex15X:20	CCATTAATCCAGAACGAA
151	chr6	79004398	79004416	Ex15X:21	TCCATTAATCCAGAACGA
152	chr6	79004397	79004415	Ex15X:22	TTCCATTAATCCAGAACG
153	chr6	79004396	79004414	Ex15X:23	GTTCCATTAATCCAGAAC
154	chr6	79004395	79004413	Ex15X:24	AGTTCCATTAATCCAGAA
155	chr6	79004394	79004412	Ex15X:25	CAGTTCCATTAATCCAGA
156	chr6	79004393	79004411	Ex15X:26	CCAGTTCCATTAATCCAG
157	chr6	79004392	79004410	Ex15X:27	TCCAGTTCCATTAATCCA
158	chr6	79004391	79004409	Ex15X:28	TTCCAGTTCCATTAATCC
159	chr6	79004390	79004408	Ex15X:29	TTTCCAGTTCCATTAATC
160	chr6	79004389	79004407	Ex15X:30	TTTTCCAGTTCCATTAAT
161	chr6	79004388	79004406	Ex15X:31	GTTTTCCAGTTCCATTAA

10

20

【0301】

実施例 7：用量反応評価

30

【238】本開示の一部の実施形態によるいくつかの例示的な A S O の用量反応関係を調査する実験を実施した。

【0302】

【239】ある実験では、ReN VM細胞に異なる濃度の A S O をヌクレオフェクトし、次いでこの細胞をシクロヘキシミドの存在下において 24 時間培養した後、細胞における N M D エクソン (1 5 x) のスプライシングを調査する R T - P C R 分析のために回収した。図 1 4 A 及び 1 4 B に示すように、対照 A S O (「 模 擬 」) 、 S M N m R N A を 標 的 と する A S O (「 S M N 」) 、 又 は 例 示 的 な A S O 、 例 え ば 「 I V S 1 4 X : - 3 」 (配 列 番 号 5 8) 、 「 I V S 1 4 X - E x 1 5 X X : 7 」 (配 列 番 号 6 7) 、 「 E x 1 5 X : 1 9 」 (配 列 番 号 9 5) 、 若 し く は 「 E x 1 5 X : 2 3 」 (配 列 番 号 9 9) を 、 そ れ ぞ れ 0 . 3 3 μ M 、 1 μ M 、 又 は 3 μ M で 用 い て 、 細 胞 を 処 理 し た 。 2 4 時 間 後 、 細 胞 を R T - P C R 分 析 の た め に 回 収 し た 。 エ ク ソ ン 1 5 及 び エ ク ソ ン 1 6 を 標 的 と する プ ラ イ マ ー を R T - P C R 反 応 の た め に 使 用 し 、 増 幅 結 果 を 図 1 4 A に 示 す よ う に 可 視 化 し 、 こ こ で 、 下 側 の バ ン ド は エ ク ソ ン 1 5 x を 有 し な い m R N A 転 写 物 (「 カ ノ ニ カ ル な P H I P m R N A 」) に 由 来 し 、 上 側 の バ ン ド は エ ク ソ ン 1 5 x を 有 す る m R N A 転 写 物 (「 非 生 産 的 P H I P m R N A 」) に 由 来 し た 。 異 なる 処 理 に 応 答 し た カ ノ ニ カ ル な P H I P m R N A の 量 の 変 化 及 び 非 生 産 的 P H I P m R N A の 量 の 変 化 の 定 量 化 を 図 1 4 B (「 模 擬 」 条 件 下 に お け る そ れ ぞ れ の 量 に よ っ て 正 規 化 し た) に ま と め る 。 試 験 さ れ た 全 て の 例 示 的 な P H I P A S O に 関 し て 、 そ れ ら が 高 濃 度 で 適 用 さ れ る ほ ど 、 よ り 多 く の カ ノ ニ カ ル な P H I P 転 写 物 及 び よ り 少 な い 非 生 産 的 P H I P 転 写 物 が 観 察 さ れ た 。

40

50

【0303】

[240]別の実験では、R e N V M細胞に3 μ Mの様々なA S Oをヌクレオフェクトし、この細胞を72時間培養した後、細胞におけるP H I Pタンパク質レベルを調査するJ E S Sアッセイのために回収した。図15Aは、2回の反復のウェスタンブロッティング画像を示し、図15Bは、試験された全ての例示的なA S O (I V S 1 4 X : - 3、I V S 1 4 X - E x 1 5 X X : 7、E x 1 5 X : 1 9、及びE x 1 5 X : 2 3) が、模擬条件と比較してP H I Pタンパク質レベルの増加を引き起こしたが、S M N対照は引き起こさなかったことを実証するプロットを示す。

実施例8：例示的なA S Oによるスプライシングの調節

[241]この実施例は、本開示の一部の実施形態による例示的なA S Oによる、P H I P m R N A前駆体からのN M Dエクソン15xのスプライシングの調節を実証したさらなる実験を例示する。

