

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2022年6月30日(30.06.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/138787 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/712 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)  
A61K 31/7125 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)  
A61K 48/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/047754

(22) 国際出願日: 2021年12月22日(22.12.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2020-213000 2020年12月22日(22.12.2020) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人理化学研究所(RIKEN)  
[JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号  
Saitama (JP). 学校法人兵庫医科大学(HYOGO  
COLLEGE OF MEDICINE) [JP/JP]; 〒6638501  
兵庫県西宮市武庫川町 1 番 1 号 Hyogo (JP).

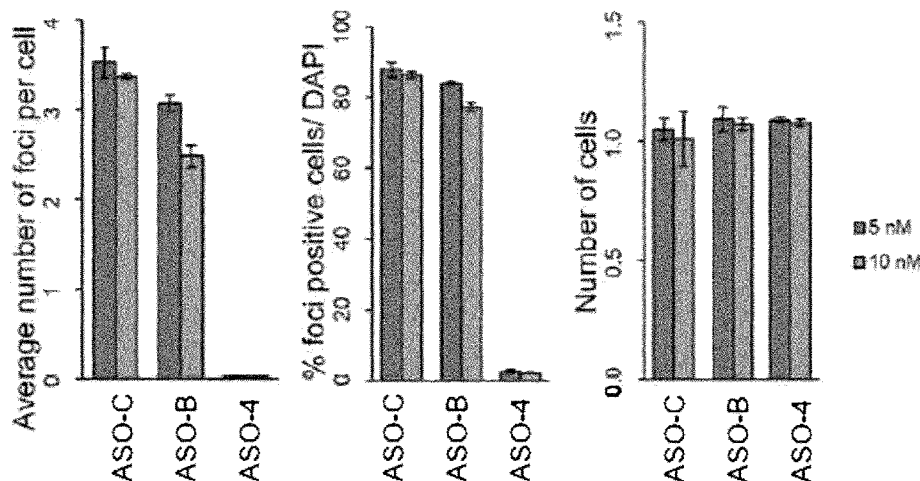
(72) 発明者: 井上 治久 (INOUE, Haruhisa);  
〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立  
研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).  
菅 三佳(SUGA, Mika); 〒3510198 埼玉県和光  
市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学  
研究所内 Saitama (JP). 近藤 孝之(KONDO,  
Takayuki); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2  
番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所  
内 Saitama (JP). 木村 卓(KIMURA, Takashi);  
〒6638501 兵庫県西宮市武庫川町 1 番 1 号 学  
校法人兵庫医科大学内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime);  
〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町  
四丁目 1 番 1 号 明治安田生命大阪  
御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保  
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(54) 発明の名称: 医薬組成物



(57) Abstract: The present invention provides a novel antisense oligonucleotide pharmaceutical composition that has higher RNA foci-removal activity than conventional pharmaceutical compositions. This pharmaceutical composition includes an oligonucleotide that has a nucleic acid sequence having one of the repetitive sequences wherein cytosine-adenine-guanine trinucleotides repeat 5-13 times at the 5'-end to the 3'-end. The oligonucleotide includes at least two types of RNase H inactive nucleotide analogs and has a mixmer structure. The present invention provides this pharmaceutical composition which is used for treating the symptoms of any of the myotonic dystrophy type 1 diseases.

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

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

(57) 要約: 本発明は、RNA凝集体を除去する活性が従来より高い、新規アンチセンスオリゴヌクレオチド医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、5'末端から3'末端に、シトシン-アデニン-グアニンのトリヌクレオチドが5~13回繰り返す反復配列のいずれかの塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含み、該オリゴヌクレオチドは、RNAse H非活性型ヌクレオチド類似体を少なくとも2種類含む、ミックスマー構造を有する。本発明は、筋強直性ジストロフィー1型疾患のいずれかの症状の治療のために用いる本発明の医薬組成物を提供する。

## 明 細 書

発明の名称： 医薬組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、医薬組成物に関し、具体的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物は筋強直性ジストロフィー 1 型疾患のいずれかの症状の治療のために用いることができる。

### 背景技術

[0002] 筋強直性ジストロフィー 1 型（以下、「DM1」という。）は、筋ジストロフィーのうち最も有病率が高い疾患の 1 つである。DM1 の有病率は国によって違い、2000 人から 8000 人に 1 人、地域によっては 500 人に 1 人という報告がある（非特許文献 1）。DM1 の原因は筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ（以下、「DMPK」という。）遺伝子の 3' 非翻訳領域（3' UTR）内の CTG トリヌクレオチドの反復配列が伸長することである。DMPK 遺伝子は非受容体型セリン／スレオニンキナーゼタンパク質をコードし、DMPK タンパク質は全身に遍在的に発現し、骨格筋及び心筋で強く発現する。DMPK タンパク質の具体的な機能は不明である。DM1 患者はたいていの細胞で DMPK 遺伝子に 50～2,000 回の反復回数の CTG 反復配列を有するが、非罹患者は 5～38 個の CTG 反復配列しかない（非特許文献 1）。CTG 配列の反復回数は本疾患の重症度及び発症時期と大まかに相関する。CUG の反復配列が伸長した DMPK の RNA は罹患者の細胞核内に RNA の凝集体（foci）を形成する。RNA 凝集体は、CUG 結合タンパク質 1（CUG-BP1）及び muscleblind 様タンパク質 1（MBNL1）を含む RNA 結合分子を吸着して核内から枯渇させることによって、選択的スプライシング、転写、翻訳及び翻訳後調節のような多くの細胞のメカニズムに障害を起こすことが報告されている（非特許文献 2）。DM1 以外にもトリヌクレオチドの反復配列が伸長する疾患が多数報告されており、トリプレット病と総称される。

[0003] アンチセンスオリゴヌクレオチド（以下、「ASO」という。）処置は、mRNA及びノンコーディングRNAを含む細胞及び／又は核内の異常RNAが原因で発症する疾患、例えばトリプレット病、の有望な治療戦略の1つとされている（非特許文献3及び4）。ASOは、核及び細胞質中でRNase Hによる標的RNA鎖の切断をもたらすか、該標的RNAとRNA結合分子との会合を立体的に障害する。デオキシリボヌクレオチドのみからなる1本鎖DNA安定性及び標的結合親和性を増大するために、さまざまなヌクレオチド類似体を含むASOが開発されている。ASOに用いられるヌクレオチドの修飾には、ホスホジエステル骨格のホスホロチオアート（phosphorothioate、PS）修飾（以下、「S化」ともいう。）、シチジンの塩基部のピリミジン環における5'位のメチル化修飾（以下、「5mC」という。）、いずれかのヌクレオチドの糖部のモルフォリノ環への置換、いずれかのヌクレオチドの糖部のリボースにおける2'位の水酸基のフルオロ基による置換（以下、「2'-F」という。）、メトキシ基による修飾（以下、「2'-OMe」という。）及びO-メトキシエチル基による修飾（以下、「MOE」という。）及びリボースの2'位の酸素原子及び4'位の炭素原子の架橋修飾（例えば、リボース環の2'位の酸素原子及び4'位の炭素原子をメチレン架橋してフラノース環の配座をC3'-endo型に固定したロック核酸（locked nucleic acid、以下、「LNA」という。）、リボースの2'位の酸素原子及び4'位の炭素原子をエチレン架橋した2'-O, 4'-C-エチレン架橋核酸（2'-O, 4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acid、以下、「ENA」という。）及びリボースの2'位の酸素原子及び4'位の炭素原子をメチル（メチレンオキシ）架橋（4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'）した2', 4'-(S)-拘束エチル（constrained ethyl）ヌクレオチド類似体（以下、「cEt」という。）を含む。ヌクレオチド類似体は体内に投与されると有害な副作用を惹起する場合もあるが、未修飾デオキシリボヌクレオチドよりもヌクレオチド類似体のほうが相補的

なRNAとの結合親和性が高く、オリゴヌクレオチドの核酸分解酵素への耐性が高いことが多いので、ヌクレオチド類似体のほうが未修飾デオキシリボヌクレオチドよりも投与量は少なくてすむ利点がある。

[0004] 特定のタイプのヌクレオチド類似体からなるオリゴヌクレオチドを該オリゴヌクレオチドと相補的なRNAと対合させて形成されたヘテロ2本鎖核酸が、所定の条件下でRNase Hと反応させたときに分解されるとき、当該特定のタイプのヌクレオチド類似体はRNase H活性型ヌクレオチドという。逆に、特定のタイプのヌクレオチド類似体からなるオリゴヌクレオチドを該オリゴヌクレオチドと相補的なRNAと対合させて形成されたヘテロ2本鎖核酸が、所定の条件下でRNase Hと反応させたときに分解されないとき、当該特定のタイプのヌクレオチド類似体はRNase H非活性型ヌクレオチドという。本発明に係るオリゴヌクレオチドに含まれるRNase H活性型ヌクレオチドは、例えば、修飾のないデオキシリボヌクレオチド、PS修飾デオキシリボヌクレオチド類似体を含むがこれらに限られない。本発明に係るオリゴヌクレオチドに含まれるRNase H非活性型ヌクレオチドは、例えば、モルフォリノ環置換ヌクレオチド類似体、2'-OMe-ヌクレオチド類似体、MOE-ヌクレオチド類似体、2'-Fヌクレオチド類似体、LNA、ENA及びcEtを含むがこれらに限られない。

[0005] ASOの設計においては、同一の塩基配列を有するASOであっても、RNase H活性型ヌクレオチド及びRNase H非活性型ヌクレオチドの配置によって特性が異なる場合があることが知られている。ギャップマー構造は、RNase H活性型ヌクレオチドのみからなるオリゴヌクレオチド（以下、「ギャップ領域」という。）の5'末端側及び3'末端側にRNase H非活性型ヌクレオチドのみからなるオリゴヌクレオチド（以下、「ウィング領域」という。）を連結した構造である。ウィング領域では相補的なRNAとの結合親和性が高いので、安定な標的RNAとの2本鎖が形成される。ギャップ領域はRNase H活性型ヌクレオチドが連続するので、標的RNAとの2本鎖がRNase Hによって分解される。そこで、R

NAとの2本鎖が分解されて薬効を奏するタイプのASOにはギャップマー構造を採用することが好ましい。逆に、RNAとの2本鎖が分解されないことで薬効を奏するタイプのASOには、RNAse H非活性型ヌクレオチドがASOの全長に分布して明確なギャップ領域がない構造のオリゴヌクレオチドを用いることが好ましい。本発明においてミックスマー構造は、前記RNAse H非活性型ヌクレオチドのみからなる構造と、RNAse H活性型ヌクレオチド及びRNAse H非活性型ヌクレオチドが混在するが、RNAse H活性型ヌクレオチドの近傍にRNAse H非活性型ヌクレオチドが配置されるために、ASOと標的RNAとの2本鎖はRNAse Hによって分解されない構造とのいずれであってもかまわない。本発明のミックスマーに含まれるRNAse H非活性型ヌクレオチドは、全てのヌクレオチドが同一の修飾糖を有し、かつ、全てのヌクレオチド間の結合が同一の修飾結合であるオリゴヌクレオチドを含むものでもよく、修飾糖及び／又は修飾結合の異なるヌクレオチド誘導体を複数含むものであってもよい。本発明のギャップマー及びミックスマーは、それぞれ、ギャップマー構造及びミックスマー構造を有するオリゴヌクレオチドを指す。

[0006] 数種類のMOE／DNAギャップマーASOは、試験管内及び生体内のDM1疾患モデルにおいてCUG配列の反復配列が伸長したDMPKのRNAを低減するのに有効であると報告されている（非特許文献5及び6）。2'-OMe修飾ASO（非特許文献7及び8）と、モルフォリノ置換ASO（非特許文献8及び9）もDM疾患モデルではCUG配列の反復配列が伸長したDMPKのRNAの作用を緩和できることが報告されている。前記MOE／DNAギャップマーASOの一部は臨床治験段階まで進んだが、試験管内で薬効を発揮する濃度のASOを筋肉に送達することができなかった（非特許文献4）。したがって、より低濃度で薬効を発揮するASOを開発する必要がある。

[0007] 従来のDM1治療用ASOの効果を調べる実験は、ごく一部でDM1患者由来の線維芽細胞、筋サテライト細胞又は筋芽細胞が用いられたが、主にD

M1 患者由来のCTGの反復配列が伸長したヒトDMPK遺伝子のゲノムDNAを導入したトランスジェニックマウス又は該マウス由来の筋芽細胞若しくは筋管が用いられた。しかし前記トランスジェニックマウスに導入されたヒトDMPK遺伝子のCTG反復配列は反復回数が数百回程度で、千回以上、ときには数千回の反復回数のヒトDM1疾患のモデルとしては不十分であった。

[0008] 患者由来の人工多能性幹細胞（以下、「iPSC」又は「iPS細胞」という。）資源は創薬開発に有用である。筋強直性ジストロフィー患者の線維芽細胞、筋芽細胞、尿由来細胞又は不死化リンパ芽球性細胞の初代培養細胞から作成された複数のiPSCが記載されている（非特許文献10～18）。核内RNA凝集体は、筋強直性ジストロフィー患者由来iPSCと、筋強直性ジストロフィー患者由来iPSCから分化した骨格筋細胞及び心筋細胞における病理学的表現型として観察されてきた（非特許文献16～18）。しかし、DM1患者由来のiPS細胞や該iPS細胞から分化した細胞を用いてDM1治療用ASOの効果を調べたことはこれまでなかった。そこで、CTG配列の反復回数の異なる複数のDM1患者由来のiPS細胞を樹立して、ヒトDM1疾患の病態をより忠実に再現する疾患モデル細胞系でDM1治療用ASOを評価する必要がある。

[0009] また、先に説明したヌクレオチド類似体のうちENAは、ヌクレアーゼ分解耐性が高く、熱力学的に安定なヌクレオチド類似体である（非特許文献8、19及び20）。ENAを取り込んだASOは相補的なRNA鎖との親和性が高い（非特許文献8、19及び20）。立体障害によりエキソンスキッピングを誘導可能なENA/2'-OMeリボヌクレオチド類似体ミックスマーASOは、デュシェンヌ型筋ジストロフィー症（DMD）の治療薬として開発中である（非特許文献20～22）。ENA/デオキシリボヌクレオチドギャップマー及びENA/2'-OMeリボヌクレオチド類似体のミックスマーのASOは脊髄小脳変性症36型（SCA36）患者由来のiPS細胞及び該iPS細胞由来の神経細胞におけるRNA凝集体を減少できる（

非特許文献23)。このようにENAを取り込んだASOは立体障害を介する作用機序の治療薬として特に期待が持てるため、DM1治療用ASOとしてENAを取り込んだオリゴヌクレオチドを開発する必要がある。

[0010] さらにDM1は、骨格筋・平滑筋に加え眼、心臓、内分泌系や中枢神経系も冒す多臓器疾患である。臨床症状は軽症から重症まで幅があり多少の重なりはあるものの、軽症例、古典型、先天型の3つに分類される。軽症DM1は白内障、軽度の筋強直現象（筋収縮状態の遷延）を特徴とし、生命予後は正常である。古典型DM1は筋力低下・萎縮、筋強直現象、白内障を特徴とし、しばしば心伝導障害を伴う。成人で身体機能が低下し、生命予後も短くなる場合がある。先天型DM1は生下時の筋緊張低下と全身の著明な筋力低下が特徴で、しばしば呼吸不全を来し早期に死亡する。知的障害を伴うことが多い。DM1では、筋力低下・萎縮、心筋障害、心伝導障害、白内障、網膜変性症、平滑筋障害に伴う嚥下、便秘、下痢等の消化管の症状、高次脳機能障害、高インスリン血症、糖尿病、精巣萎縮、成長ホルモン分泌異常等の内分泌障害、毛母腫、上皮腫等の皮膚の症状も報告される。そこで、患者の臨床症状に応じて、筋肉以外の臓器の治療が必要となる場合がある。そのため、骨格筋の他、筋組織に常在する骨格筋の前駆細胞であるサテライト細胞や、筋肉以外の組織、例えば、眼組織（白内障の原因となる水晶体細胞、網膜変性症の原因となる網膜細胞等）、神経、皮膚、内分泌系その他の組織を対象とするDM1治療用ASOを開発する必要もある。

## 先行技術文献

### 非特許文献

[0011] 非特許文献1: Chakraborty, S. ら、Current Protocols in Human Genetics, 91: 9.29.1-9.29.19. (2016)

非特許文献2: Pettersson, O. J. ら、Nucleic Acids Research, 43: 2433-2441. (2015)

非特許文献3: Crooke, S. T. ら、Cell Metabolism, 27: 714-739. (2018)

非特許文献4: Overby, S. J. ら、Drug Discovery Today 23: 2013-2022. (2018)

非特許文献5: Wheeler, T. M. ら、Nature, 488: 111-115. (2012)

非特許文献6: Jauvin, D. ら、Mol Ther Nucleic Acids, 7: 465-474. (2017)

非特許文献7: Mulders, S. A. ら、Proc Natl Acad Sci U S A, 106: 13915-13920. (2009)

非特許文献8: Gonzalez-Barriga, A. ら、Mol Ther Nucleic Acids, 2: e81. (2013)

非特許文献9: Klein, A. F. ら、J Clin Invest, 129: 4739-4744. (2019)