【0304】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7. 例示的な ASO 配列

配列番号	ASO ID	長さ	ASO 配列
58	IVS14X:-3	18	GTCAATCAAACAGAGGTG
162	化合物 1	17	TCAATCAAACAGAGGTG
162	化合物 2	17	GTCAATCAAACAGAGGT
163	化合物 3	16	CAATCAAACAGAGGTG
164	化合物 4	16	GTCAATCAAACAGAGG
165	化合物 5	16	TCAATCAAACAGAGGT
67	IVS14X-Ex15XX:7	18	CTGCAACCTGTCAATCAA
166	化合物 6	17	TGCAACCTGTCAATCAA
167	化合物 7	17	CTGCAACCTGTCAATCA
168	化合物 8	16	GCAACCTGTCAATCAA
169	化合物 9	16	CTGCAACCTGTCAATC
170	化合物 10	16	TGCAACCTGTCAATCA
95	Ex15X:19	18	CATTAATCCAGAACGAAT
171	化合物 11	17	ATTAATCCAGAACGAAT
172	化合物 12	17	CATTAATCCAGAACGAA
173	化合物 13	16	TTAATCCAGAACGAAT
174	化合物 14	16	CATTAATCCAGAACGA
175	化合物 15	16	ATTAATCCAGAACGAA
99	Ex15X:23	18	GTTCCATTAATCCAGAAC
176	化合物 16	17	TTCCATTAATCCAGAAC
177	化合物 17	17	GTTCCATTAATCCAGAA
178	化合物 18	16	TCCATTAATCCAGAAC
179	化合物 19	16	GTTCCATTAATCCAGA
180	化合物 20	16	TTCCATTAATCCAGAA

10

20

30

【0305】

【242】ある実験では、Ren VM細胞に3 μMのASOをヌクレオフェクトし、この細胞をシクロヘキシミドの非存在下において24時間培養した後、RT-PCR分析のために回収した。具体的には、細胞に、表7に列挙した例示的なASOのうちの1つ又は対照ASO（「模擬」）若しくはSMN ASOを、全て3 μMにおいてヌクレオフェクトした。24時間後、細胞をRT-PCR（図16A～16B）又はRT-qPCR（図16C～16D）のために回収した。図16B～16Dに示すように、例示的なASOは、エクソン15xを有する非生産的PHIP転写物の量の減少（図16B）と、エクソン15及びエクソン16（カノニカル；図16C）並びにエクソン35及びエクソン36（GE；図16D）にまたがるプローブを使用するTaqman qPCRによって示されるエクソン15xを有しないPHIP転写物の量の増加とをもたらした。

40

【0306】

50

[243]別の実験では、ASOをRen VM細胞の培養培地に、自由取込みのために60 μMにおいて添加し、次いで、細胞を3D条件及びシクロヘキシミドの非存在下において3日間培養した後、RT-PCR分析のために回収した。具体的には、表7に列挙した例示的なASOのうちの1つ、又は対照ASO(「模擬」)若しくはSMN ASOを、全て3 μMにおいて用いて、細胞を処理した。24時間後、細胞をRT-PCR(図17A)又はRT-qPCR(図17B~17D)のために回収した。図17B~17Dに示すように、例示的なASOは、エクソン15xを有する非生産的PHIP転写物の量の減少(図17B)と、エクソン15及びエクソン16(カノニカル; 図17C)並びにエクソン35及びエクソン36(GE; 図17D)にまたがるプローブを使用するTaqman qPCRによって示されるエクソン15xを有しないPHIP転写物の量の増加とをもたらした。

10

【0307】

[244]本開示の好ましい実施形態が本明細書に示され、記載されたが、そのような実施形態は例としてのみ提供されているということは、当業者には明らかであろう。今や数多くの変形、変更、及び代用が、本開示から逸脱することなく当業者には思い浮かぶであろう。本開示の実施形態の様々な代替が本開示を実施する際に用いられてもよいことが理解されるべきである。以下の特許請求の範囲は本開示の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方法及び構造、並びにそれらの均等物はそれによって網羅されることが意図される。

20

【図面】

【図1】

【図2】

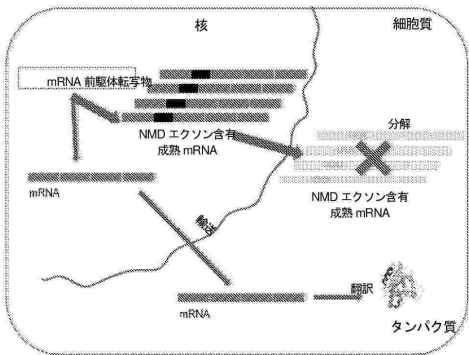


図1A

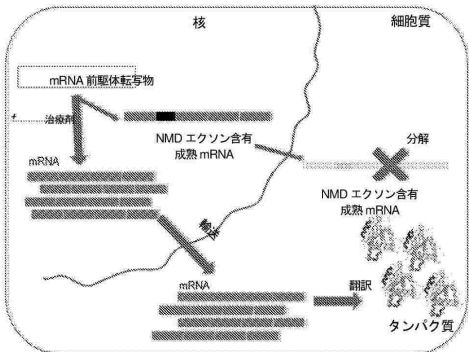
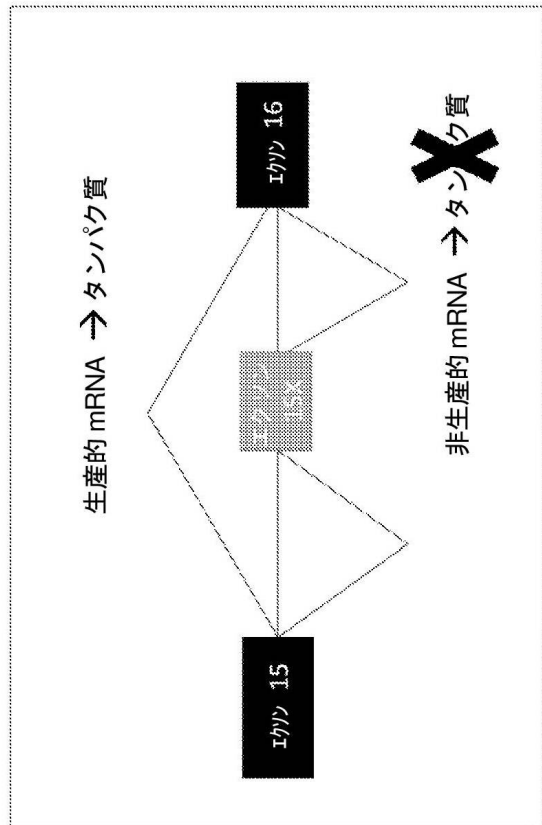