非特許文献10: Du, J. ら、Hum Mol Genet, 22: 5276-5287. (2013)

非特許文献11: Xia, G. ら、Cellular reprogramming, 15: 166-177. (2013)

非特許文献12: Xia, G. ら、Stem Cells, 33: 1829-1838. (2015)

非特許文献13: Gao, Y ら、Mol Ther, 24: 1378-1387. (2016)

非特許文献14: Ueki, J. ら、Sci Rep, 7: 42522. (2017)

非特許文献15: Martineau, L. ら、Stem Cell Res, 26: 103-106. (2018)

非特許文献16: Mondragon-Gonzalez, R. 及びPer

l i n g e i r o , R . C . R . , D i s M o d e l M e c h , 1  
1 : d m m 0 3 4 7 2 8 . ( 2 0 1 8 )

非特許文献17 : D a s t i d a r , S . ら、N u c l e i c A c i d s  
R e s . , 4 6 : 8 2 7 5 - 8 2 9 8 . ( 2 0 1 8 )

非特許文献18 : K i m , E . Y . ら、J C I I n s i g h t , 4 :  
e 1 2 2 6 8 6 . ( 2 0 1 9 )

非特許文献19 : M o r i t a , K . ら、B i o o r g a n i c & M e  
d i c i n a l C h e m i s t r y , 1 1 : 2 2 1 1 - 2 2 2 6 . ( 2 0 0 3 )

非特許文献20 : L e e , T . ら、G e n e s , 8 : 6 7 . ( 2 0 1  
7 )

非特許文献21 : M a l u e k a , R . G . ら、N u c l e i c A c i d  
T h e r a p e u t i c s , 2 1 : 3 4 7 - 3 5 3 . ( 2 0 1 1 )

非特許文献22 : S h o j i , E . ら、S c i R e p , 5 : 1 2 8 3  
1 . ( 2 0 1 5 )

非特許文献23 : M a t s u z o n o , K . ら、M o l T h e r N u c  
l e i c A c i d s , 8 : 2 1 1 - 2 1 9 . ( 2 0 1 7 )

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明の目的は、RNA凝集体を除去する活性が従来より高い新規な筋強直性ジストロフィー1型疾患用アンチセンスオリゴヌクレオチド治療剤を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、上記目的を達成すべく検討を進め、筋強直性ジストロフィー1型疾患患者由来iPS細胞による疾患モデル系がRNA凝集体の除去活性の高いアンチセンスオリゴヌクレオチドのスクリーニングに適することを発見し、該アッセイ系を用いて本発明を完成するに至った。

[0014] 本発明は医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、5'末端から3

’ 末端に、シトシンーアデニンーグアニンのトリヌクレオチドが5～13回繰り返す反復配列のいずれかの塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含み、該オリゴヌクレオチドは、RNAse H非活性型ヌクレオチド類似体を少なくとも2種類含む、ミックスマー構造を有する。

[0015] 本発明の医薬組成物において、前記オリゴヌクレオチドは、

- (1) 配列番号1～9のいずれかの塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、
  - (2) 5’末端から3’末端に、アデニンーグアニンと、配列番号1～9のいずれかの塩基配列と、シトシンとからなる塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は、
  - (3) 5’末端から3’末端に、グアニンと、配列番号1～9のいずれかの塩基配列と、シトシンーアデニンとからなる塩基配列からなるオリゴヌクレオチド
- を含んでもかまわない。

[0016] 本発明の医薬組成物において、前記RNAse H非活性型ヌクレオチド類似体は、リボースの2’位が修飾されたヌクレオチド類似体、及び／又は、リボースの2’位と4’位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体とすることができる。

[0017] 本発明の医薬組成物において、前記リボースの2’位の酸素原子が修飾されたヌクレオチド類似体は、2’-OMe-ヌクレオチド類似体、及び／又は、MOE-ヌクレオチド類似体とすることができる。

[0018] 本発明の医薬組成物において、前記リボースの2’位と4’位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体は、 $\beta$ -D-オキシ-L-LNA、 $\beta$ -D-E NA及び／又はR型のcEtとすることができる。

[0019] 本発明の医薬組成物において、前記リボースの2’位が修飾されたヌクレオチド類似体はすべて同じ修飾糖でもかまわない。

[0020] 本発明の医薬組成物において、前記リボースの2’位が修飾されたヌクレオチド類似体は少なくとも2個の異なる修飾糖でもかまわない。

[0021] 本発明の医薬組成物において、前記リボースの2’位と4’位との間が架

橋修飾されたヌクレオチド類似体はすべて同じ修飾糖でもかまわない。

[0022] 本発明の医薬組成物において、前記リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体は少なくとも2個の異なる修飾糖でもかまわない。

[0023] 本発明の医薬組成物において、前記オリゴヌクレオチドは、 $\beta$ -D-ENA-シチジン、2'-OMe-アデノシン及び2'-OMe-グアノシンを含むことができる。

[0024] 本発明の医薬組成物において、前記オリゴヌクレオチドの全てのシチジンは $\beta$ -D-ENA-シチジンであり、全てのアデノシンは2'-OMe-アデノシンであり、全てのグアノシンは2'-OMe-グアノシンとすることができる。

[0025] 本発明の医薬組成物において、前記オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート及びボラノホスフェートからなる群より選択される少なくとも1種類のヌクレオチド連結を含むことができる。

[0026] 本発明の医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体又は希釈剤を含むことができる。

[0027] 本発明の医薬組成物において、前記担体は、細胞膜透過用担体及び／又は核内送達用担体を含むことができる。

[0028] 本発明の医薬組成物は、経皮投与、眼球内投与、水晶体内投与、消化管粘膜内投与、消化管粘膜下投与、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、頭蓋内投与及び髄腔内投与からなる群より選択される非経口的投与によって送達されることができる。

[0029] 本発明の医薬組成物は、筋強直性ジストロフィー1型疾患のいずれかの症状の治療のために用いることができる。

[0030] 本発明は、5'末端から3'末端に、シトシン-アデニン-グアニンのトリヌクレオチドが5～13回繰り返す反復配列のいずれかの塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含み、該オリゴヌクレオチドは、RNase H非活性型ヌクレオチド類似体を少なくとも2種類含む、ミックスマー構造を有

する、オリゴヌクレオチドを必要とする患者に投与することにより、筋強直性ジストロフィー 1 型疾患を治療する方法を提供する。

[0031] 本発明は、筋強直性ジストロフィー 1 型疾患を罹患するヒトから樹立された i P S 細胞由来の細胞を含む、筋強直性ジストロフィー 1 型疾患用アンチセンスオリゴヌクレオチド治療剤のアッセイ系を提供する。前記 i P S 細胞由来の細胞は、未分化の多能性幹細胞と、少なくとも 1 つの細胞タイプに分化した細胞と、該分化細胞を含む集合体とを含む。

### 図面の簡単な説明

[0032] [図1A] DM 1 患者由来の i P S 細胞 (DM-1 ~ 3) 及び健常者由来の i P S 細胞 (HC-1 ~ 3) の未分化多能性幹細胞マーカーの発現を示す顕微鏡写真のパネル。最上段は各 i P S 細胞の未分化細胞の単層培養の位相差顕微鏡写真、第 2 段は各 i P S 細胞の未分化細胞の単層培養を N A N O G に対する抗体で染色し、さらに 4', 6-ジアミジノー 2-フェニルインドール (以下、「D A P I」という。) で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。第 3 段は各 i P S 細胞の未分化細胞の単層培養を O C T 4 に対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。第 4 段は各 i P S 細胞の未分化細胞の単層培養を S S E A 4 に対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。第 5 段は各 i P S 細胞の未分化細胞の単層培養を T R A - 1 - 6 0 に対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。

[図1B] DM 1 患者由来の i P S 細胞 (DM-1 ~ 3) 及び健常者由来の i P S 細胞 (HC-1 ~ 3) から分化させた細胞の三胚葉分化マーカーの発現を示す顕微鏡写真のパネル。第 1 段は、各 i P S 細胞から中胚葉に分化させた細胞を  $\alpha$ -平滑筋アクチン (S M A) に対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。第 2 段は、各 i P S 細胞から内胚葉に分化させた細胞を S O X 1 7 に対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。第 3 段は、各 i P S

細胞から外胚葉に分化させた細胞を $\beta$  III-チューブリンに対する抗体で染色し、さらにDAPIで細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。

[図1C] DM1患者由来のiPS細胞（DM-1～3）及び健常者由来のiPS細胞（HC-1～3）のトリプレットリピートプライムPCR（以下、「TP-PCR」という。）の反応産物のキャピラリー電気泳動図。

[図2] DM1患者由来のiPS細胞（DM-3）について、Cy3標識した（CAG）<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いた蛍光in situハイブリダイゼーション（以下、「FISH」という。）結果の蛍光顕微鏡写真のパネル。左上又は左下はRNase A処理をしないでFISHを行った結果で、右上及び右下はRNase A処理後にFISHを行った結果である。左上及び右上はFISHの後にDAPIで細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真であり、左下及び右下はFISHのみでDAPI染色なしの蛍光顕微鏡写真である。

[図3A] DM1患者由来のiPS細胞（DM-1～3）及び健常者由来のiPS細胞（HC-1～3）の未分化細胞のそれぞれについて、Cy3標識した（CAG）<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISHを行った結果の蛍光顕微鏡写真のパネル。各写真の右上隅は1個の核の強拡大蛍光顕微鏡写真。

[図3B] 図3B左は、図3AのFISH結果から算出した、細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数を表す棒グラフ。図3B右は、図3AのFISH結果から算出した、DAPI染色で検出される全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率を表す棒グラフ。

[図4A] 本願実施例のASOの相補配列のDMPK-pre mRNA上の相対的な位置関係を示すとともに、ASOの構造タイプを示す、模式図。ASO-1～3はDMPK-mRNA上のエキソン15のノンコーディング領域の配列に相補的で、ASO-4はDMPK-mRNA上のエキソン15のノンコーディング領域のCUG配列の反復配列に相補的で、ASO-5はDMPK-mRNA上のエキソン15のノンコーディング領域の反復配列より3

’末端側の配列に相補的である。ASO-4はENA及び2’-OMe-ヌクレオチド類似体からなるミックスマーであるが、他のASO-1～3及び5はウィング領域がENAでギャップ領域が未修飾デオキシリボヌクレオチドからなるギャップマー（以下、「ENA/DNAギャップマー」という）である。

[図4B] DM1患者由来のiPS細胞（DM-1）にASO-C及びASO-1～5のいずれかを投与した48時間後に、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真。

[図4C] 5 nM又は10 nMのASO-C及びASO-1～5のいずれかを投与したDM1患者由来のiPS細胞（DM-1）のFISH結果から算出した、細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数を表す棒グラフ。

[図4D] 5 nM又は10 nMのASO-C及びASO-1～5のいずれかを投与したDM1患者由来のiPS細胞（DM-1）のFISH結果から算出した、DAPI染色で検出される全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率を表す棒グラフ。

[図4E] 5 nM又は10 nMのASO-C及びASO-1～5のいずれかを投与したDM1患者由来のiPS細胞（DM-1）の増殖及び生存の状態を示す棒グラフ。縦軸はASO-Cの細胞数を1.0とする細胞数の割合を表す。

[図5A] 本願実施例のASO-2及び4と、それぞれに対応する対照のASO-A及びBとについて、相補配列のDMPK-pre mRNA上の相対的な位置関係を示すとともに、ASOの構造タイプを示す、模式図。ASO-2及びASO-AはDMPK-mRNA上のエキソン15のコーディング領域の同一の配列に相補的で、ASO-4及びASO-BはDMPK-mRNA上のエキソン15のノンコーディング領域のCUG配列の反復配列の同一の配列に相補的である。ASO-2はENA/DNAギャップマーであるのに対し、ASO-Aはウィング領域がMOE-ヌクレオチド類似体でギャッ

プ領域が未修飾デオキシリボヌクレオチドからなるギャップマー（以下、「MOE／DNAギャップマー」という）である。ASO-4はENA及び2'-OMe-ヌクレオチド類似体からなるミックスマーであるが、ASO-Bは全てのヌクレオチドが2'-OMe-ヌクレオチド類似体からなり、全てのヌクレオチド間結合がホスホロチオアートである。

[図5B] DM1患者由来のiPS細胞（DM-1）にASO-2又はASO-Aを投与した後に、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA／LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真。

[図5C] 図5C左は、5 nM若しくは10 nMのASO-2、ASO-A又はASO-Cを投与したDM1患者由来のiPS細胞（DM-1）についてのFISH結果から算出した、細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数を表す棒グラフ。図5C中は、5 nM若しくは10 nMのASO-2、ASO-A又はASO-Cを投与したDM1患者由来のiPS細胞（DM-1）のFISH結果から算出した、DAPI染色で検出される全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率を表す棒グラフ。図5C右は、5 nM若しくは10 nMのASO-2、ASO-A又はASO-Cを投与したDM1患者由来のiPS細胞（DM-1）の増殖及び生存の状態を示す棒グラフ。縦軸はASO-Cの細胞数を1.0とする細胞数の割合を表す。

[図5D] DM1患者由来のiPS細胞（DM-1）にASO-4又はASO-Bを投与した後に、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA／LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真。

[図5E] 図5E左は、5 nM若しくは10 nMのASO-4、ASO-B又はASO-Cを投与したDM1患者由来のiPS細胞（DM-1）のFISH結果から算出した、細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数を表す棒グラフ。図5E中は、5 nM若しくは10 nMのASO-4、ASO-B又はASO-Cを投与したDM1患者由来のiPS細胞（DM-1）のFISH結果から算出した、全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率を表す棒グラフ。図5E右は、5 nM若しくは10 nMのASO-4、ASO-B又はA

S O - C を投与した D M 1 患者由来の i P S 細胞 ( D M - 1 ) の増殖及び生存の状態を示す棒グラフ。縦軸は A S O - C の細胞数を 1. 0 とする細胞数の割合を表す。

[図6A]テトラサイクリン誘導性 M y o D 発現システムを用いた D M 1 患者由来の i P S 細胞 ( D M - 1 ~ 3 ) 及び健常者由来の i P S 細胞 ( H C - 1 ~ 3 ) の未分化細胞から筋細胞への分化実験系の手順を示す概念図。「S t e m F i t」は未分化 i P S 細胞用の培地で培養される期間を表し、「K S R /  $\alpha$  - M E M」は分化した筋細胞用の培地で培養される期間を表し、「K S R /  $\alpha$  - M E M + D o x」は、分化誘導剤としてドキシサイクリンを添加した筋細胞用の培地で培養される期間を表す。第 0 日に未分化 i P S 細胞にテトラサイクリン誘導性 M y o D 発現システムをトランスフェクションし、第 2 日に分化誘導剤を添加した筋細胞用培地に培地を変更して分化誘導を開始し、第 8 日に分化誘導剤を含まない筋細胞用の培地に変更して分化誘導を終了し、第 1 2 日に解析を行った。

[図6B]図 6 A に示す手順に従って H C - 1 ~ 3 及び D M - 1 ~ 3 細胞の未分化細胞から分化誘導された細胞における筋肉分化マーカーの発現を示す蛍光顕微鏡写真のパネル。上段はミオシン重鎖 ( M H C ) に対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。中段は  $\alpha$  - アクチニンに対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。下段はミオジェニン ( M y o G ) に対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。

[図6C]図 6 A に示す手順に従って H C - 1 ~ 3 及び D M - 1 ~ 3 細胞から分化させた筋細胞のうち M H C 発現細胞の割合を示す棒グラフ。縦軸は未分化細胞から分化誘導された D A P I 染色陽性細胞核のうち筋肉分化マーカー M H C を発現する細胞核 ( M H C / D A P I ) の百分率を表す。「n. s.」は、H C - 1 ~ 3 細胞と D M - 1 ~ 3 細胞との間で有意差が認められないことを示す。

[図6D]図 6 A に示す手順に従って H C - 1 ~ 3 及び D M - 1 ~ 3 細胞から分

化させた筋細胞のうち $\alpha$ -アクチニン発現細胞の割合を示す棒グラフ。縦軸は未分化細胞から分化誘導されたDAP I 染色陽性細胞核のうち筋肉分化マーカー $\alpha$ -アクチニンを発現する細胞核 ( $\alpha$ -Actinin/DAP I) の百分率を表す。「n. s.」は、HC-1~3細胞とDM-1~3細胞との間で有意差が認められないことを示す。

[図6E]図6Aに示す手順に従ってHC-1~3及びDM-1~3細胞から分化させた筋細胞のうちミオジェニン発現細胞の割合を示す棒グラフ。縦軸は未分化細胞から分化誘導されたDAP I 染色陽性細胞核のうち筋肉分化マーカーミオジェニンを発現する細胞核 (Myogenin/DAP I) の百分率を表す。「n. s.」は、HC-1~3細胞とDM-1~3細胞との間で有意差が認められないことを示す。

[図6F]図6Aに示す手順に従ってHC-1~3及びDM-1~3細胞から分化させた筋細胞について、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAP I 対比染色を行った結果の蛍光顕微鏡写真のパネル。

[図6G]図6G左は、図6Aに示す手順に従ってHC-1~3及びDM-1~3細胞から分化させた筋細胞のそれぞれについてのFISH結果から算出した細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数を表す棒グラフ。図6G右は、図6Aに示す手順に従ってHC-1~3及びDM-1~3細胞から分化させた筋細胞のそれぞれについてのFISH結果から算出した、DAP I 染色で検出される全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率を表す棒グラフ。

[図7A]DM1患者iPS細胞(DM-1~3)由来筋細胞に10nMのASO-C又はASO-4を投与した後に、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いるFISH及びDAP I 対比染色を行った蛍光顕微鏡写真のパネル。

[図7B]10nMのASO-C又はASO-4を投与されたDM-1~3細胞由来筋細胞のFISH結果から算出した、細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数を表す棒グラフ。

[図7C] 10 nMのASO-C又はASO-4を投与されたDM-1～3細胞由来筋細胞のFISH結果から算出した、DAPI染色で検出される全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率を表す棒グラフ。

[図7D] 10 nMのASO-C又はASO-4を投与されたDM-1～3細胞由来筋細胞の増殖及び生存の状態を示す、棒グラフ。いずれの棒グラフにおいても、縦軸はASOを投与しなかった培養（Untreated）の細胞数を1.0とする細胞数の割合を表す。

[図8A] iPS細胞からの神経筋オルガノイド作成するプロトコルの概略図。

[図8B] 左は、健常者iPS細胞由来の神経筋オルガノイド（HC、上）及びDM1患者iPS細胞由来の神経筋オルガノイド（DM、下）の5日目の位相差顕微鏡写真及び50日目の明視野顕微鏡写真（スケールバーは200 μm）。右は、50日目の神経筋オルガノイドの切片の多色蛍光顕微鏡写真の合成画像（スケールバーは20 μm）のパネル。パネルの左側は、抗ミオシン重鎖（MHC）抗体と、TUJ1抗体（抗βチューブリンIII抗体）と、DAPIとで神経筋オルガノイドを染色した。骨格筋細胞の多い領域（筋コンパートメント）と、神経細胞の多い領域（神経コンパートメント）とに分かれている。パネルの右側は、抗TITIN抗体及びDAPIとで神経筋オルガノイドを染色した。骨格筋細胞の横紋が抗TITIN抗体で染色された。いずれも、上段が健常者iPS細胞由来の神経筋オルガノイド（HC）で、下段がDM1患者iPS細胞由来の神経筋オルガノイド（DM）である。

[図8C] 上段は、抗デスミン抗体、抗PAX7抗体及びDAPIで多色染色した神経筋オルガノイドの筋コンパートメント蛍光顕微鏡写真の合成画像。下段は、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った神経筋オルガノイドの筋コンパートメントの蛍光顕微鏡写真の合成画像。上段、下段ともに、左は、健常者iPS細胞由来の神経筋オルガノイド（HC）、中央はDM1患者iPS細胞由

来の神経筋オルガノイド（DM）、右はASO-4M（ASO-4と同じ）で処理したDM1患者iPS細胞由来の神経筋オルガノイド（DM ASO-4M）である。スケールバーは20  $\mu$ mを表す。

[図8D]デスミン及びPAX7を発現する細胞のRNA凝集体を有する細胞の百分率を表す棒グラフ。数値は、5個のオルガノイドからの得られた平均±標準偏差（SD）である。「\*\*\*」は、HCとDMとの間、及び、DMとDM+ASO4Mとの間で有意差があることを示す（独立両側t検定、 $p < 0.001$ ）。

[図8E]上段は、抗MYOD抗体、抗PAX7抗体及びDAPIで多色染色した神経筋オルガノイドの筋コンパートメント蛍光顕微鏡写真の合成画像。下段は、抗Ki67抗体、抗PAX7抗体及びDAPIで多色染色した神経筋オルガノイドの筋コンパートメント蛍光顕微鏡写真の合成画像。上段、下段ともに、左は、健常者iPS細胞由来の神経筋オルガノイド（HC）、中央はDM1患者iPS細胞由来の神経筋オルガノイド（DM）、右はASO-4M（ASO-4と同じ）で処理したDM1患者iPS細胞由来の神経筋オルガノイド（DM ASO-4M）。

[図8F]左上は全細胞中PAX7を発現する細胞の百分率を表す棒グラフ。右上は全細胞中MYODを発現する細胞の百分率を表す棒グラフ。左下はMYODを発現する細胞中PAX7を発現する細胞の百分率を表す棒グラフ。右下はPAX7を発現する細胞中Ki67を発現する細胞の百分率を表す棒グラフ。数値は、5個のオルガノイドからの得られた平均±標準偏差（SD）である。「\*\*\*」は、HCとDMとの間、及び、DMとDM+ASO4Mとの間で有意差があることを示す（独立両側t検定、 $p < 0.001$ ）。

[図9A]左は健常者iPS細胞から分化した水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞の位相差顕微鏡写真（HC）。右はDM1患者iPS細胞から分化した水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞の位相差顕微鏡写真（DM1）。スケールバーは100  $\mu$ mを表す。

[図9B]左は健常者iPS細胞から分化した水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞

胞を抗 $\alpha$ Aクリスタリン抗体で染色した蛍光顕微鏡写真（HC）。右はDM1患者iPS細胞から分化した水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞を抗 $\alpha$ Aクリスタリン抗体で染色した蛍光顕微鏡写真（DM1）。スケールバーは200 $\mu$ mを表す。

[図9C]左は健常者iPS細胞から分化した水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞についてCy3標識した（CAG）<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真（HC）。中央はDM1患者iPS細胞から分化した水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞についてCy3標識した（CAG）<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真（DM1）。右はASO-4M（ASO-4と同じ）で処理したDM1患者iPS細胞から分化した水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞についてCy3標識した（CAG）<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真（DM1+ASO-4M）。

[図9D]左は、図9CのHC、DM1及びDM1+ASO-4MのそれぞれについてのFISH結果から算出した細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数±標準偏差を表す棒グラフ。右は図9CのHC、DM1及びDM1+ASO-4MのそれぞれについてのFISH結果から算出した全細胞中RNA凝集体の百分率の平均±標準偏差を表す棒グラフ。

[図10A]左は分化条件での培養4カ月後の健常者iPS細胞由来の皮膚オルガノイドの明視野顕微鏡写真（HC）。右はDM1患者iPS細胞由来の皮膚オルガノイドの明視野顕微鏡写真（DM1）。スケールバーは500 $\mu$ mを表す。

[図10B]左は健常者iPS細胞由来の皮膚オルガノイドについてCy3標識した（CAG）<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真（HC）。中央はDM1患者iPS細胞由来の皮膚オルガノイドについてCy3標識した（CAG）<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真（DM1）。右はDM1患者iPS細胞由来の皮膚オルガノイドについてASO-4Mで処理した後にCy3標識した（CAG）<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真（DM1+ASO-4M）。

鏡写真 (DM1)。右はASO-4M (ASO-4と同じ) で処理したDM1患者iPS細胞由来の皮膚オルガノイドについてCy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA-DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真 (DM1+ASO-4M)。スケールバーは20  $\mu$ mを表す。

[図10C]図10BのHC、DM1及びDM1+ASO-4MのそれぞれについてのFISH結果から算出した全細胞中RNA凝集体が検出される細胞の百分率の平均±標準偏差を表す棒グラフ。

[図11A]テトラサイクリン誘導性NGN2発現システムを用いたDM1患者由来のiPS細胞 (DM-1~3) 及び健常者由来のiPS細胞 (HC-1~3) の未分化細胞から神経細胞への分化実験系の手順を示す概念図。「B27/N2/NB+DOX」及び「B27/NB+DOX」は分化誘導剤としてドキシサイクリンを添加した神経細胞誘導用の培地で培養される期間を表し、「B27/NB」は分化した神経細胞用の培地で培養される期間を表す。テトラサイクリン誘導性NGN2発現システムをトランスフェクションにより導入した未分化iPS細胞に、神経細胞誘導用培地に培地を変更して分化誘導を第0日に開始し、第8日に分化誘導剤を含まない神経細胞用の培地に変更して分化誘導を終了し、第11日に解析を行った。

[図11B]抗チューブリン $\beta$ III抗体で染色し、DAPI対比染色を行ったDM1患者由来iPS細胞から分化したニューロンの蛍光顕微鏡写真。スケールバーは100  $\mu$ mを表す。

[図11C]健常者由来のiPS細胞 (HC-1~3) 及びDM1患者由来のiPS細胞 (DM-1~3) から分化したニューロンを、抗チューブリン $\beta$ III抗体 (上段)、抗MAP2抗体 (中段) 又は抗チューブリン $\beta$ III抗体及び抗Tbr1抗体で染色し、DAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真の合成画像。

[図11D]健常者由来のiPS細胞 (HC-1~3) 及びDM1患者由来のiPS細胞 (DM-1~3) から分化したニューロンについてCy3標識した (

(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真。

[図11E]左は、図11CのHC-1～3及びDM-1～3のそれぞれについてのFISH結果から算出した細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数±標準偏差を表す棒グラフ。右は図11CのHC-1～3及びDM-1～3のそれぞれについてのFISH結果から算出した全細胞中RNA凝集体の百分率の平均±標準偏差を表す棒グラフ。

[図11F]上左は、Control ASOで処理したDM1患者iPS細胞由来のニューロンについてCy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISHと、抗チューブリンβIII抗体による染色と、DAPI対比染色とを行った蛍光顕微鏡写真の合成画像(Control)。上右は、ASO-4M(ASO-4と同じ)で処理したDM1患者iPS細胞由来のニューロンについてCy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISHと、抗チューブリンβIII抗体による染色と、DAPI対比染色とを行った蛍光顕微鏡写真の合成画像(ASO-4M)。下左は図11Fの上のFISH結果から算出した、ASO-4M又はControl ASOで処理するか、あるいは、ASO処理を行わないDM1患者iPS細胞由来のニューロンの細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数±標準偏差を表す棒グラフ(それぞれ、ASO-4M、Control ASO又はUntreated)。下右は図11Fの上のFISH結果から算出した、ASO-4M又はControl ASOで処理するか、あるいは、ASO処理を行わないDM1患者iPS細胞由来のニューロンの全細胞中RNA凝集体の百分率の平均±標準偏差を表す棒グラフ(それぞれ、ASO-4M、Control ASO又はUntreated)。

### 発明を実施するための形態

[0033] 本発明の1つの実施態様は医薬組成物である。本発明の医薬組成物は、5'末端から3'末端に、シトシン-アデニン-グアニンのトリヌクレオチドが5～13回繰り返す反復配列のいずれかの塩基配列を有するオリゴヌクレ

オチドを含み、該オリゴヌクレオチドは、RNAse H非活性型ヌクレオチド類似体及び／又はヌクレオチド間結合を少なくとも２種類含むミックスマー構造を有する。

[0034] 本明細書で説明するオリゴヌクレオチドの塩基配列は本明細書に添付する配列表の配列番号１～２３に示す。これらの配列のうち、５′末端から３′末端に、シトシンーアデニンーグアニンのトリヌクレオチドが５～１３回繰り返す反復配列の塩基配列と、本明細書に添付する配列表の配列番号との対応を表１に示す。

[0035] [表１]

| 配列番号  | 配列                  |
|-------|---------------------|
| 配列番号１ | (CAG) <sub>5</sub>  |
| 配列番号２ | (CAG) <sub>6</sub>  |
| 配列番号３ | (CAG) <sub>7</sub>  |
| 配列番号４ | (CAG) <sub>8</sub>  |
| 配列番号５ | (CAG) <sub>9</sub>  |
| 配列番号６ | (CAG) <sub>10</sub> |
| 配列番号７ | (CAG) <sub>11</sub> |
| 配列番号８ | (CAG) <sub>12</sub> |
| 配列番号９ | (CAG) <sub>13</sub> |

[0036] 表１において「(CAG)<sub>n</sub>」は、５′末端から３′末端への順にシチジン、アデノシン及びグアニンが連結したトリヌクレオチド反復回数がnのオリゴヌクレオチドを意味する。ここでnは５から１３までの任意の整数である。

[0037] 本明細書の実施例でiPS細胞に投与されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ASO-１～５で、対照として用いるASOはASO-A～Cである。ASO-１～３、４及び５の塩基配列を、それぞれ、本明細書に添付する配列表の配列番号１１～１３、３及び１４に列挙する。これらの塩基配列及び構造的特徴を表２に示す。



オキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシシチジン及びチミジンを表し、

隣接するヌクレオチド間はホスホジエステル結合で連結され、

下付き文字「E」の右のヌクレオチドは、 $\beta$ -D-ENA-核酸（以下、「ENA」という。）を表し、

下付き文字「m」の右のヌクレオチドは、2'-O-メチル（以下、「2'-OMe」という。）ヌクレオチド類似体を表す。

本発明のASOに用いることのできるヌクレオチド類似体については以下に詳しく説明する。

[0040] 前記ASOのうち、ASO-C、ASO-1～3及びASO-5は、ウィング領域を構成するヌクレオチドがENAで、ギャップセグメントを構成するヌクレオチドがDNAからなるギャップマー（以下、「ENA/DNAギャップマー」という。）構造を有する。ASO-1～3及びASO-5は、ギャップマーの全てのヌクレオチドが筋強直性ジストロフィー1型患者のDMPK遺伝子のRNAに対合し、かつ、ギャップセグメントを構成するヌクレオチドがDNAなので、前記ギャップマーがDMPK遺伝子のRNAと対合するとき、ギャップセグメント部分がDNAとRNAとのヘテロ2本鎖になるためRNase Hにより分解される。一方ASO-4は、シチジンの $\beta$ -D-ENA-修飾体と、2'-OMe-アデノシンと、2'-OMe-グアノシンとがこの順番に5'から3'に7回縦列で反復するENA及び2'-O-メチルリボヌクレオチドのミックスマー（以下、「ENA/2'-OMeリボヌクレオチド ミックスマー」という。）構造を有する。当該ミックスマーの全長は筋強直性ジストロフィー1型患者のDMPK遺伝子のRNAの3' UTR内のCUGトリヌクレオチドの反復配列と対合するが、ASO-4にはDNAが含まれないので、RNase Hにより分解されない。なお本発明のASO-Cは、他の研究（Hagemann, TLら、Ann Neurol, 83:27-39（2018））のアンチセンスオリゴヌクレオチドによる阻害実験に用いられた非特異的配列からなるオリゴヌ

クレオチドと塩基配列が同じで、ギャップマーのギャップセグメントがデオキシリボヌクレオチドである点も共通するが、当該他の研究ではギャップマーのウィング領域が2'-O-メトキシエチル（以下、「MOE」という。）ヌクレオチド類似体であるのに対し、本明細書で対照に用いるASO-Cのウィング領域はENAである点で異なる。

[0041] 以下の表3は、本発明の実施例のASOと、関連する先行技術のASOの構造を対比する表である。本発明の実施例のASOは、関連する先行技術のASOと塩基配列は同じなので、ASO-1及びPS115の塩基配列を本明細書に添付する配列表の配列番号11に列挙する。ASO-2及びASO-A（ISS445569）の塩基配列を配列番号12に列挙する。ASO-3及びPS116の塩基配列を配列番号13に列挙する。ASO-4及びASO-B（PS58）の塩基配列を配列番号3に列挙する。ASO-5及びISS486178の塩基配列を配列番号14に列挙する。Control ASOの塩基配列を配列番号23に列挙する。

[0042]