図1B

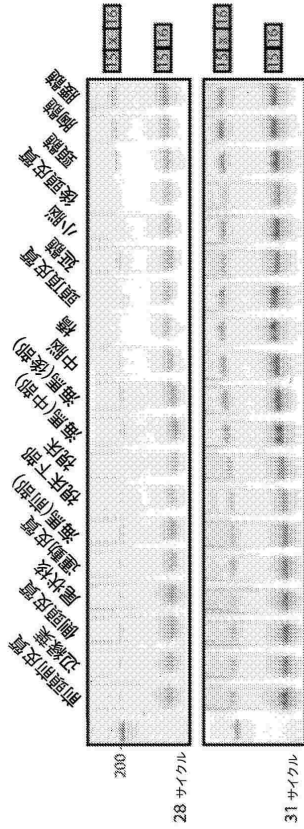


30

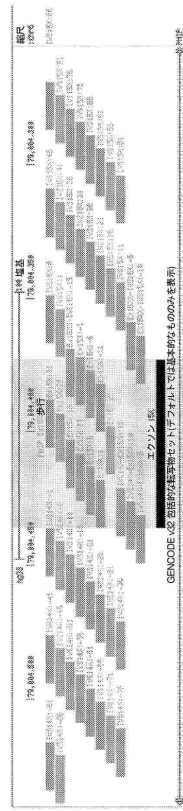
40

50

【 図 5 】



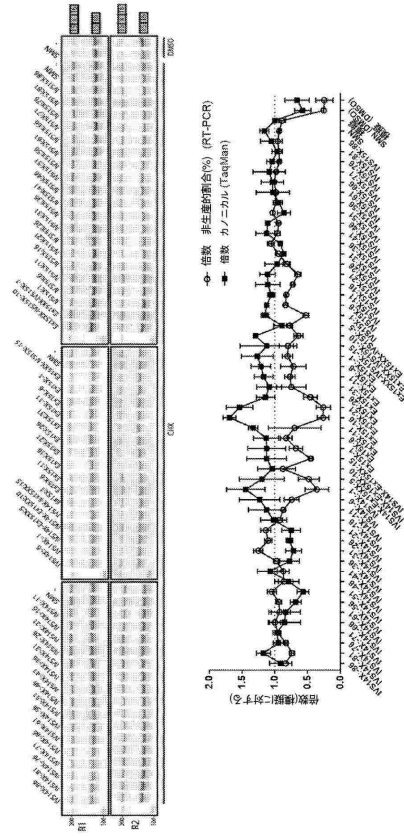
【 図 6 】



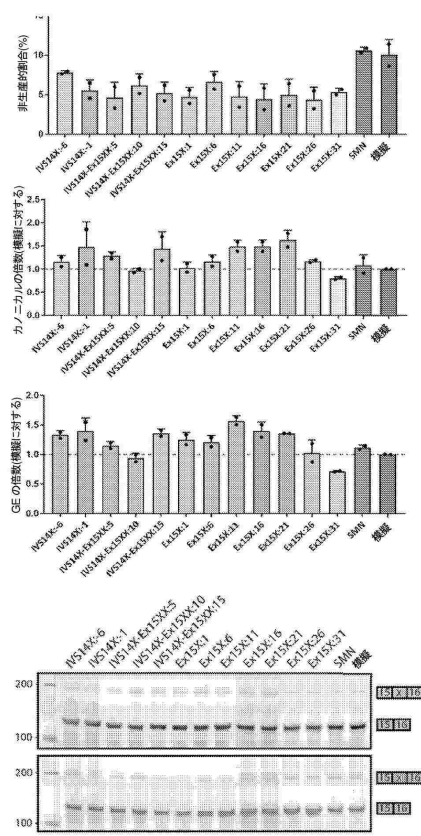
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