[表3]

|       | 配列番号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | タイプ | 構造 | 配列番号 |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----|------|
| ASO-1 | 5'-g <sub>1</sub> g <sub>2</sub> g <sub>3</sub> g <sub>4</sub> g <sub>5</sub> g <sub>6</sub> g <sub>7</sub> g <sub>8</sub> g <sub>9</sub> g <sub>10</sub> g <sub>11</sub> g <sub>12</sub> g <sub>13</sub> g <sub>14</sub> g <sub>15</sub> g <sub>16</sub> g <sub>17</sub> g <sub>18</sub> g <sub>19</sub> g <sub>20</sub> g <sub>21</sub> g <sub>22</sub> g <sub>23</sub> g <sub>24</sub> g <sub>25</sub> g <sub>26</sub> g <sub>27</sub> g <sub>28</sub> g <sub>29</sub> g <sub>30</sub> g <sub>31</sub> g <sub>32</sub> g <sub>33</sub> g <sub>34</sub> g <sub>35</sub> g <sub>36</sub> g <sub>37</sub> g <sub>38</sub> g <sub>39</sub> g <sub>40</sub> g <sub>41</sub> g <sub>42</sub> g <sub>43</sub> g <sub>44</sub> g <sub>45</sub> g <sub>46</sub> g <sub>47</sub> g <sub>48</sub> g <sub>49</sub> g <sub>50</sub> g <sub>51</sub> g <sub>52</sub> g <sub>53</sub> g <sub>54</sub> g <sub>55</sub> g <sub>56</sub> g <sub>57</sub> g <sub>58</sub> g <sub>59</sub> g <sub>60</sub> g <sub>61</sub> g <sub>62</sub> g <sub>63</sub> g <sub>64</sub> g <sub>65</sub> g <sub>66</sub> g <sub>67</sub> g <sub>68</sub> g <sub>69</sub> g <sub>70</sub> g <sub>71</sub> g <sub>72</sub> g <sub>73</sub> g <sub>74</sub> g <sub>75</sub> g <sub>76</sub> g <sub>77</sub> g <sub>78</sub> g <sub>79</sub> g <sub>80</sub> g <sub>81</sub> g <sub>82</sub> g <sub>83</sub> g <sub>84</sub> g <sub>85</sub> g <sub>86</sub> g <sub>87</sub> g <sub>88</sub> g <sub>89</sub> g <sub>90</sub> g <sub>91</sub> g <sub>92</sub> g <sub>93</sub> g <sub>94</sub> g <sub>95</sub> g <sub>96</sub> g <sub>97</sub> g <sub>98</sub> g <sub>99</sub> g <sub>100</sub> g <sub>101</sub> g <sub>102</sub> g <sub>103</sub> g <sub>104</sub> g <sub>105</sub> g <sub>106</sub> g <sub>107</sub> g <sub>108</sub> g <sub>109</sub> g <sub>110</sub> g <sub>111</sub> g <sub>112</sub> g <sub>113</sub> g <sub>114</sub> g <sub>115</sub> g <sub>116</sub> g <sub>117</sub> g <sub>118</sub> g <sub>119</sub> g <sub>120</sub> g <sub>121</sub> g <sub>122</sub> g <sub>123</sub> g <sub>124</sub> g <sub>125</sub> g <sub>126</sub> g <sub>127</sub> g <sub>128</sub> g <sub>129</sub> g <sub>130</sub> g <sub>131</sub> g <sub>132</sub> g <sub>133</sub> g <sub>134</sub> g <sub>135</sub> g <sub>136</sub> g <sub>137</sub> g <sub>138</sub> g <sub>139</sub> g <sub>140</sub> g <sub>141</sub> g <sub>142</sub> g <sub>143</sub> g <sub>144</sub> g <sub>145</sub> g <sub>146</sub> g <sub>147</sub> g <sub>148</sub> g <sub>149</sub> g <sub>150</sub> g <sub>151</sub> g <sub>152</sub> g <sub>153</sub> g <sub>154</sub> g <sub>155</sub> g <sub>156</sub> g <sub>157</sub> g <sub>158</sub> g <sub>159</sub> g <sub>160</sub> g <sub>161</sub> g <sub>162</sub> g <sub>163</sub> g <sub>164</sub> g <sub>165</sub> g <sub>166</sub> g <sub>167</sub> g <sub>168</sub> g <sub>169</sub> g <sub>170</sub> g <sub>171</sub> g <sub>172</sub> g <sub>173</sub> g <sub>174</sub> g <sub>175</sub> g <sub>176</sub> g <sub>177</sub> g <sub>178</sub> g <sub>179</sub> g <sub>180</sub> g <sub>181</sub> g <sub>182</sub> g <sub>183</sub> g <sub>184</sub> g <sub>185</sub> g <sub>186</sub> g <sub>187</sub> g <sub>188</sub> g <sub>189</sub> g <sub>190</sub> g <sub>191</sub> g <sub>192</sub> g <sub>193</sub> g <sub>194</sub> g <sub>195</sub> g <sub>196</sub> g <sub>197</sub> g <sub>198</sub> g <sub>199</sub> g <sub>200</sub> g <sub>201</sub> g <sub>202</sub> g <sub>203</sub> g <sub>204</sub> g <sub>205</sub> g <sub>206</sub> g <sub>207</sub> g <sub>208</sub> g <sub>209</sub> g <sub>210</sub> g <sub>211</sub> g <sub>212</sub> g <sub>213</sub> g <sub>214</sub> g <sub>215</sub> g <sub>216</sub> g <sub>217</sub> g <sub>218</sub> g <sub>219</sub> g <sub>220</sub> g <sub>221</sub> g <sub>222</sub> g <sub>223</sub> g <sub>224</sub> g <sub>225</sub> g <sub>226</sub> g <sub>227</sub> g <sub>228</sub> g <sub>229</sub> g <sub>230</sub> g <sub>231</sub> g <sub>232</sub> g <sub>233</sub> g <sub>234</sub> g <sub>235</sub> g <sub>236</sub> g <sub>237</sub> g <sub>238</sub> g <sub>239</sub> g <sub>240</sub> g <sub>241</sub> g <sub>242</sub> g <sub>243</sub> g <sub>244</sub> g <sub>245</sub> g <sub>246</sub> g <sub>247</sub> g <sub>248</sub> g <sub>249</sub> g <sub>250</sub> g <sub>251</sub> g <sub>252</sub> g <sub>253</sub> g <sub>254</sub> g <sub>255</sub> g <sub>256</sub> g <sub>257</sub> g <sub>258</sub> g <sub>259</sub> g <sub>260</sub> g <sub>261</sub> g <sub>262</sub> g <sub>263</sub> g <sub>264</sub> g <sub>265</sub> g <sub>266</sub> g <sub>267</sub> g <sub>268</sub> g <sub>269</sub> g <sub>270</sub> g <sub>271</sub> g <sub>272</sub> g <sub>273</sub> g <sub>274</sub> g <sub>275</sub> g <sub>276</sub> g <sub>277</sub> g <sub>278</sub> g <sub>279</sub> g <sub>280</sub> g <sub>281</sub> g <sub>282</sub> g <sub>283</sub> g <sub>284</sub> g <sub>285</sub> g <sub>286</sub> g <sub>287</sub> g <sub>288</sub> g <sub>289</sub> g <sub>290</sub> g <sub>291</sub> g <sub>292</sub> g <sub>293</sub> g <sub>294</sub> g <sub>295</sub> g <sub>296</sub> g <sub>297</sub> g <sub>298</sub> g <sub>299</sub> g <sub>300</sub> g <sub>301</sub> g <sub>302</sub> g <sub>303</sub> g <sub>304</sub> g <sub>305</sub> g <sub>306</sub> g <sub>307</sub> g <sub>308</sub> g <sub>309</sub> g <sub>310</sub> g <sub>311</sub> g <sub>312</sub> g <sub>313</sub> g <sub>314</sub> g <sub>315</sub> g <sub>316</sub> g <sub>317</sub> g <sub>318</sub> g <sub>319</sub> g <sub>320</sub> g <sub>321</sub> g <sub>322</sub> g <sub>323</sub> g <sub>324</sub> g <sub>325</sub> g <sub>326</sub> g <sub>327</sub> g <sub>328</sub> g <sub>329</sub> g <sub>330</sub> g <sub>331</sub> g <sub>332</sub> g <sub>333</sub> g <sub>334</sub> g <sub>335</sub> g <sub>336</sub> g <sub>337</sub> g <sub>338</sub> g <sub>339</sub> g <sub>340</sub> g <sub>341</sub> g <sub>342</sub> g <sub>343</sub> g <sub>344</sub> g <sub>345</sub> g <sub>346</sub> g <sub>347</sub> g <sub>348</sub> g <sub>349</sub> g <sub>350</sub> g <sub>351</sub> g <sub>352</sub> g <sub>353</sub> g <sub>354</sub> g <sub>355</sub> g <sub>356</sub> g <sub>357</sub> g <sub>358</sub> g <sub>359</sub> g <sub>360</sub> g <sub>361</sub> g <sub>362</sub> g <sub>363</sub> g <sub>364</sub> g <sub>365</sub> g <sub>366</sub> g <sub>367</sub> g <sub>368</sub> g <sub>369</sub> g <sub>370</sub> g <sub>371</sub> g <sub>372</sub> g <sub>373</sub> g <sub>374</sub> g <sub>375</sub> g <sub>376</sub> g <sub>377</sub> g <sub>378</sub> g <sub>379</sub> g <sub>380</sub> g <sub>381</sub> g <sub>382</sub> g <sub>383</sub> g <sub>384</sub> g <sub>385</sub> g <sub>386</sub> g <sub>387</sub> g <sub>388</sub> g <sub>389</sub> g <sub>390</sub> g <sub>391</sub> g <sub>392</sub> g <sub>393</sub> g <sub>394</sub> g <sub>395</sub> g <sub>396</sub> g <sub>397</sub> g <sub>398</sub> g <sub>399</sub> g <sub>400</sub> g <sub>401</sub> g <sub>402</sub> g <sub>403</sub> g <sub>404</sub> g <sub>405</sub> g <sub>406</sub> g <sub>407</sub> g <sub>408</sub> g <sub>409</sub> g <sub>410</sub> g <sub>411</sub> g <sub>412</sub> g <sub>413</sub> g <sub>414</sub> g <sub>415</sub> g <sub>416</sub> g <sub>417</sub> g <sub>418</sub> g <sub>419</sub> g <sub>420</sub> g <sub>421</sub> g <sub>422</sub> g <sub>423</sub> g <sub>424</sub> g <sub>425</sub> g <sub>426</sub> g <sub>427</sub> g <sub>428</sub> g <sub>429</sub> g <sub>430</sub> g <sub>431</sub> g <sub>432</sub> g <sub>433</sub> g <sub>434</sub> g <sub>435</sub> g <sub>436</sub> g <sub>437</sub> g <sub>438</sub> g <sub>439</sub> g <sub>440</sub> g <sub>441</sub> g <sub>442</sub> g <sub>443</sub> g <sub>444</sub> g <sub>445</sub> g <sub>446</sub> g <sub>447</sub> g <sub>448</sub> g <sub>449</sub> g <sub>450</sub> g <sub>451</sub> g <sub>452</sub> g <sub>453</sub> g <sub>454</sub> g <sub>455</sub> g <sub>456</sub> g <sub>457</sub> g <sub>458</sub> g <sub>459</sub> g <sub>460</sub> g <sub>461</sub> g <sub>462</sub> g <sub>463</sub> g <sub>464</sub> g <sub>465</sub> g <sub>466</sub> g <sub>467</sub> g <sub>468</sub> g <sub>469</sub> g <sub>470</sub> g <sub>471</sub> g <sub>472</sub> g <sub>473</sub> g <sub>474</sub> g <sub>475</sub> g <sub>476</sub> g <sub>477</sub> g <sub>478</sub> g <sub>479</sub> g <sub>480</sub> g <sub>481</sub> g <sub>482</sub> g <sub>483</sub> g <sub>484</sub> g <sub>485</sub> g <sub>486</sub> g <sub>487</sub> g <sub>488</sub> g <sub>489</sub> g <sub>490</sub> g <sub>491</sub> g <sub>492</sub> g <sub>493</sub> g <sub>494</sub> g <sub>495</sub> g <sub>496</sub> g <sub>497</sub> g <sub>498</sub> g <sub>499</sub> g <sub>500</sub> g <sub>501</sub> g <sub>502</sub> g <sub>503</sub> g <sub>504</sub> g <sub>505</sub> g <sub>506</sub> g <sub>507</sub> g <sub>508</sub> g <sub>509</sub> g <sub>510</sub> g <sub>511</sub> g <sub>512</sub> g <sub>513</sub> g <sub>514</sub> g <sub>515</sub> g <sub>516</sub> g <sub>517</sub> g <sub>518</sub> g <sub>519</sub> g <sub>520</sub> g <sub>521</sub> g <sub>522</sub> g <sub>523</sub> g <sub>524</sub> g <sub>525</sub> g <sub>526</sub> g <sub>527</sub> g <sub>528</sub> g <sub>529</sub> g <sub>530</sub> g <sub>531</sub> g <sub>532</sub> g <sub>533</sub> g <sub>534</sub> g <sub>535</sub> g <sub>536</sub> g <sub>537</sub> g <sub>538</sub> g <sub>539</sub> g <sub>540</sub> g <sub>541</sub> g <sub>542</sub> g <sub>543</sub> g <sub>544</sub> g <sub>545</sub> g <sub>546</sub> g <sub>547</sub> g <sub>548</sub> g <sub>549</sub> g <sub>550</sub> g <sub>551</sub> g <sub>552</sub> g <sub>553</sub> g <sub>554</sub> g <sub>555</sub> g <sub>556</sub> g <sub>557</sub> g <sub>558</sub> g <sub>559</sub> g <sub>560</sub> g <sub>561</sub> g <sub>562</sub> g <sub>563</sub> g <sub>564</sub> g <sub>565</sub> g <sub>566</sub> g <sub>567</sub> g <sub>568</sub> g <sub>569</sub> g <sub>570</sub> g <sub>571</sub> g <sub>572</sub> g <sub>573</sub> g <sub>574</sub> g <sub>575</sub> g <sub>576</sub> g <sub>577</sub> g <sub>578</sub> g <sub>579</sub> g <sub>580</sub> g <sub>581</sub> g <sub>582</sub> g <sub>583</sub> g <sub>584</sub> g <sub>585</sub> g <sub>586</sub> g <sub>587</sub> g <sub>588</sub> g <sub>589</sub> g <sub>590</sub> g <sub>591</sub> g <sub>592</sub> g <sub>593</sub> g <sub>594</sub> g <sub>595</sub> g <sub>596</sub> g <sub>597</sub> g <sub>598</sub> g <sub>599</sub> g <sub>600</sub> g <sub>601</sub> g <sub>602</sub> g <sub>603</sub> g <sub>604</sub> g <sub>605</sub> g <sub>606</sub> g <sub>607</sub> g <sub>608</sub> g <sub>609</sub> g <sub>610</sub> g <sub>611</sub> g <sub>612</sub> g <sub>613</sub> g <sub>614</sub> g <sub>615</sub> g <sub>616</sub> g <sub>617</sub> g <sub>618</sub> g <sub>619</sub> g <sub>620</sub> g <sub>621</sub> g <sub>622</sub> g <sub>623</sub> g <sub>624</sub> g <sub>625</sub> g <sub>626</sub> g <sub>627</sub> g <sub>628</sub> g <sub>629</sub> g <sub>630</sub> g <sub>631</sub> g <sub>632</sub> g <sub>633</sub> g <sub>634</sub> g <sub>635</sub> g <sub>636</sub> g <sub>637</sub> g <sub>638</sub> g <sub>639</sub> g <sub>640</sub> g <sub>641</sub> g <sub>642</sub> g <sub>643</sub> g <sub>644</sub> g <sub>645</sub> g <sub>646</sub> g <sub>647</sub> g <sub>648</sub> g <sub>649</sub> g <sub>650</sub> g <sub>651</sub> g <sub>652</sub> g <sub>653</sub> g <sub>654</sub> g <sub>655</sub> g <sub>656</sub> g <sub>657</sub> g <sub>658</sub> g <sub>659</sub> g <sub>660</sub> g <sub>661</sub> g <sub>662</sub> g <sub>663</sub> g <sub>664</sub> g <sub>665</sub> g <sub>666</sub> g <sub>667</sub> g <sub>668</sub> g <sub>669</sub> g <sub>670</sub> g <sub>671</sub> g <sub>672</sub> g <sub>673</sub> g <sub>674</sub> g <sub>675</sub> g <sub>676</sub> g <sub>677</sub> g <sub>678</sub> g <sub>679</sub> g <sub>680</sub> g <sub>681</sub> g <sub>682</sub> g <sub>683</sub> g <sub>684</sub> g <sub>685</sub> g <sub>686</sub> g <sub>687</sub> g <sub>688</sub> g <sub>689</sub> g <sub>690</sub> g <sub>691</sub> g <sub>692</sub> g <sub>693</sub> g <sub>694</sub> g <sub>695</sub> g <sub>696</sub> g <sub>697</sub> g <sub>698</sub> g <sub>699</sub> g <sub>700</sub> g <sub>701</sub> g <sub>702</sub> g <sub>703</sub> g <sub>704</sub> g <sub>705</sub> g <sub>706</sub> g <sub>707</sub> g <sub>708</sub> g <sub>709</sub> g <sub>710</sub> g <sub>711</sub> g <sub>712</sub> g <sub>713</sub> g <sub>714</sub> g <sub>715</sub> g <sub>716</sub> g <sub>717</sub> g <sub>718</sub> g <sub>719</sub> g <sub>720</sub> g <sub>721</sub> g <sub>722</sub> g <sub>723</sub> g <sub>724</sub> g <sub>725</sub> g <sub>726</sub> g <sub>727</sub> g <sub>728</sub> g <sub>729</sub> g <sub>730</sub> g <sub>731</sub> g <sub>732</sub> g <sub>733</sub> g <sub>734</sub> g <sub>735</sub> g <sub>736</sub> g <sub>737</sub> g <sub>738</sub> g <sub>739</sub> g <sub>740</sub> g <sub>741</sub> g <sub>742</sub> g <sub>743</sub> g <sub>744</sub> g <sub>745</sub> g <sub>746</sub> g <sub>747</sub> g <sub>748</sub> g <sub>749</sub> g <sub>750</sub> g <sub>751</sub> g <sub>752</sub> g <sub>753</sub> g <sub>754</sub> g <sub>755</sub> g <sub>756</sub> g <sub>757</sub> g <sub>758</sub> g <sub>759</sub> g <sub>760</sub> g <sub>761</sub> g <sub>762</sub> g <sub>763</sub> g <sub>764</sub> g <sub>765</sub> g <sub>766</sub> g <sub>767</sub> g <sub>768</sub> g <sub>769</sub> g <sub>770</sub> g <sub>771</sub> g <sub>772</sub> g <sub>773</sub> g <sub>774</sub> g <sub>775</sub> g <sub>776</sub> g <sub>777</sub> g <sub>778</sub> g <sub>779</sub> g <sub>780</sub> g <sub>781</sub> g <sub>782</sub> g <sub>783</sub> g <sub>784</sub> g <sub>785</sub> g <sub>786</sub> g <sub>787</sub> g <sub>788</sub> g <sub>789</sub> g <sub>790</sub> g <sub>791</sub> g <sub>792</sub> g <sub>793</sub> g <sub>794</sub> g <sub>795</sub> g <sub>796</sub> g <sub>797</sub> g <sub>798</sub> g <sub>799</sub> g <sub>800</sub> g <sub>801</sub> g <sub>802</sub> g <sub>803</sub> g <sub>804</sub> g <sub>805</sub> g <sub>806</sub> g <sub>807</sub> g <sub>808</sub> g <sub>809</sub> g <sub>810</sub> g <sub>811</sub> g <sub>812</sub> g <sub>813</sub> g <sub>814</sub> g <sub>815</sub> g <sub>816</sub> g <sub>817</sub> g <sub>818</sub> g <sub>819</sub> g <sub>820</sub> g <sub>821</sub> g <sub>822</sub> g <sub>823</sub> g <sub>824</sub> g <sub>825</sub> g <sub>826</sub> g <sub>827</sub> g <sub>828</sub> g <sub>829</sub> g <sub>830</sub> g <sub>831</sub> g <sub>832</sub> g <sub>833</sub> g <sub>834</sub> g <sub>835</sub> g <sub>836</sub> g <sub>837</sub> g <sub>838</sub> g <sub>839</sub> g <sub>840</sub> g <sub>841</sub> g <sub>842</sub> g <sub>843</sub> g <sub>844</sub> g <sub>845</sub> g <sub>846</sub> g <sub>847</sub> g <sub>848</sub> g <sub>849</sub> g <sub>850</sub> g <sub>851</sub> g <sub>852</sub> g <sub>853</sub> g <sub>854</sub> g <sub>855</sub> g <sub>856</sub> g <sub>857</sub> g <sub>858</sub> g <sub>859</sub> g <sub>860</sub> g <sub>861</sub> g <sub>862</sub> g <sub>863</sub> g <sub>864</sub> g <sub>865</sub> g <sub>866</sub> g <sub>867</sub> g <sub>868</sub> g <sub>869</sub> g <sub>870</sub> g <sub>871</sub> g <sub>872</sub> g <sub>873</sub> g <sub>874</sub> g <sub>875</sub> g <sub>876</sub> g <sub>877</sub> g <sub>878</sub> g <sub>879</sub> g <sub>880</sub> g <sub>881</sub> g <sub>882</sub> g <sub>883</sub> g <sub>884</sub> g <sub>885</sub> g <sub>886</sub> g <sub>887</sub> g <sub>888</sub> g <sub>889</sub> g <sub>890</sub> g <sub>891</sub> g <sub>892</sub> g <sub>893</sub> g <sub>894</sub> g <sub>895</sub> g <sub>896</sub> g <sub>897</sub> g <sub>898</sub> g <sub>899</sub> g <sub>900</sub> g <sub>901</sub> g <sub>902</sub> g <sub>903</sub> g <sub>904</sub> g <sub>905</sub> g <sub>906</sub> g <sub>907</sub> g <sub>908</sub> g <sub>909</sub> g <sub>910</sub> g <sub>911</sub> g <sub>912</sub> g <sub>913</sub> g <sub>914</sub> g <sub>915</sub> g <sub>916</sub> g <sub>917</sub> g <sub>918</sub> g <sub>919</sub> g <sub>920</sub> g <sub>921</sub> g <sub>922</sub> g <sub>923</sub> g <sub>924</sub> g <sub>925</sub> g <sub>926</sub> g <sub>927</sub> g <sub>928</sub> g <sub>929</sub> g <sub>930</sub> g <sub>931</sub> g <sub>932</sub> g <sub>933</sub> g <sub>934</sub> g <sub>935</sub> g <sub>936</sub> g <sub>937</sub> g <sub>938</sub> g <sub>939</sub> g <sub>940</sub> g <sub>941</sub> g <sub>942</sub> g <sub>943</sub> g <sub>944</sub> g <sub>945</sub> g <sub>946</sub> g <sub>947</sub> g <sub>948</sub> g <sub>949</sub> g <sub>950</sub> g <sub>951</sub> g <sub>952</sub> g <sub>953</sub> g <sub>954</sub> g <sub>955</sub> g <sub>956</sub> g <sub>957</sub> g <sub>958</sub> g <sub>959</sub> g <sub>960</sub> g <sub>961</sub> g <sub>962</sub> g <sub>963</sub> g <sub>964</sub> g <sub>965</sub> g <sub>966</sub> g <sub>967</sub> g <sub>968</sub> g <sub>969</sub> g <sub>970</sub> g <sub>971</sub> g <sub>972</sub> g <sub>973</sub> g <sub>974</sub> g <sub>975</sub> g <sub>976</sub> g <sub>977</sub> g <sub>978</sub> g <sub>979</sub> g <sub>980</sub> g <sub>981</sub> g <sub>982</sub> g <sub>983</sub> g <sub>984</sub> g <sub>985</sub> g <sub>986</sub> g <sub>987</sub> g <sub>988</sub> g <sub>989</sub> g <sub>990</sub> g <sub>991</sub> g <sub>992</sub> g <sub>993</sub> g <sub>994</sub> g <sub>995</sub> g <sub>996</sub> g <sub>997</sub> g <sub>998</sub> g <sub>999</sub> g <sub>1000</sub> g <sub>1001</sub> g <sub>1002</sub> g <sub>1003</sub> g <sub>1004</sub> g <sub>1005</sub> g <sub>1006</sub> g <sub>1007</sub> g <sub>1008</sub> g <sub>1009</sub> g <sub>1010</sub> g <sub>1011</sub> g <sub>1012</sub> g <sub>1013</sub> g <sub>1014</sub> g <sub>1015</sub> g <sub>1016</sub> g <sub>1017</sub> g <sub>1018</sub> g <sub>1019</sub> g <sub>1020</sub> g <sub>1021</sub> g <sub>1022</sub> g <sub>1023</sub> g <sub>1024</sub> g <sub>1025</sub> g <sub>1026</sub> g <sub>1027</sub> g <sub>1028</sub> g <sub>1029</sub> g <sub>1030</sub> g <sub>1031</sub> g <sub>1032</sub> g <sub>1033</sub> g <sub>1034</sub> g <sub>1035</sub> g <sub>1036</sub> g <sub>1037</sub> g <sub>1038</sub> g <sub>1039</sub> g <sub>1040</sub> g <sub>1041</sub> g <sub>1042</sub> g <sub>1043</sub> g <sub>1044</sub> g <sub>1045</sub> g <sub>1046</sub> g <sub>1047</sub> g <sub>1048</sub> g <sub>1049</sub> g <sub>1050</sub> g <sub>1051</sub> g <sub>1052</sub> g <sub>1053</sub> g <sub>1054</sub> g <sub>1055</sub> g <sub>1056</sub> g <sub>1057</sub> g <sub>1058</sub> g <sub>1059</sub> g <sub>1060</sub> g <sub>1061</sub> g <sub>1062</sub> g <sub>1063</sub> g <sub>1064</sub> g <sub>1065</sub> g <sub>1066</sub> g <sub>1067</sub> g <sub>1068</sub> g <sub>1069</sub> g <sub>1070</sub> g <sub>1071</sub> g <sub>1072</sub> g <sub>1073</sub> g <sub>1074</sub> g <sub>1075</sub> g <sub>1076</sub> g <sub>1077</sub> g <sub>1078</sub> g <sub>1079</sub> g <sub>1080</sub> g <sub>1081</sub> g <sub>1082</sub> g <sub>1083</sub> g <sub>1084</sub> g <sub>1085</sub> g <sub>1086</sub> g <sub>1087</sub> g <sub>1088</sub> g <sub>1089</sub> g <sub>1090</sub> g <sub>1091</sub> g <sub>1092</sub> g <sub>1093</sub> g <sub>1094</sub> g <sub>1095</sub> g <sub>1096</sub> g <sub>1097</sub> g <sub>1098</sub> g <sub>1099</sub> g <sub>1100</sub> g <sub>1101</sub> g <sub>1102</sub> g <sub>1103</sub> g <sub>1104</sub> g <sub>1105</sub> g <sub>1106</sub> g <sub>1107</sub> g <sub>1108</sub> g <sub>1109</sub> g <sub>1110</sub> g <sub>1111</sub> g <sub>1112</sub> g <sub>1113</sub> g <sub>1114</sub> g <sub>1115</sub> g <sub>1116</sub> g <sub>1117</sub> g <sub>1118</sub> g <sub>1119</sub> g <sub>1120</sub> g <sub>1121</sub> g <sub>1122</sub> g <sub>1123</sub> g <sub>1124</sub> g <sub>1125</sub> g <sub>1126</sub> g <sub>1127</sub> g <sub>1128</sub> g <sub>1129</sub> g <sub>1130</sub> g <sub>1131</sub> g <sub>1132</sub> g <sub>1133</sub> g <sub>1134</sub> g <sub>1135</sub> g <sub>1136</sub> g <sub>1137</sub> g <sub>1138</sub> g <sub>1139</sub> g <sub>1140</sub> g <sub>1141</sub> g <sub>1142</sub> g <sub>1143</sub> g <sub>1144</sub> g <sub>1145</sub> g <sub>1146</sub> g <sub>1147</sub> g <sub>1148</sub> g <sub>1149</sub> g <sub>1150</sub> g <sub>1151</sub> g <sub>1152</sub> g <sub>1153</sub> g <sub>1154</sub> g <sub>1155</sub> g <sub>1156</sub> g <sub>1157</sub> g <sub>1158</sub> g <sub>1159</sub> g <sub>1160</sub> g <sub>1161</sub> g <sub>1162</sub> g <sub>1163</sub> g <sub>1164</sub> g <sub>1165</sub> g <sub>1166</sub> g <sub>1167</sub> g <sub>1168</sub> g <sub>1169</sub> g <sub>1170</sub> g <sub>1171</sub> g <sub>1172</sub> g <sub>1173</sub> g <sub>1174</sub> g <sub>1175</sub> g <sub>1176</sub> g <sub>1177</sub> g <sub>1178</sub> g <sub>1179</sub> g <sub>1180</sub> g <sub>1181</sub> g <sub>1182</sub> g <sub>1183</sub> g <sub>1184</sub> g <sub>1185</sub> g <sub>1186</sub> g <sub>1187</sub> g <sub>1188</sub> g <sub>1189</sub> g <sub>1190</sub> g <sub>1191</sub> g <sub>1192</sub> g <sub>1193</sub> g <sub>1194</sub> g <sub>1195</sub> g <sub>1196</sub> g <sub>1197</sub> g <sub>1198</sub> g <sub>1199</sub> g <sub>1200</sub> g <sub>1201</sub> g <sub>1202</sub> g <sub>1203</sub> g <sub>1204</sub> g <sub>1205</sub> |     |    |      |