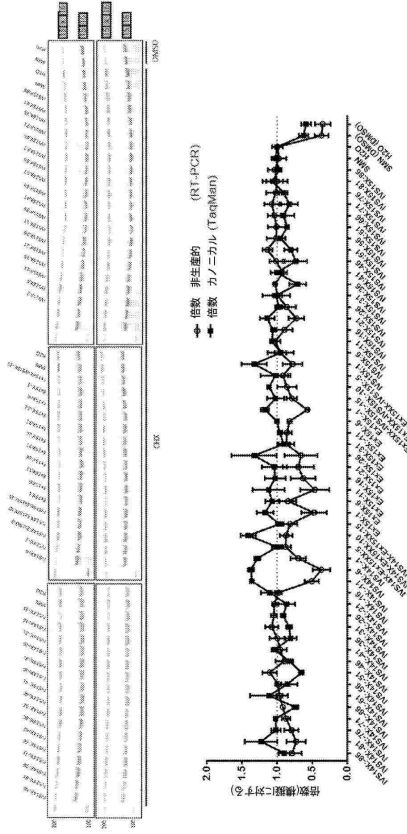


30

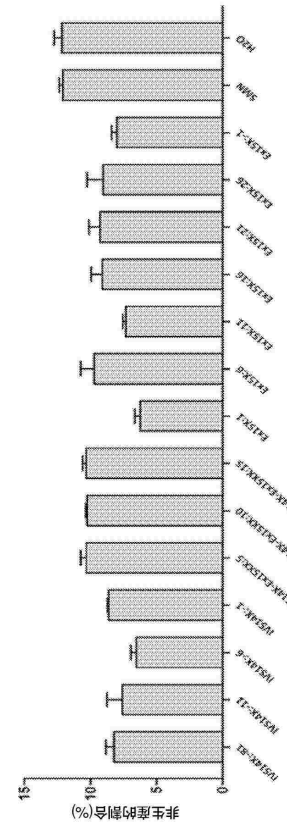
40

50

【図9】



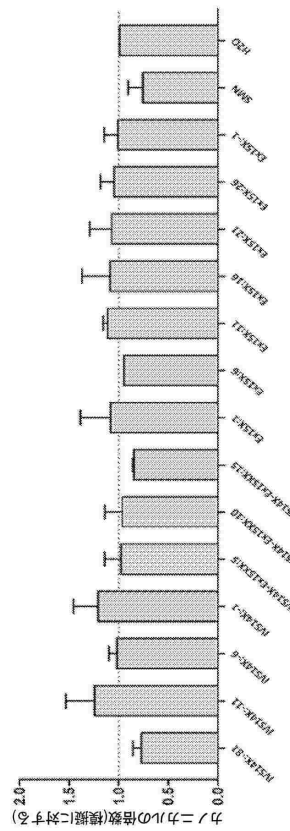
【図10A】



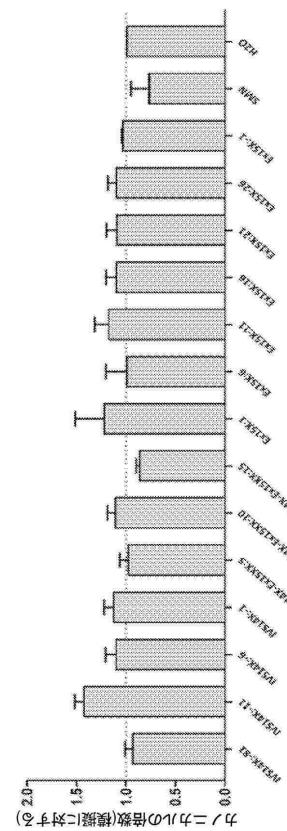
10

20

【図10B】



【図10C】

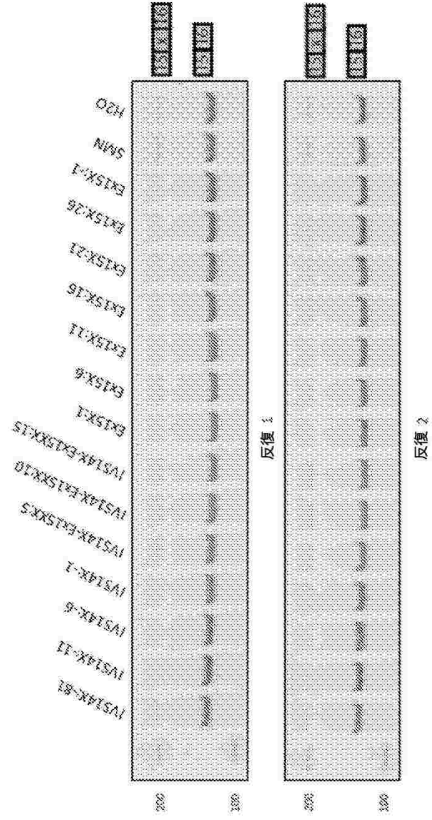


30

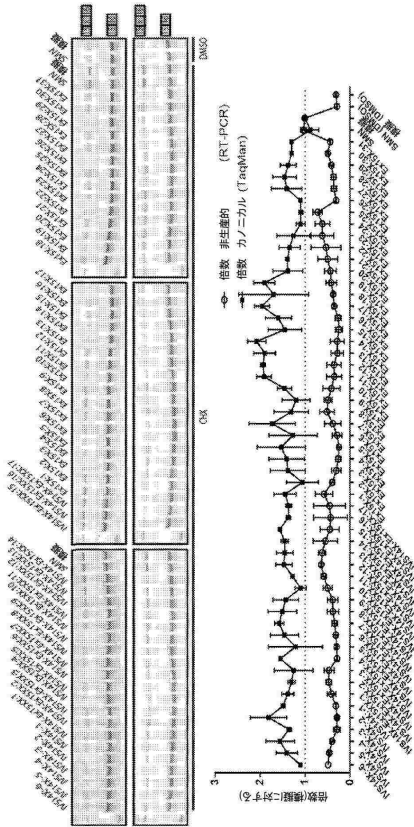
40

50

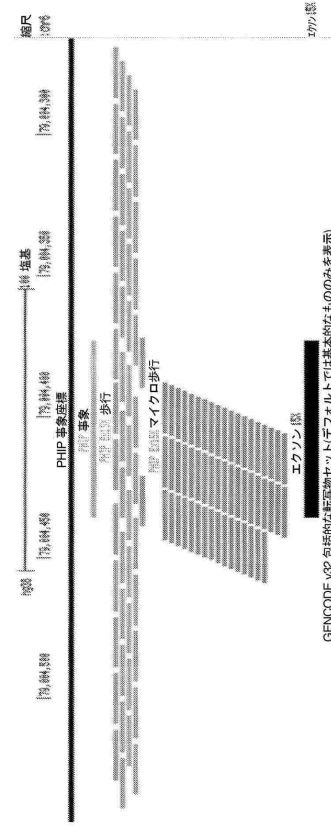
【図 10 D】



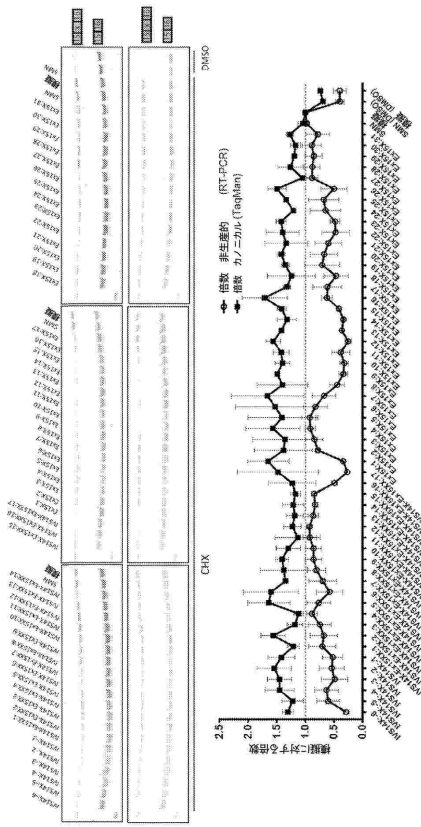
【図 1 2】



【図 1 1】



【図 1 3】



10

20

30

40

50

【 図 1 4 】

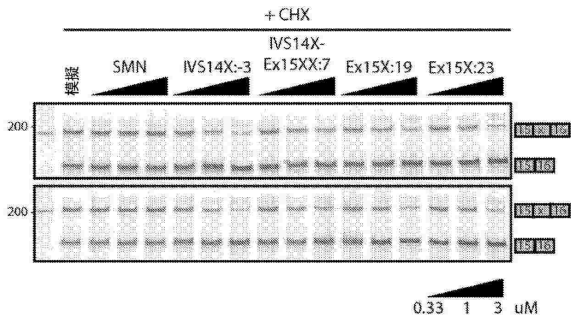


図 1 4 A

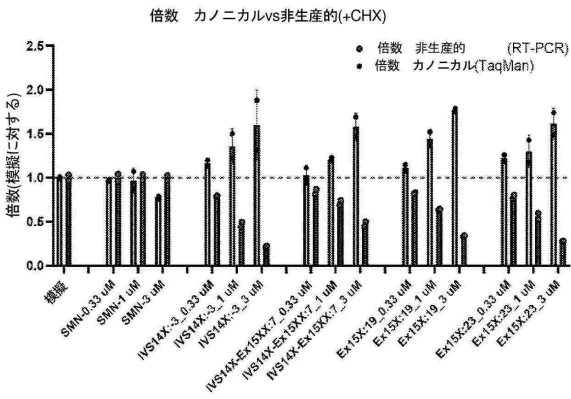


図 1 4 B

【 図 1 5 】

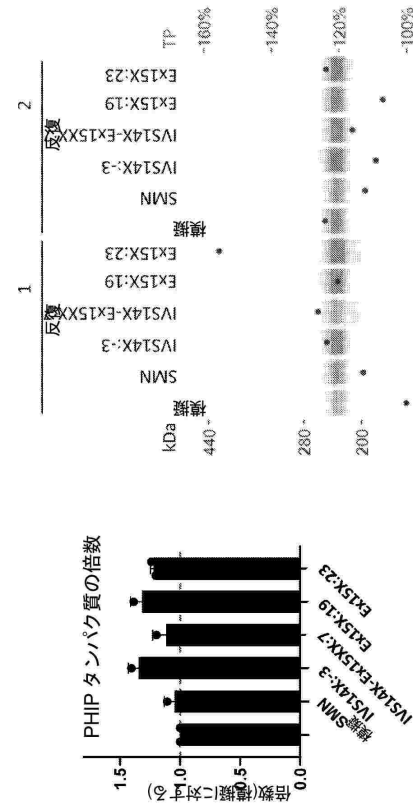
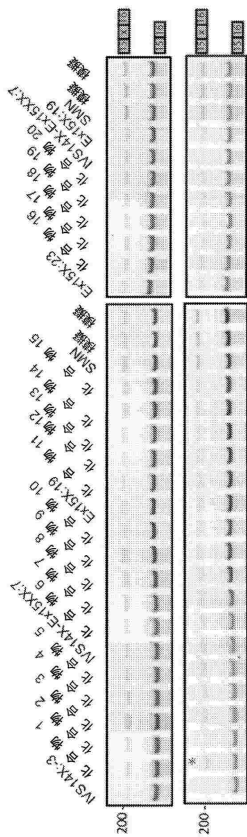