ジンを表し、「d A」、「d G」、「d C」及び「d T」は、それぞれ、デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシシチジン及びチミジンを表し、

下付き文字「k」の右のヌクレオチドは、 $6' - (S) - CH_3$ 二環式ヌクレオチド類似体（以下、「c E t」という。）を表し、

下付き文字「e」の右のヌクレオチドは、 $2' - O -$ メトキシエチル（以下、「M O E」という。）ヌクレオチド類似体を表し、

下付き文字「E」の右のヌクレオチドは、E N Aを表し、

下付き文字「m」の右のヌクレオチドは、 $2' - OMe$ ヌクレオチド類似体を表し、

下付き文字「s」は、その左のヌクレオシドとその右のヌクレオチドとの間の結合が、ホスホジエステル結合ではなく、ホスホロチオアート（p h o s p h o r o t h i o a t e、以下「P T」という。）結合であることを表す。「m C」は、5メチルシトシンヌクレオシドを示す。

[0044] 表3において「u n i f o r m l y m o d i f i e d」とは、当該オリゴヌクレオチドの全てのヌクレオチドが同一の修飾糖を有し、かつ、全てのヌクレオチド間の結合が同一の修飾結合であることを表す。

[0045] A S O - 1に関連する先行技術は非特許文献7に記載のP S 1 1 5である。P S 1 1 5は、A S O - 1と塩基配列が同じ点で共通する。しかし、全てのヌクレオシド間の結合がA S O - 1ではホスホジエステル結合であるのに対し、P S 1 1 5ではP T結合である点、及び、A S O - 1はウィング領域がE N Aからなるギャップマーであるのに対しP S 1 1 5では全てデオキシリボヌクレオチドである点で異なる。

[0046] A S O - 2に関連する先行技術は、非特許文献5及び6に記載のI S I S 4 4 5 5 6 9（以下、「A S O - A」ともいう。）である。I S I S 4 4 5 5 6 9は、A S O - 2と塩基配列は同じで、同じ長さのウィング領域からなるギャップマー構造である点で共通する。しかし、全てのヌクレオシド間の結合がA S O - 2ではホスホジエステル結合であるのに対し、I S I S

4 4 5 5 6 9ではP T結合である点、ギャップマーのウィング領域がA S O-2ではE N Aであるのに対しI S I S 4 4 5 5 6 9ではM O E-ヌクレオチド類似体である点、及び、5'末端及び3'末端のヌクレオチドがA S O-2ではシチジンであるのにI S I S 4 4 5 5 6 9では5-メチルシチジンである点で異なる。

[0047] A S O-3に関連する先行技術は非特許文献7に記載のP S 1 1 6である。P S 1 1 6は、A S O-3と塩基配列は同じ点は共通する。しかし、全てのヌクレオチド間の結合がA S O-3ではホスホジエステル結合であるのに対し、P S 1 1 6ではP T結合である点、及び、A S O-3はウィング領域がE N Aからなるギャップマーであるのに対しP S 1 1 5では全てデオキシリボヌクレオチドである点で異なる。

[0048] A S O-4に関連する先行技術は、非特許文献7及び8に記載のP S 5 8である。P S 5 8（以下、「A S O-B」ともいう。）は、A S O-4と塩基配列が同じで、全てのアデノシンヌクレオチド及びグアノシンヌクレオチドがO M eヌクレオチド類似体である点は共通である。しかし、P S 5 8はシチジンヌクレオチドもO M eヌクレオチド類似体であるのに対し、A S O-4ではシチジンヌクレオチドはE N Aである点で異なる。またP S 5 8は全てのヌクレオチド間結合が全てP T結合であるのに対し、A S O-4のヌクレオチド間結合は全てホスホジエステル結合である点でも異なる。

[0049] A S O-5に関連する先行技術は、非特許文献6に記載のI S I S 4 8 6 1 7 8である。I S I S 4 8 6 1 7 8はA S O-5と塩基配列は同じで、同じ長さのウィング領域からなるギャップマー構造である点は共通する。しかし、A S O-5はE N A/D N Aギャップマーであるのに対し、I S I S 4 8 6 1 7 8は、ウィング領域が6'-(S)-CH<sub>3</sub>二環式(c E t)ヌクレオチドでギャップ領域が未修飾デオキシリボヌクレオチドからなるギャップマー（以下、「c E t/D N Aギャップマー」という）である点で異なる。

[0050] トリプレットリピートプライムP C R（以下、「T P-P C R」という。

) 解析に用いたプライマーの組を表4に示す。各プライマーの塩基配列は本明細書に添付する配列表の配列番号15～22に列挙する。

[0051] [表4]

|                          | プライマー名                   | 配列                                               | 配列番号   |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------|--------|
| TP-POR<br>フォワード<br>プライマー | FAM-P1-F                 | 5'-YAM-GGGCTCGAGGGTCTCTGT-3'                     | 配列番号15 |
|                          | P2-R                     | 5'-GTGCGTGGAGGATCGAACAG-3'                       | 配列番号16 |
|                          | P3                       | 5'-AGCGGATTAACAATTTCACACAGGA-3'                  | 配列番号17 |
|                          | P4-(GAG) <sub>6</sub> -R | 5'-AGCGGATTAACAATTTCACACAGGACAGCAGCAGCAG-3'      | 配列番号18 |
| TP-POR<br>リバース<br>プライマー  | P1-F                     | 5'-GGGGCTCGAAGGCTCTCTGT-3'                       | 配列番号19 |
|                          | HEX-P2-R                 | 5'-Hex-GTGGCTGGAGGATCGAACAG-3'                   | 配列番号20 |
|                          | P3                       | 5'-AGCGGATTAACAATTTCACACAGGA-3'                  | 配列番号21 |
|                          | P4(CTG) <sub>6</sub> -F  | 5'-AGAGGATTAACAATTTCACACAGGATGCTGCTGCTGCTGCTG-3' | 配列番号22 |

[0052] 表4のプライマーFAM-P1-Fの配列における「FAM-」は、当該プライマーオリゴヌクレオチドの5'末端に6-カルボキシフルオレセイン

が共有結合することを意味し、表4のプライマーHEX-P2-Rの配列における「HEX-」は、当該プライマーオリゴヌクレオチドの5'末端にヘキサクロロフルオレセインが共有結合することを意味する。