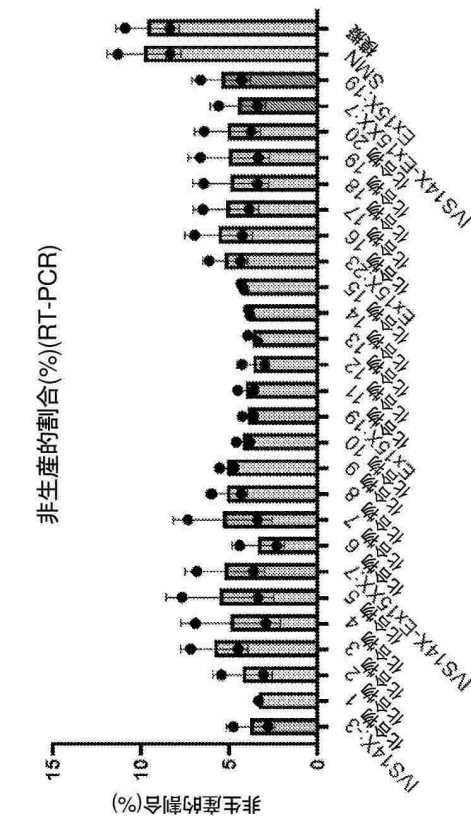
図 1 5 A

図 1 5 B

【 図 1 6 A 】



【 図 1 6 B 】



10

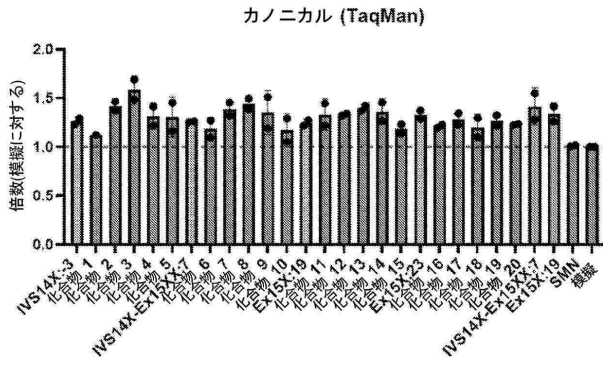
20

30

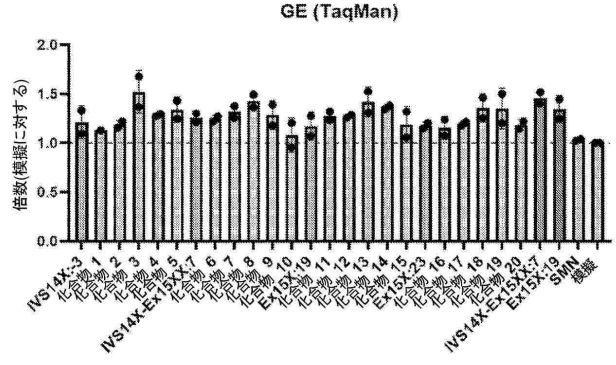
40

50

【 図 1 6 C 】

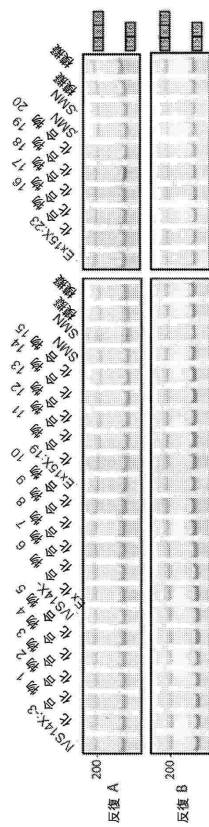


【 図 1 6 D 】

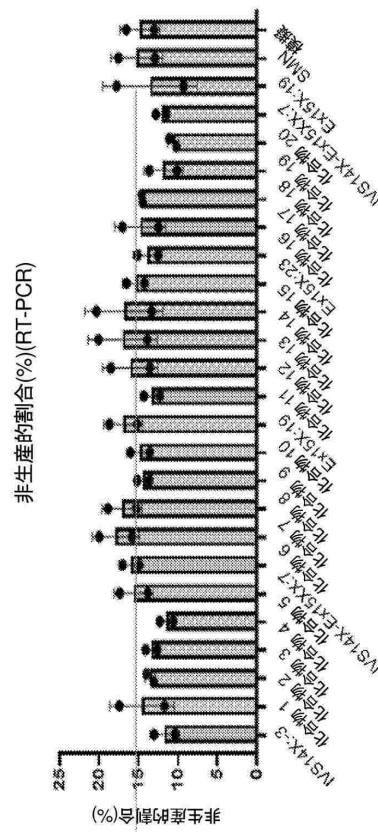


10

【 図 1 7 A 】



【 図 1 7 B 】



20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/034344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC(8) - INV. - C12N 15/113; A61K 31/712; A61K 31/7125; A61K 31/715 (2022.01)
 ADD. - C12N 15/861 (2022.01)
 CPC - INV. - C12N 15/1138; A61K 31/7125; A61K 31/712; A61K 31/715 (2022.08)
 ADD. - C12N 2310/11; C12N 15/861; C12N 2320/33 (2022.08)
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

10

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 See Search History document
 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 See Search History document
 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2013/0288967 A1 (EUCLID DIAGNOSTICS LLC) 31 October 2013 (31.10.2013) entire document	1-19, 24-27, 29-36, 38-45, 51-57, 62, 63, 67-69, 71-85
A	US 2019/0309291 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 10 October 2019 (10.10.2019) entire document	1-19, 24-27, 29-36, 38-45, 51-57, 62, 63, 67-69, 71-85
A	US 2008/0241147 A1 (ROZAKIS-ADCOCK) 02 October 2008 (02.10.2008) entire document	1-19, 24-27, 29-36, 38-45, 51-57, 62, 63, 67-69, 71-85
A	WO 2021/034985 A1 (STOKE THERAPEUTICS INC.) 25 February 2021 (25.02.2021) entire document	1-19, 24-27, 29-36, 38-45, 51-57, 62, 63, 67-69, 71-85

20

30

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

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "D" document cited by the applicant in the international application
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 November 2022

Date of mailing of the international search report
DEC 05 2022

40

Name and mailing address of the ISA/US
 Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
 P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450
 Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer
 Taina Matos
 Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/034344

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed:

- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.

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

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

- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/034344

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

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 70, 86
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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

20

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet(s).

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-19, 24-27, 29-36, 38-45, 51-57, 62, 63, 67-69, 71-85

30

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

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/034344

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-69 and 71-85 are drawn to methods and compositions for NMD exon modulated expression of pre-mRNA splicing of a target gene.

The first invention of Group I+ is restricted to an NMD exon selected to be nucleotides 1-10,000 of SEQ ID NO: 2, and an antisense oligonucleotide selected to be SEQ ID NO: 4, and methods, and compositions comprising the same. It is believed that claims 1-19, 24-27, 29-36, 38-45, 51-57, 62, 63, 67-69, and 71-85 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on SEQ ID NOs 2 and 4.

Applicant is invited to elect additional NMD exons, antisense oligomers, and their respective, corresponding, SEQ ID NOs to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be an NMD exon selected to be nucleotides 10,001-20,000 of SEQ ID NO: 2, and an antisense oligonucleotide selected to be SEQ ID NO: 5, and methods, and compositions comprising the same. Additional NMD exons, antisense oligomers, and their respective, corresponding, SEQ ID NOs will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for treating protein deficiency diseases, requiring the selection of alternative NMD exons and antisense oligonucleotides where "the NMD exon is (a) within an intronic sequence with at least 80%, at least 90%, or 100% sequence identity to SEQ ID NO: 2 and/or (b) comprises a sequence with at least 80%, at least 90%, or 100% sequence identity to SEQ ID NO: 3," and where "the agent comprises an antisense oligomer with at least 80%, at least 90%, or 100% sequence identity to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 4-180."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a method of modulating expression of a target protein in a cell having a pre-mRNA that is transcribed from a target gene and that comprises a non-sense mediated RNA decay-inducing exon (NMD exon), the method comprising contacting an agent or a vector encoding the agent to the cell, whereby the agent modulates splicing of the NMD exon from the pre-mRNA, thereby modulating a level of processed mRNA that is processed from the pre-mRNA, and modulating the expression of the target protein in the cell, and wherein the target gene is a PHIP gene; a pharmaceutical composition, comprising a therapeutic agent or a vector encoding a therapeutic agent, and a pharmaceutically acceptable excipient, wherein the therapeutic agent comprises an antisense oligomer; a composition comprising an antisense oligomer, wherein the antisense oligomer comprises a backbone modification, a sugar moiety modification, or a combination thereof; a composition comprising a viral vector encoding a polynucleotide comprising an antisense oligomer, a composition comprising an agent or a vector encoding the agent that modulates splicing of a non-sense mediated RNA decay-inducing exon (NMD exon) from a pre-mRNA (wherein the non-sense mediated RNA decay alternative exon (NSAE)-modulating agent to the cell, whereby the agent modulates processing of an mRNA transcript from the pre-processed mRNA transcript by modulating splicing of the pre-mRNA, Para. [0012]), thereby modulating a level of processed mRNA that is processed from the pre-mRNA, and modulating the expression of the target protein in the cell (wherein the splicing of the pre-mRNA at the 3' alternative splice site modulates the expression of the target protein, Para. [0012]), a pharmaceutical composition (provided herein is a pharmaceutical composition, Para. [0015]), comprising a therapeutic agent or a vector encoding a therapeutic agent, and a pharmaceutically acceptable excipient (comprising: a therapeutic agent comprising a composition described herein; and a pharmaceutically acceptable excipient and/or a delivery vehicle, Para. [0015]), wherein the therapeutic agent comprises an antisense oligomer (the Agent is an antisense oligomer (ASO) complementary to the targeted region of the pre-mRNA, Para. [0010]); a composition comprising an antisense oligomer (compositions and methods include antisense oligomers (ASOs), Para. [0070]), wherein the antisense oligomer comprises a backbone modification, a sugar moiety modification, or a combination thereof (the Agent comprises a backbone modification comprising a phosphorothioate linkage, Para. [0010]); a composition comprising a viral vector encoding a polynucleotide comprising an antisense oligomer (antisense oligomer ... composition of a nucleic acid molecule that encodes for the NSAE-modulating agent. In some embodiments, the nucleic acid molecule is incorporated into a viral delivery system. In some embodiments, the viral delivery system is an adenovirus-associated vector, Para. [0010]), thereby treating a disease or condition in a subject in need thereof by modulating the level of a processed mRNA that is processed from the pre-mRNA, and modulating expression of a target protein in a cell of the subject (a non-sense mediated RNA decay alternative exon (NSAE)-modulating agent that interacts with a target motif within a pre-processed mRNA transcript to modulate exclusion of an NSAE from a processed mRNA transcript and to modulate inclusion of a canonical exon in the processed mRNA transcript, wherein the NSAE comprises (i) only a portion of a canonical exon, or (ii) a canonical exon and at least a portion of an intron