[0053] 本発明に係るオリゴヌクレオチドは、RNase Hで切断されないミックスマー構造を有する。ここで「ミックスマー構造」とは、RNase H活性型ヌクレオチドとRNase H非活性型ヌクレオチドとが混在する1本鎖オリゴヌクレオチドの構造であって、該1本鎖オリゴヌクレオチドが相補的なRNAと対合して形成されるヘテロ2本鎖核酸はRNase Hによって分解されない構造を指す。Monia, B. P. ら (J. Biological Chem., 268: 14514 (1993)) によれば、少なくとも5個のRNase H活性型ヌクレオチドが連続するギャップ領域をRNase H非活性型ヌクレオチドのウィング領域が挟むギャップマーASOと該ASOに相補的なRNAとのヘテロ2本鎖核酸に対するRNase Hによる分解活性は75%を超えたが、4個以下のRNase H活性型ヌクレオチドが連続するギャップ領域をRNase H非活性型ヌクレオチドのウィング領域が挟むギャップマーASOと該ASOに相補的なRNAとのヘテロ2本鎖核酸に対するRNase Hによる分解活性は20%未満であった。そこで、本発明のミックスマー構造のオリゴヌクレオチドは、RNase H活性型ヌクレオチドが5個又は4個以下、例えば、5個、4個、3個又は2個しか連続しないことがある。「ミックスマーASO」又は「ミックスマーのASO」とは、ミックスマー構造を有するASOを指す。

[0054] 本発明において、ある特定のタイプのヌクレオチド類似体がRNase H活性型かRNase H非活性型かは、例えば以下の手順で決定することができる。当該特定のタイプのヌクレオチド類似体が10個連続するギャップ領域が、既知のRNase H活性型ヌクレオチド、例えば2'-OMe-ヌクレオチド類似体5個からなるウィング領域で挟まれるギャップマー構造のオリゴヌクレオチドを作成する。該ギャップマー構造のオリゴヌクレオ

チド300ピコモルと当該オリゴヌクレオチドと対合するRNA1500ピコモルとを対合させたヘテロ2本鎖複合体を調製する。該ヘテロ2本鎖複合体及び大腸菌RNase H3.0単位を、RNase H用の反応液、例えば、50mM Tris-HCl (pH8.0)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、及び10mM ジチオスレイトールからなる反応液に添加して全量を150μLとして、37℃、60分間反応させ、反応産物をアガロースゲル電気泳動法により分析する。

[0055] その他にも、当業者はある特定のタイプのヌクレオチド類似体がRNase H活性型かRNase H非活性型かを決定することができる。例えば、EP 1 222 309は、RNase Hをリクルートする能力を決定するために使用され得る、RNase H活性を決定するためのインビトロの方法を提供する。

[0056] 本発明の医薬組成物に含まれるオリゴヌクレオチドのヌクレオシドモノマーは、ヌクレオシド間連結基を介して、共に結合されている。適宜、各モノマーは、連結基を介して、3' 隣接モノマーに連結されている。オリゴヌクレオチドの末端の5' モノマーは、5' 末端基又はコンジュゲーションのための連結基を含んでいてもよいし、含んでいなくてもよいが、5' 連結基を含まない。

[0057] 「連結基」又は「ヌクレオチド間連結」という用語は、2個のヌクレオシドを共有結合で連結してジヌクレオチドを形成することができる基を意味する。天然のヌクレオチドはリン酸基を介するホスホジエステル結合で連結される。非天然型、すなわち、修飾ヌクレオチド結合には、ホスホロチオアート(phosphorothioate)基、ホスホロジチオアート(phosphorodithioate)基及びボラノホスフェート基が含まれるが、これらに限られない。ヌクレオシド間連結は、ヌクレオチド間連結と交換可能に使用され得る。一般に、修飾ヌクレオチド結合を含むオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル結合のみで連結されるオリゴヌクレオチドより膜透過性が高く、細胞内外のヌクレアーゼに対する耐性が高い。その一方

で修飾ヌクレオチド結合を含むオリゴヌクレオチドとRNAとが細胞内で雑種形成して形成されたヘテロ2本鎖核酸は、ホスホジエステル結合のみで連結されるオリゴヌクレオチドとRNAとが細胞内で雑種形成して形成されたヘテロ2本鎖核酸と同様にRNase Hによって分解される。なお、修飾ヌクレオチド結合は、例えば、ホスホロチオアート基のように、イオウ原子について立体異性体が存在する。本発明の医薬組成物に含まれるオリゴヌクレオチドは、特定の立体異性体の修飾ヌクレオチド結合がオリゴヌクレオチドの特定のヌクレオチド間連結に用いられるように合成されてもよく、一部又は全部のヌクレオチド間連結についてラセミ体となるように合成されてもよい。

- [0058] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記オリゴヌクレオチドは、
- (1) 配列番号1～9のいずれかの塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、
  - (2) 5'末端から3'末端に、アデニンーグアニンと、配列番号1～9のいずれかの塩基配列と、シトシンとからなる塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は、
  - (3) 5'末端から3'末端に、グアニンと、配列番号1～9のいずれかの塩基配列と、シトシンーアデニンとからなる塩基配列からなるオリゴヌクレオチド
- を含んでもかまわない。

- [0059] 本発明の医薬組成物の前記実施態様に係る第1のオリゴヌクレオチド、すなわち、「配列番号1～9のいずれかの塩基配列からなるオリゴヌクレオチド」は、5'末端から3'末端への順にシチジン、アデノシン及びグアノシンが連結したトリヌクレオチド反復回数が5～13回の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドである。

- [0060] 本発明の医薬組成物の前記実施態様に係る第2のオリゴヌクレオチド、すなわち、「5'末端から3'末端に、アデニンーグアニンと、配列番号1～9のいずれかの塩基配列と、シトシンとからなる塩基配列からなるオリゴヌクレオチド」は、5'末端から3'末端への順にアデノシン、グアノシン及

びシチジンが連結したトリヌクレオチド反復回数が6～14の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドである。

[0061] 本発明の医薬組成物の前記実施態様に係る第3のオリゴヌクレオチド、すなわち、「5'末端から3'末端に、グアニンと、配列番号1～9のいずれかの塩基配列と、シトシンーアデニンとからなる塩基配列からなるオリゴヌクレオチド」は、5'末端から3'末端への順にグアノシン、シチジン及びアデノシンが連結したトリヌクレオチド反復回数が6～14回の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドである。

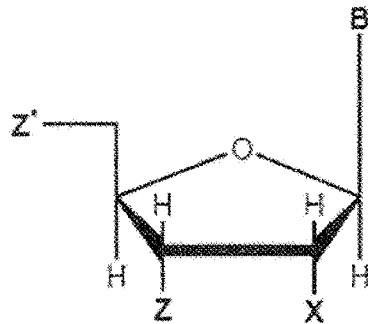
[0062] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記RNAse H非活性型ヌクレオチド類似体は、リボースの2'位が修飾されたヌクレオチド類似体、及び／又は、リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体を含んでもかまわない。

[0063] 前記実施態様のオリゴヌクレオチドに含まれるリボースの2'位が修飾されたヌクレオチド類似体は、2'-Fヌクレオチド類似体、2'-OMe-ヌクレオチド類似体、MOE-ヌクレオチド類似体、2'-(3-ヒドロキシ)プロピルヌクレオチド類似体及び2'-APヌクレオチド類似体を含むが、これらに限られない。

[0064] 前記リボースの2'位が修飾されたヌクレオチド類似体は、例えば、下記の化学式(1)〔式中、リボースの2'位に結合する置換基Xが、フルオロ基、メトキシ基、O-メトキシエチル基、2'-(3-ヒドロキシ)プロピル基及び2'-(3-アミノ)プロピル基から選択され、Z及びZ\*は、ヌクレオチド間連結、R、末端基又は保護基の中から独立に選択され、Bは、天然又は非天然のヌクレオチド塩基部分(核酸塩基)から選択され、Rは水素、水酸基、C<sub>1-4</sub>アルキル基及びC<sub>1-4</sub>アルコキシ基から選択される〕で表される。

[0065]

[化1]



化学式 (1)

[0066] 化学式 (1) において、リボースの 2' 位に結合する置換基 X がフルオロ基のヌクレオチド類似体は 2' - F ヌクレオチド類似体であり、リボースの 2' 位に結合する置換基 X がメトキシ基のヌクレオチド類似体は 2' - OMe ヌクレオチド類似体であり、リボースの 2' 位に結合する置換基 X が O-メトキシエチル基のヌクレオチド類似体は MOE ヌクレオチド類似体であり、リボースの 2' 位に結合する置換基 X が 2' - (3-ヒドロキシ) プロピル基のヌクレオチド類似体は 2' - (3-ヒドロキシ) プロピルヌクレオチド類似体であり、リボースの 2' 位に結合する置換基 X が 2' - (3-アミノ) プロピル基のヌクレオチド類似体は 2' - AP ヌクレオチド類似体である。

[0067] 前記実施態様のオリゴヌクレオチドに含まれるリボースの 2' 位と 4' 位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体は、オキシー LNA、チオール LNA、アミノ LNA、5' - メチル LNA、ENA、cEt 及び cMOE を含むが、これらに限られない。

[0068] 前記リボースの 2' 位と 4' 位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体は、2' 位と 4' 位との立体配座が固定される (locked) ことからロックド核酸又は LNA とよばれる。あるいは、架橋される (bridged) ことから BNA 又は二環式核酸ともよばれる。前記リボースの 2' 位と 4' 位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体には、オキシー LNA、チオール LNA、アミノ LNA、5' - メチル LNA、ENA、cEt 及び cMOE がある。これらのうち、オキシー LNA、チオール LNA、アミノ

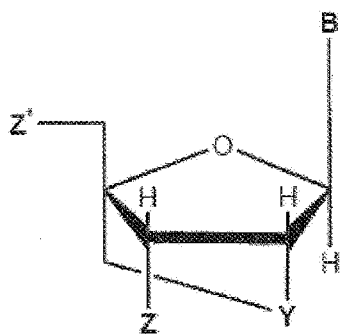
—LNA、5′—メチル—LNA及びENAには $\beta$ -D-配置及び $\alpha$ -L-配置の立体異性体があり、cEt及びcMOEには、前記リボースの2′位と4′位との間を架橋する炭素原子を不斉中心とするR型及びS型の立体異性体がある。

[0069] 前記リボースの2′位と4′位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体は、例えば、下記の化学式(2)及び(3)において、リボースの2′位に結合する2価の原子団「—Y—」が、「—O—」、「—S—」、「—CH<sub>2</sub>—S—」、「—N(H)—」、「—N(R<sup>a</sup>)—」、「—CH<sub>2</sub>—N(H)—」及び「—CH<sub>2</sub>—N(R<sup>a</sup>)—」から選択され、Z及びZ\*は、ヌクレオチド間連結、R<sup>b</sup>、末端基、又は保護基の中から独立に選択され、Bは、天然又は非天然のヌクレオチド塩基部分(核酸塩基)から選択され、R<sup>a</sup>は水素及びC<sub>1-4</sub>アルキルから独立に選択され、R<sup>b</sup>は、水素、水酸基、C<sub>1-4</sub>アルキル基及びC<sub>1-4</sub>アルコキシ基から選択される構造を有する。

[0070]  $\beta$ -D-配置のオキシ—LNA、チオ—LNA及びアミノ—LNAは一般式(2)で表され、 $\alpha$ -L-配置のオキシ—LNA、チオ—LNA及びアミノ—LNAは一般式(3)で表される。化学式(2)及び(3)において、リボースの2′位に結合する2価の原子団「—Y—」が「—O—」のヌクレオチド類似体はオキシ—LNAであり、リボースの2′位に結合する2価の原子団「—Y—」が、「—S—」又は「—CH<sub>2</sub>—S—」のヌクレオチド類似体はチオ—LNAであり、リボースの2′位に結合する2価の原子団「—Y—」が、「—N(H)—」、「—N(R<sup>a</sup>)—」、「—CH<sub>2</sub>—N(H)—」及び「—CH<sub>2</sub>—N(R<sup>a</sup>)—」(ここでR<sup>a</sup>はC<sub>1-4</sub>アルキルから選択される)から選択されるヌクレオチド類似体はアミノ—LNAである。

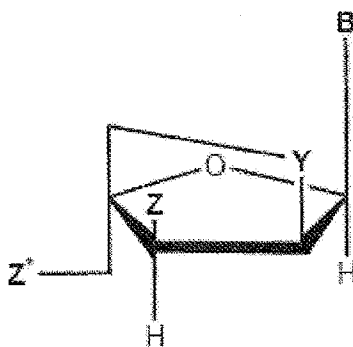
[0071]

[化2]



化学式 (2)

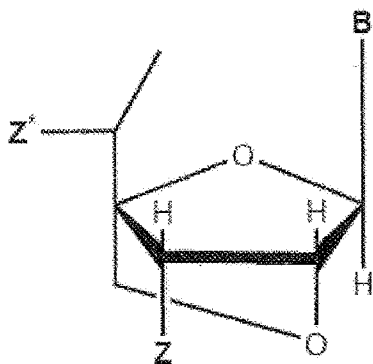
[0072] [化3]



化学式 (3)

[0073]  $\beta$ -D-配置の5'-メチル-LNAは以下の化学式(4)で表され、 $\alpha$ -L-配置の5'-メチル-LNAは以下の化学式(5)で表される。

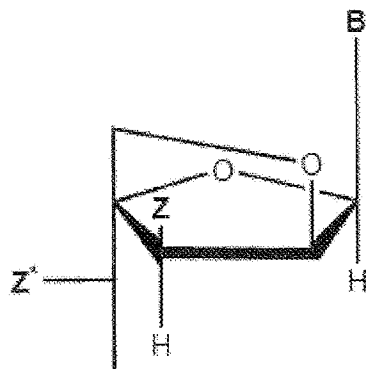
[0074] [化4]



化学式 (4)

[0075]

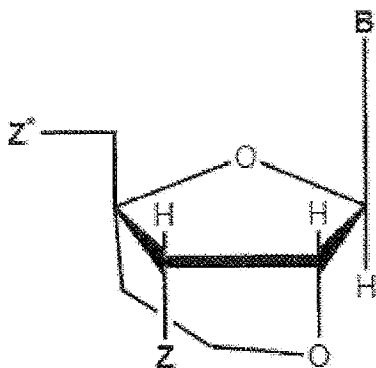
[化5]



化学式 (5)

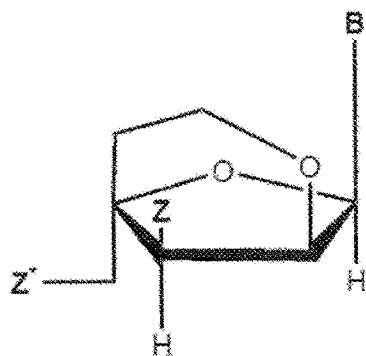
[0076]  $\beta$ -D-配置のENAは以下の化学式(6)で表され、 $\alpha$ -L-配置のENAは以下の化学式(7)で表される。

[0077] [化6]



化学式 (6)

[0078] [化7]

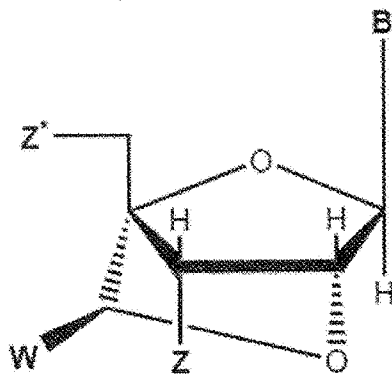


化学式 (7)

[0079] R型のcEt及びcMOEは以下の一般式(8)で表され、S型のcEt及びcMOEは以下の一般式(9)で表される。化学式(8)及び(9)に

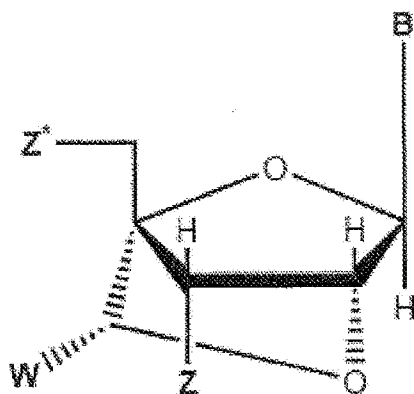
において、Wはメチル基及びメトキシメチル基から選択され、Z及びZ\*は、ヌクレオチド間連結、R（Rは、水素、水酸基、C<sub>1-4</sub>アルキル基及びC<sub>1-4</sub>アルコキシ基から選択される）、末端基又は保護基の中から独立に選択され、Bは、天然又は非天然のヌクレオチド塩基部分（核酸塩基）から選択される構造を有する。

[0080] [化8]



化学式（8）

[0081] [化9]



化学式（9）

[0082] 化学式（8）及び（9）において、Wがメチル基のヌクレオチド類似体はcEtであり、Wがメトキシメチル基のヌクレオチド類似体はcMOEである。

[0083] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記リボースの2'位の酸素原子が修飾されたヌクレオチド類似体は、2'-OMe-ヌクレオチド類似体、及び／又は、MOE-ヌクレオチド類似体を含んでもかまわない。