Specifically, WO 2021/034985 to Stoke Therapeutics Inc. discloses a method of modulating expression of a target protein in a cell having a pre-mRNA that is transcribed from a target gene and that comprises a non-sense mediated RNA decay-inducing exon (NMD exon) (a method of modulating protein expression, comprising: (a) contacting a non-sense mediated RNA decay alternative exon (NSAE)-modulating agent to a target motif within a pre-processed mRNA transcript, Para. [0011]; a pre-processed mRNA transcript (pre-mRNA) that encodes the target protein and comprises: an alternative nonsense mediated RNA decay-inducing (NMD) exon, Para. [0012]), the method comprising contacting an agent or a vector encoding the agent to the cell (the method comprising contacting a non-sense mediated RNA decay alternative exon (NSAE)-modulating agent to the cell, Para. [0012]), whereby the agent modulates splicing of the NMD exon from the pre-mRNA (wherein the non-sense mediated RNA decay alternative exon (NSAE)-modulating agent modulates processing of an mRNA transcript from the pre-processed mRNA transcript by modulating splicing of the pre-mRNA, Para. [0012]), thereby modulating a level of processed mRNA that is processed from the pre-mRNA, and modulating the expression of the target protein in the cell (wherein the splicing of the pre-mRNA at the 3' alternative splice site modulates the expression of the target protein, Para. [0012]), a pharmaceutical composition (provided herein is a pharmaceutical composition, Para. [0015]), comprising a therapeutic agent or a vector encoding a therapeutic agent, and a pharmaceutically acceptable excipient (comprising: a therapeutic agent comprising a composition described herein; and a pharmaceutically acceptable excipient and/or a delivery vehicle, Para. [0015]), wherein the therapeutic agent comprises an antisense oligomer (the Agent is an antisense oligomer (ASO) complementary to the targeted region of the pre-mRNA, Para. [0010]); a composition comprising an antisense oligomer (compositions and methods include antisense oligomers (ASOs), Para. [0070]), wherein the antisense oligomer comprises a backbone modification, a sugar moiety modification, or a combination thereof (the Agent comprises a backbone modification comprising a phosphorothioate linkage, Para. [0010]); a composition comprising a viral vector encoding a polynucleotide comprising an antisense oligomer (antisense oligomer ... composition of a nucleic acid molecule that encodes for the NSAE-modulating agent. In some embodiments, the nucleic acid molecule is incorporated into a viral delivery system. In some embodiments, the viral delivery system is an adenovirus-associated vector, Para. [0010]), thereby treating a disease or condition in a subject in need thereof by modulating the level of a processed mRNA that is processed from the pre-mRNA, and modulating expression of a target protein in a cell of the subject (a non-sense mediated RNA decay alternative exon (NSAE)-modulating agent that interacts with a target motif within a pre-processed mRNA transcript to modulate exclusion of an NSAE from a processed mRNA transcript and to modulate inclusion of a canonical exon in the processed mRNA transcript, wherein the NSAE comprises (i) only a portion of a canonical exon, or (ii) a canonical exon and at least a portion of an intron

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/034344

adjacent to the canonical exon; and (b) a pharmaceutically acceptable excipient and/or a delivery vehicle, wherein the disease or condition is treated or prevented in the subject by the administration of the NSAE -modulating agent, Para. [0017]). Further, US 2013/0288867 to Euclid Diagnostics LLC teaches wherein the target gene is a PHIP gene ([target sequences also include ...PHIP, Para. [0018]).

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

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N	15/869 (2006.01)	C 1 2 N	15/869	Z
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
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	
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761	
A 6 1 K	35/763 (2015.01)	A 6 1 K	35/763	
A 6 1 K	45/06 (2006.01)	A 6 1 K	45/06	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,J
O,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,M
Z,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,
TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

7 3 0 , ベドフォード , ウィギンズ・アヴェニュー 4 5 , ケア・オブ・ストーク セラピューティ
クス , インク .

(72)発明者

サイズ , アナ・コリオネロ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 7 3 0 , ベドフォード , ウィギンズ・アヴェニュー 4 5
 , ケア・オブ・ストーク セラピューティクス , インク .

(72)発明者

カハ , ヤコブ・アルバート

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 7 3 0 , ベドフォード , ウィギンズ・アヴェニュー 4 5
 , ケア・オブ・ストーク セラピューティクス , インク .

F ターム (参考)

4C084 AA13 AA17 MA02 MA52 MA56 MA63 MA66 MA67 NA14 ZA021
ZA022 ZC611 ZC612 ZC751 ZC752
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA52 MA56 MA63 MA66 MA67
NA14 ZA02 ZC61
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA52 MA56 MA63 MA66 MA67 NA14
ZA02 ZC61