- [0084] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体は、 $\beta$ -D-オキシ-L-LNA、 $\beta$ -D-ENA及び／又はR型のcEtを含んでもかまわない。
- [0085] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記リボースの2'位が修飾されたヌクレオチド類似体はすべて同じ修飾糖を有することができる。
- [0086] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記リボースの2'位が修飾されたヌクレオチド類似体は少なくとも2個の異なる修飾糖を有することができる。
- [0087] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体はすべて同じ修飾糖を有することができる。
- [0088] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体は少なくとも2個の異なる修飾糖を有することができる。
- [0089] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記オリゴヌクレオチドに含まれる前記リボースの2'位の酸素原子が修飾されたヌクレオチド類似体は、2'-OMe-ヌクレオチド類似体、及び／又は、MOE-ヌクレオチド類似体とすることができる。
- [0090] 前記2'-OMe-ヌクレオチド類似体は、前記化学式(1)において、リボースの2'位に結合する置換基Xがメトキシ基で、塩基Bが、アデニン、グアニン、チミン又はシトシンのヌクレオチド類似体をいう。前記MOE-ヌクレオチド類似体は、前記化学式(1)において、リボースの2'位に結合する置換基XがO-メトキシエチル基で、塩基Bが、アデニン、グアニン、チミン又はシトシンのヌクレオチド類似体をいう。
- [0091] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記オリゴヌクレオチドに含まれる前記リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体は、LNA、ENA及び／又はcEtとすることができる。
- [0092] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記リボースの2'位が修飾

されたヌクレオチド類似体はすべて同じ修飾糖を有することができる。すなわち、前記オリゴヌクレオチドに含まれる前記リボースの2'位が修飾されたヌクレオチド類似体は、リボースの2'位に結合する置換基が、フルオロ基、メトキシ基又はO-メトキシエチル基のいずれか1種類とすることができる。

[0093] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記リボースの2'位が修飾されたヌクレオチド類似体は少なくとも2個の異なる修飾糖を有することができる。すなわち、前記オリゴヌクレオチドに含まれる前記リボースの2'位が修飾されたヌクレオチド類似体は、リボースの2'位に結合する置換基が、フルオロ基、メトキシ基及びO-メトキシエチル基からなる群より選択される2種類又は3種類とすることができる。

[0094] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体はすべて同じ修飾糖を有することができる。すなわち、前記オリゴヌクレオチドに含まれる前記リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体は、LNA、ENA又はcEtのいずれか1種類とすることができる。

[0095] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体は少なくとも2個の異なる修飾糖を有することができる。すなわち、前記オリゴヌクレオチドに含まれる前記リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体は、LNA、ENA及びcEtからなる群より選択される2種類又は3種類とすることができる。

[0096] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記オリゴヌクレオチドは、 $\beta$ -D-ENA-シチジン、2'-OMe-アデノシン及び2'-OMe-グアノシンを含むことができる。

[0097] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、前記オリゴヌクレオチドの全てのシチジンは $\beta$ -D-ENA-シチジンであり、全てのアデノシンは2'-OMe-アデノシンであり、全てのグアノシンは2'-OMe-グアノシン

ンとすることができる。

[0098] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、本発明の医薬組成物に含まれるオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート及びボラノホスフェートからなる群より選択される少なくとも1種類のヌクレオチド連結を含んでもよい。

[0099] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、本発明の医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体又は希釈剤を含むことができる。本発明の医薬組成物に含むことができる担体として、当業者であればかかる状況に適切な担体を適宜選択することができる。選択可能な担体は、例えば、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤と、リン酸二水素ナトリウム、無水リン酸一水素ナトリウム、クエン酸、クエン酸ナトリウム等のpH調節剤と、グルコース、塩化ナトリウム、塩化カリウム等の等張化剤と、塩化カルシウム、塩化マグネシウム等の2価イオン調節剤とを含むが、これらに限られない。また、これらの担体は単一の作用を発揮する目的で使用することに限定されず、複数の作用を発揮する目的で使用するすることができる。本発明の医薬組成物に含むことができる希釈剤は、液体、例えばリン酸緩衝生理食塩水を含むが、これらに限られない。

[0100] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、本発明の医薬組成物は、細胞膜透過及び／又は核内送達用担体を含むことができ、該細胞膜透過及び／又は核内送達用担体は本発明の医薬組成物に係るオリゴヌクレオチドと結合又は会合することができる。

[0101] 前記細胞膜透過及び／又は核内送達用担体は、ペプチドを含んでもよい。細胞膜透過用担体としてのペプチドは、例えば、オクタアルギニンなどのオリゴアルギニン、HIV-1のTatタンパク質由来の塩基性ペプチド、及び、ショウジョウバエのアンテナペディアホメオドメインタンパク質由来の塩基性ヘリックスペプチドなどの細胞膜透過性ペプチドを含むが、これらに限られない。前記核内送達用担体としてのペプチドは、例えば、SV40ウイルスのラージT抗原、c-myc、ヌクレオプラズミン等に由来する、イ

ンポーチンと特異的に結合する核局在化シグナルであるペプチドを含むが、これらに限られない。

[0102] 前記細胞膜透過及び／又は核内送達用担体は、ペプチドミメティックスを含んでもよい。細胞膜透過及び／又は核内送達用担体としてのペプチドミメティックスは、前記細胞膜透過及び／又は核内送達用担体としてのペプチドの構造を模倣した合成化合物であって、本発明の医薬組成物に係るオリゴヌクレオチドと結合又は会合して、細胞膜透過及び／又は核内送達を促進するものを指す。細胞膜透過及び／又は核内送達用担体としてのペプチドミメティックスは、前記細胞膜透過及び／又は核内送達用担体としてのペプチドの全部又は一部を、複素環や環状化合物と、非天然アミノ酸と、D-アミノ酸と、各種官能基の等価体とのような天然ペプチド以外の化合物で置換した化合物である。

[0103] 細胞膜透過及び／又は核内送達用担体は、DEAEデキストラン、ポリエレンイミン（PEI）及びポリプロピレンイミン（PPI）のカチオン性ポリマーを含んでもよい。

[0104] 細胞膜透過及び／又は核内送達用担体は、脂質を含んでもよい。細胞膜透過及び／又は核内送達用担体としての脂質は、前記細胞膜透過及び／又は核内送達用担体としての脂質は、1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリン（DMPC）、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリン（DPPC）、1, 2-ジステアロイル-SN-グリセロール-3-ホスファチジルコリン（DSPC）、1-パルミトイル-2-ミリスチル-SN-グリセロール-3-ホスファチジルコリン（PMPC）、1-ステアロイル-2-ミリスチル-SN-グリセロール-3-ホスファチジルコリン（SMPC）、大豆由来の水素添加レシチン（HSPC）、1-ステアロイル-2-オレイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリン（SOPC）、1-パルミトイル-2-オレイル-sn-グリセロール-3-ホスファチジルコリン（POPC）、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン（DOPC）、1, 2-ジオレオイル-SN

ーグリセロー3-ホスホグリセロール (DOPG)、1,2-ジオレオイル-SN-グリセロー3-ホスホ-L-セリン (DOPS)、1,2-ジオロイロイル-SN-グリセロー3-リン酸 (DOPA)、1,2-ジパルミトイル-SN-グリセロー3-ホスホコリン (DPPC)、1,2-ジミリストイル-SN-グリセロー3-ホスホ-rac-(1-グリセロール) (DMPG)、1,2-ジオレイル-SN-グリセロー3-ホスホエタノールアミン (DOPE) などのリン脂質と、1,5-〇-ジヘキサデシル-N-スクシニル-L-グルタミン酸などのアニオン性脂質と、コレステロールと、N-(カルボニルメトキシポリエチレングリコール2000)-1,2-ジステアロイル-SN-グリセロー3-ホスホエタノールアミンなどのようなPEG-結合脂質と、1,2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン (DODAP) のようなpH感受性脂質とを含むことがあるが、これらに限られない。

[0105] 細胞膜透過及び／又は核内送達用担体は、リピトイドを含んでもよい。前記細胞膜透過及び／又は核内送達用担体としてのリピトイドは、前記細胞膜透過及び／若しくは核内送達用担体としてのペプチド及び／若しくはペプチドミメティックスと、前記細胞膜透過及び／若しくは核内送達用担体としての脂質とが共有結合で連結された合成化合物を指す。

[0106] 細胞膜透過及び／又は核内送達用担体は、リポソームを含んでもよい。前記細胞膜透過及び／又は核内送達用担体としてのリポソームは、水系溶媒に分散された脂質膜構造体であって、内部に水系溶媒を封入した脂質膜構造体を指す。リポソームの脂質膜は、1層又は複数の層の脂質二重膜又は脂質多重膜であってもよい。リポソームは、粒子状であっても、網状であってもかまわない。リポソームの脂質成分は、前記細胞膜透過及び／又は核内送達用担体としての脂質を含むことがあるが、これらに限られない。リポソームの脂質成分は、前記細胞膜透過及び／又は核内送達用担体としてのリピトイドを含むことがある。前記細胞膜透過及び／又は核内送達用担体としてのリポソームは、その内部に本発明の医薬組成物に係るオリゴヌクレオチドを封入

することができる。

[0107] 細胞膜透過及び／又は核内送達用担体は、脂質ナノ粒子（LNP）を含んでもよい。前記細胞膜透過及び／又は核内送達用担体としての脂質ナノ粒子は、前記リポソームの脂質成分と同じ脂質と、本発明の医薬組成物に係るオリゴヌクレオチドとから構成される。脂質ナノ粒子には、1，2-ジオレイル-3-ジメチルアンモニウムプロパン（DODAP）のような低pH環境において正電荷を帯びるpH感受性脂質を用いることがある。脂質ナノ粒子は、リポソームとは異なり脂質膜は一重であり、内部に水系溶媒を封入するのではなく脂質で充填されたコア構造を有する。前記細胞膜透過及び／又は核内送達用担体としての脂質ナノ粒子は、前記コア構造に本発明の医薬組成物に係るオリゴヌクレオチドを含むことができる。

[0108] 本発明の医薬組成物の1つの実施態様では、本発明の医薬組成物は、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、頭蓋内投与及び髄腔内投与からなる群より選択される少なくとも1つの非経口的投与によって送達されることができる。前記投与は、持続的又は長期的であってもよく、短期的又は断続的であってもよい。本発明の医薬組成物は、投与後、少なくとも30日、少なくとも35日、少なくとも40日、少なくとも45日、少なくとも50日、少なくとも55日、少なくとも60日、少なくとも65日、少なくとも70日、少なくとも75日、少なくとも80日、少なくとも85日、少なくとも90日、少なくとも95日、少なくとも100日、少なくとも105日、少なくとも110日、少なくとも115日、少なくとも120日、若しくは、少なくとも1年にわたって、CUG-RNA凝集体形成のダウンレギュレーション、及び／又は、CUG-RNA又はDMPKタンパク質の細胞内レベルの50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは100%の低減をもたらす。

[0109] 本発明の医薬組成物の投与形態としては、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤若しくはシロップ剤等による経口投与であってもよい。これらの製剤は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトール

ルのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、 $\alpha$ 澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルランのような有機系賦形剤；及び、軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；燐酸水素カルシウムのような燐酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系賦形剤を挙げることができる。）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーガム、ゲイ蠟のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；DLロイシン；脂肪酸ナトリウム塩；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；及び、上記澱粉誘導体を挙げることができる。）、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、及び、前記賦形剤と同様の化合物を挙げることができる。）、崩壊剤（例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシ基メチルセルロース、カルボキシ基メチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシ基メチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシ基メチルスターチ、カルボキシ基メチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類を挙げることができる。）、安定剤（メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェノール類；チメロサール；デヒドロ酢酸；及び、ソルビン酸を挙げることができる。）、矯味矯臭剤（例えば、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等を挙げることができる。）等の添加剤を用いて周知の方法で製造される。

[0110] 本発明の医薬組成物に含まれる有効成分は、前記オリゴヌクレオチド（該オリゴヌクレオチドに細胞膜透過及び／又は核内送達用担体が結合又は会合する場合には、前記細胞膜透過及び／又は核内送達用担体が結合又は会合した前記オリゴヌクレオチド）である。本発明の医薬組成物に含まれる有効成分の割合は、所望の効果を奏することができる範囲で適宜設定することができるが、通常、0.01～100重量%であり、好ましくは0.1～99.9重量%、より好ましくは0.5～99.5重量%である。

[0111] 本発明の医薬組成物を投与する用量は、治療される個人の年齢、体重及び状態と、投与経路、投与形態及び投与方法とを考慮して注意深く調整されなければならない。実際の投与量は医師の裁量の範囲内であり、望ましい治療効果を得るために本発明の特別な状況に対して用量を設定することにより変動することがある。しかし本発明の医薬組成物の投与量としては、前記有効成分の種類、投与対象の体重や年齢、症状などにより一概に規定されるものではないが、例えば、非経口的投与の場合には、1回当たり、下限として、0.001mg/kg 体重（好ましくは、0.01mg/kg 体重）、上限として、100mg/kg 体重（好ましくは、10mg/kg 体重）を1経口投与の場合には、1回当たり、下限として、0.01mg/kg 体重（好ましくは、0.1mg/kg 体重）、上限として、1000mg/kg 体重（好ましくは、100mg/kg 体重）を、1日当たり1乃至数回症状に応じて投与することが望ましい。

[0112] 本発明の医薬組成物の投与対象は、筋強直性ジストロフィー1型疾患の患者である。本発明の実施例でDM-1及び3細胞のほうがDM-2細胞よりRNA凝集体の消失効果が顕著であったことから、DMPK遺伝子のCTG配列の反復回数が多い患者が本発明の医薬組成物の投与対象として好ましい。

[0113] 本発明の医薬組成物の有効成分、担体、投与する用量及び用法の選択の判断に用いる望ましい治療効果としては、筋強直性ジストロフィー1型疾患の

臨床症状（筋強直現象（筋収縮状態の遷延）、筋力低下・萎縮、白内障、網膜変性症、心伝導障害、心筋障害、平滑筋障害に伴う嚥下、便秘、下痢等の消化管の症状、高次脳機能障害、耐糖能障害、高インスリン血症、糖尿病、精巣萎縮、成長ホルモン分泌異常等の内分泌障害、高脂血症、毛母腫、上皮腫等の皮膚の症状）の進行の抑制及び／又は軽減が最も重要である。しかし臨床症状に先立つサロゲート・エンドポイントとして、薬力学的バイオマーカー（DMPKのRNA凝集体の形成、及び／又は、CUG-BP1及びMBNL1を含むRNA結合分子の脱調節の軽減及び／又は消失）も本発明の医薬組成物の有効成分、担体、投与する用量及び用法の選択の判断に用いることができる。

[0114] 本発明の医薬組成物は、経皮投与、眼球内投与、水晶体内投与、消化管粘膜内投与、消化管粘膜下投与、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、頭蓋内投与及び髄腔内投与からなる群より選択されるいずれか1つ又は2つ以上の非経口的投与によって送達することができる。また本発明の医薬組成物は、患者の臨床症状に応じて、骨格筋、心筋、平滑筋、サテライト細胞、水晶体、網膜等を含む眼組織、食道から結腸までの消化管、中枢神経系及び抹消神経系の神経、膵臓、副腎、脳下垂体及びこれらの制御に関与する内分泌系組織、皮膚組織等を含むが、これらに限定されない組織を標的として投与することができる。

[0115] 本発明の医薬組成物のアッセイ系の1つの実施態様では、本発明のアッセイ系は、筋強直性ジストロフィー1型疾患を罹患するヒトから樹立されたiPS細胞の未分化細胞と、評価対象の化合物とを含む。評価対象の化合物は筋強直性ジストロフィー1型疾患の筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼのRNAを標的とするオリゴヌクレオチドを含む。

[0116] 本明細書において数値について修飾する連体詞「約」は、当該数値の90%以上、かつ、110%以内の数値範囲であることを意味する。例えば、「約40塩基」とは、36塩基以上44塩基以内の数値範囲の塩基を指す。

[0117] 本明細書において言及される全ての文献はその全体が引用により本明細書

に取り込まれる。

[0118] 以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。本発明の趣旨を逸脱しないことを条件として、本発明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除及び置換を行うことができる。

## 実施例

[0119] 実施例 1 筋強直性ジストロフィー患者由来の i P S 細胞の樹立

### (1. 1) 材料及び方法

実験群の筋強直性ジストロフィー 1 型患者 3 名、及び、対照群の健常者 2 名から採取した末梢血単核細胞 (P B M C) 細胞、並びに、対照群の健常者 1 名から採取した皮膚線維芽細胞を出発細胞として、S O X 2、K L F 4、O C T 4、L - M Y C、L I N 2 8、p 5 3 カルボキシル末端ドミナントネガティブ断片及び E B N A 1 をコードするエピソームベクター (O k i t a, K. ら、S t e m C e l l s, 3 1 : 4 5 8 - 4 6 6 (2013)) でリプログラミングすることによって i P S 細胞を作出した。細胞株の認証は、P o w e r P l e x (登録商標) 1 6 システム (プロメガ、米国ウィスコンシン州、マジソン) を用いる S T R 解析で確認した。核型及びサザンブロット解析は株式会社 L S I メディエンス (東京) が実施した。i P S 細胞は、i M a t r i x - 5 1 1 (892012、株式会社ニッピ、東京) でコーティングされた培養容器上、N a k a g a w a, M. ら (S c i R e p, 4 : 3 5 9 4 (2014)) によって説明された S t e m F i t (登録商標) 培地 (A K O 2 N、味の素株式会社、東京) で培養及び維持した。

[0120] 本明細書の実施例における T P - P C R による解析を以下のとおり実行した。P u r e L i n k (商標) ゲノム DNA ミニキット (インビトロジェン、サーモフィッシャーサイエンティフィック、米国マサチューセッツ州、ウォルサム) を用いて i P S 細胞のゲノム DNA を抽出して、S i n g h,

S. ら (Front Genet, 5: 94 (2014)) 及び非特許文献1 (Chakraborty, S. ら、Current Protocols in Human Genetics, 91: 9.29.1-9.29.19. (2016)) に説明されたTP-PCR解析に供した。TP-PCR解析に用いたプライマーの塩基配列を上記表4に示す。

[0121] 本明細書の実施例における免疫細胞化学的解析を以下のとおり実行した。細胞を4%のパラホルムアルデヒド（ナカライテスク株式会社、京都）を含むPBS中で室温20分間固定し、ブロッキングバッファー（5% Blocking One（ナカライテスク株式会社）及び0.2%トリトン-X100（ナカライテスク株式会社）を含むPBS）でインキュベーションした。本明細書の実施例で用いた1次抗体及び2次抗体の出所及び希釈倍率のリストを以下の表5に示す。1次抗体は前記ブロッキングバッファー中で4℃、16時間前記細胞と反応させ、2次抗体は室温で1時間反応させた。核はDAPIで染色した。Opera Phenix（商標）ハイコンテンツスクリーニングシステム（パーキンエルマー、マサチューセッツ州、ウォルサム）又はBZ-X710顕微鏡（キーエンス、大阪、日本）を用いて画像を取得した。

[0122]

[表5]

| 抗体名                            | 希釈倍数    | 入手先・カタログ番号                                             |
|--------------------------------|---------|--------------------------------------------------------|
| ウサギ抗NANOG                      | 1:500   | コスモバイオ,<br>Cat# RCAB0003P, RRID: AB_1962353            |
| マウス抗OCT4                       | 1:1,000 | サンタクルーズバイオテクノロジー,<br>Cat# sc-5279, RRID: AB_628061     |
| マウス抗SSEA4<br>(発生段階特異的胚抗原-4)    | 1:1,000 | ミリポア, Cat# MAB4304, RRID: AB_177629                    |
| マウス抗 TRA-1-60                  | 1:1,000 | セルシグナリングテクノロジー,<br>Cat# 4746, RRID: AB_2119059         |
| マウス抗テューブリンβⅢ<br>(TUJ1)         | 1:2,000 | ミリポア, Cat# MAB1637, RRID: AB_2210624                   |
| マウス抗テューブリンβⅢ<br>(TUJ1)         | 1:2,000 | セルシグナリングテクノロジー,<br>Cat# 5568, RRID: AB_10694505        |
| ヤギ抗SOX17                       | 1:1,000 | R&Dシステムズ,<br>Cat# AF1924, RRID: AB_355060              |
| マウス抗αSMA<br>(平滑筋アクチン)          | 1:500   | DAKO, Cat# M0851, RRID: AB_2223500                     |
| マウス抗MHC(ミオシン重鎖)                | 1:1,000 | R&Dシステムズ,<br>Cat# MAB4470, RRID: AB_1293549            |
| マウス抗TITIN                      | 1:1,000 | DSHB, Cat# 9 D10, RRID: AB_528491                      |
| ウサギ抗デスミン                       | 1:1,000 | Abcam, Cat# ab15200, RRID: AB_301744                   |
| マウス抗PAK7                       | 1:1,000 | DSHB, Cat# pax7, RRID: AB_528428                       |
| ウサギ抗MYOD                       | 1:1,000 | プロテインテック,<br>Cat# 18943-1-AP, RRID: AB_10603467        |
| ウサギ抗KIF7                       | 1:1,000 | Abcam, Cat# ab15580, RRID: AB_443209                   |
| マウス抗α-アクチニン                    | 1:1,000 | シグマアルドリッチ,<br>Cat# A7811, RRID: AB_476766              |
| マウス抗ミオジェニン                     | 1:1,000 | サンタクルーズバイオテクノロジー,<br>Cat# sc-12732, RRID: AB_627980    |
| マウス抗α-クリスタリン                   | 1:1,000 | サンタクルーズバイオテクノロジー,<br>Cat# sc-28306, RRID: AB_627304    |
| マウス抗MAP2                       | 1:1,000 | ミリポア, Cat# MAB3418, RRID: AB_94856                     |
| ウサギ抗TBR1                       | 1:1,000 | Abcam, Cat# ab31940, RRID: AB_2200219                  |
| ヤギ抗ウサギIgG<br>Alexa Fluor 488   | 1:1,000 | サーモフィッシュヤーサイエンティフィック<br>Cat# A-11034, RRID: AB_2576217 |
| ヤギ抗マウスIgG<br>Alexa Fluor 546   | 1:1,000 | サーモフィッシュヤーサイエンティフィック<br>Cat# A-11030, RRID: AB_2534089 |
| ヤギ抗マウスIgM<br>Alexa Fluor 546   |         | サーモフィッシュヤーサイエンティフィック<br>Cat# A-21045, RRID: AB_2535714 |
| ヤギ抗マウスIgM<br>Alexa Fluor 488   | 1:1,000 | サーモフィッシュヤーサイエンティフィック<br>Cat# A32723, RRID: AB_2633275  |
| ロバ抗ヤギIgG<br>Alexa Fluor 488    | 1:1,000 | サーモフィッシュヤーサイエンティフィック<br>Cat# A-11055, RRID: AB_2534102 |
| ヤギ抗マウスIgM<br>Alexa Fluor 488   | 1:1,000 | Molecular Probes,<br>Cat# A-21042, RRID: AB_141357     |
| ニワトリ抗マウスIgG<br>Alexa Fluor 547 | 1:1,000 | サーモフィッシュヤーサイエンティフィック<br>Cat# A-21463, RRID: AB_2535869 |
| ニワトリ抗マウスIgG<br>Alexa Fluor 594 | 1:1,000 | Molecular Probes,<br>Cat# A-21201, RRID: AB_141630     |
| ニワトリ抗ウサギIgG<br>Alexa Fluor 594 | 1:1,000 | Molecular Probes,<br>Cat# A-21442, RRID: AB_141840     |

[0123] iPS細胞を3つの胚葉に分化させるために胚様体形成アッセイを行った (Suga, M. ら、Stem Cell Res. 36: 101406 (2019))。胚様体は、低接着性表面V字底96穴プレートを用

いて、 $0.5 \times \text{TrypLE Select}$  で解離された iPS 細胞（胚様体 1 個あたり 9000 個）を、20% KSR、2 mM  $\text{L-グルタミン}$ 、0.1 mM NEAA、0.1 mM 2-メルカプトエタノール（全て Gibco（サーモフィッシャーサイエンティフィック））及び  $10 \mu\text{M}$  Y-27632（ナカライテスク）を添加した DMEM/F12 培地中で 11 日間培養して形成した。その後マトリゲル（BD バイオサイエンス）でコーティングした組織培養プレート上で、10% FBS（Gibco（サーモフィッシャーサイエンティフィック））を添加した DMEM 中で 7 日間培養した。中胚葉への分化能は、平滑筋アクチンを発現する平滑筋細胞が分化するかどうかで検定した。内胚葉への分化能は、SOX17 を発現する胚体内胚葉細胞が分化するかどうかで検定した。外胚葉への分化能は、 $\beta$ -III-チューブリンを発現する運動ニューロンが分化するかどうかで検定した。

[0124] ASO 処理による核内 RNA 凝集体形成への影響を調べるために用いた iPS 細胞由来の分化細胞の細胞タイプと、分化細胞の培養方法、iPS 細胞から分化細胞の誘導方法、及び、ASO 処理方法の概要は以下の表 6 に示す。個々の詳細はそれぞれの分化細胞を用いる実施例に示す。

[0125] [表6]

| 評価した細胞    | 培養方法 | 誘導方法   | 誘導方法に関する主な参考文献                                                  | ASO 処理方法                |
|-----------|------|--------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 骨格筋細胞     | 2D   | 直接分化転換 | Kokubu et al., 2019<br>DOI: 10.1038/sctm.18-0280                | リボフェクション 10nM           |
| 骨格筋オルガノイド | 3D   | オルガノイド | Faustino Martins et al. 2020<br>DOI: 10.1016/j.stem.2019.12.007 | 500 nM ASO 含有培地で 7 日間培養 |
| 神経細胞      | 2D   | 直接分化転換 | Imamura et al., 2019<br>DOI: 10.1038/srep34904                  | リボフェクション 10nM           |
| 水晶体上皮細胞   | 2D   | 分化誘導   | Fu et al., 2017<br>DOI: 10.1167/jovs.16-2030                    | リボフェクション 10nM           |
| 皮膚オルガノイド  | 3D   | オルガノイド | Lee et al. 2020<br>DOI: 10.1038/s41586-020-2352-3               | 500 nM ASO 含有培地で 7 日間培養 |

[0126] 表 6 に掲げた参考文献の書誌事項は以下のとおりである。

Kokubu, Y. et al. (2019) Stem Cells Transl Med, DOI: 10.1002/sctm.18-0280

Faustino Martins, J. M. et al. (202

O) Cell Stem Cell, 26: 172–186 e176.

Imamura, K. et al. (2016) Sci Rep, 6: 34904.

Fu, Q. et al. (2017) Invest Ophthalmol Vis Sci. 58: 517–527.

Lee, J. et al. (2020) Nature, 582: 399–404.

[0127] 核内RNA凝集体を検出するために、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CADNA/LNAプローブを用いた蛍光in situハイブリダイゼーション(以下、「FISH」という。)を行った。細胞は底が透明なマイクロプレート(CellCarrier-96 Ultra、パーキンエルマー)上で培養し、4%パラホルムアルデヒドで室温30分間固定し、-30℃の70%エタノールで少なくとも2時間膜透過処理し、二炭酸ジエチル(DEPC)水で調製した1×SSC液で再水和し、ハイブリダイゼーション前処理バッファー[DEPC水で調製した2×SSC及び50%ホルムアミド]中で55℃、2時間インキュベーションを行った。その後細胞をハイブリダイゼーションバッファー[2×SSC、50%ホルムアミド、10%硫酸デキストリン及び0.1 ng/μLのCy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CADNA/LNAプローブ(株式会社ジーンデザイン、大阪)]で終夜55℃でインキュベーションした(de Mezer, M. ら、Nucleic Acids Res、39: 3852 (2011))。細胞を前記ハイブリダイゼーション前処理バッファーで55℃20分間2回洗浄し、DEPC水で調製した1×SSC液で室温5分間2回洗浄した。さらに細胞をDEPC水中で調製した1×SSCで37℃60分間インキュベーションして、DEPC水で調製した1×SSCで2回洗浄した。細胞をPBS中1 μg/mLの4', 6-ジアミジノー-2-フェニルインドール(DAPI、インビトロジェン、サーモフィッシャーサイエンティフィック)で室温10分間染色し、

PBSで洗浄した。撮像は40倍水浸体物レンズを用いてOpera Phenix（商標）ハイコンテンツスクリーニングシステム（パーキンエルマー）で解析した。

[0128] (1. 2) 結果

実験群のDM1患者3名、及び、対照群の健常者3名に由来するiPS細胞を、それぞれ、DM-1～3及びHC-1～3と命名した。細胞培養においてマイコプラズマ汚染は検出されなかった。表7は、DM-1～3及びHC-1～3の出発細胞、提供者の性別、年齢、サザンブロット法により解析されたCTG配列の反復回数配列の反復回数及び多能性幹細胞の誘導ベクターを示す。表7の出発細胞のうち、PBMCは末梢血単核細胞を意味する。

[0129] [表7]

|        | 対照群の健常者由来iPS細胞 |         |         | DM1患者由来iPS細胞  |         |               |
|--------|----------------|---------|---------|---------------|---------|---------------|
|        | HC-1           | HC-2    | HC-3    | DM-1          | DM-2    | DM-3          |
| クローンID | HPS0076        | HPS3835 | HPS3838 | HPS1033       | HPS1051 | HPS1052       |
| 出発細胞   | 皮膚<br>線維芽細胞    | PBMC    | PBMC    | PBMC          | PBMC    | PBMC          |
| 性別     | 女性             | 男性      | 女性      | 男性            | 女性      | 男性            |
| 年齢     | 36             | 47      | 46      | 38            | 33      | 38            |
| 反復回数   | N/A            | N/A     | N/A     | 1000<br>~1150 | 150     | 2300<br>~2850 |
| 誘導ベクター | エピソーム型         | エピソーム型  | エピソーム型  | エピソーム型        | エピソーム型  | エピソーム型        |

[0130] 図1Aは、DM-1～3及びHC-1～3の未分化多能性幹細胞マーカーの発現を示す顕微鏡写真のパネルである。最上段は各iPS細胞の未分化細胞の単層培養の位相差顕微鏡写真、第2段は各iPS細胞の未分化細胞の単層培養をNANOGに対する抗体で染色し、さらにDAPIで細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。第3段は各iPS細胞の未分化細胞の単層培養をOCT4に対する抗体で染色し、さらにDAPIで細胞核を対比染色

した蛍光顕微鏡写真である。第4段は各 i P S 細胞の未分化細胞の単層培養を S S E A 4 に対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。第5段は各 i P S 細胞の未分化細胞の単層培養を T R A - 1 - 6 0 に対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。各顕微鏡写真の右下のスケールバーは 2 0 0  $\mu$  m を表す。

[0131] 図 1 A に示すとおり、DM-1~3 及び HC-1~3 は、いずれも、細胞どうしが密に接着して個々の細胞の境界が位相差顕微鏡で識別できない、ヒト未分化胚性幹細胞様の形態を示した。また DM-1~3 及び HC-1~3 は、いずれも、ヒト i P S 未分化細胞のマーカーである、N A N O G、O C T 4、S S E A 4 及び T R A - 1 - 6 0 を発現し、ヒト i P S 未分化細胞の特徴を備えていた。

[0132] 図 1 B は、DM-1~3 及び HC-1~3 から分化させた細胞の三胚葉分化マーカーの発現を示す顕微鏡写真のパネルである。第1段は、各 i P S 細胞から中胚葉に分化させた細胞を  $\alpha$ -平滑筋アクチン (S M A) に対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。第2段は、各 i P S 細胞から内胚葉に分化させた細胞を S O X 1 7 に対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。第3段は、各 i P S 細胞から外胚葉に分化させた細胞を  $\beta$  I I I - チューブリンに対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。各蛍光顕微鏡写真の右下のスケールバーは 5 0  $\mu$  m を表す。

[0133] 図 1 B に示すとおり、DM-1~3 及び HC-1~3 は、いずれも、中胚葉系細胞 ( $\alpha$ -平滑筋アクチン)、内胚葉系細胞 (S O X 1 7) 及び外胚葉系細胞 ( $\beta$  I I I - チューブリン) 全てへの分化能を示した。そこで、i P S 1~3 及び HC-1~3 はいずれも多能性を有するヒト i P S 未分化細胞であることが証明された。

[0134] 図 1 C は、DM-1~3 及び HC-1~3 の T P P C R の反応産物のキャ

ピラリー電気泳動図である。図1Cに示すとおり、DM-1～3及びHC-1～3のDMPK遺伝子のCTG反復配列の反復回数は、表7に示すサザンブロット法により解析された提供者のゲノムDNAの反復回数と齟齬しなかった。

[0135] 図2は、DM1患者由来のiPS (DM-3) 細胞について、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いた蛍光in situハイブリダイゼーション(以下、「FISH」という。)結果の蛍光顕微鏡写真のパネルである。左上又は左下はRNase A処理をしないでFISHを行った結果で、右上及び右下はRNase A処理後にFISHを行った結果である。左上及び右上はFISHの後にDAPIで細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真であり、左下及び右下はFISHのみでDAPI染色なしの蛍光顕微鏡写真である。

[0136] 図2によれば、RNase A処理をしないでFISHを行った場合に観察された輝点が、RNase A処理後にFISHを行うと観察されなくなった。この実験結果から前記輝点は、プローブと雑種形成したCUG-RNA凝集体(CUG-RNA foci)のシグナルであることが示された。

[0137] 図3Aは、DM-1～3及びHC-1～3の未分化細胞のそれぞれについて、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISHを行った結果の蛍光顕微鏡写真のパネルである。各写真の右上隅は1個の核の強拡大蛍光顕微鏡写真。各蛍光顕微鏡写真の右下のスケールバーは10μmを表す。

[0138] 次に図3AのFISH結果から、Opera Phenix (商標) ハイコンテントスクリーニングシステム(パーキンエルマー)を用いて、RNA凝集体の画像解析を行った。

[0139] 図3B左は、図3AのFISH結果から算出した、細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数を表す棒グラフである。図3B右は、図3AのFISH結果から算出した、DAPI染色で検出される全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率を表す棒グラフである。「\*\*」はHC-1～3の数値に対

してDM-1～3の数値は有意差があることを示す ( $p < 0.01$ )。

[0140] 図3Bに示す画像解析の結果、健常者由来のiPS細胞に比べてDM1患者由来のiPS細胞では、細胞核1個ごとのRNA凝集体の数と、CUG-RNA凝集体を有する細胞の数とが有意に増大していることが明らかになった。またDM1患者由来のiPS細胞の間では、表7に示すとおりCTG配列の反復回数が多いDM-1 (1000回を超える) 及びDM-3 (2300回を超える) は、図3Bのとおり、RNA凝集体の数がDM-1で $3.32 \pm 0.23$  (平均±標準偏差) 個、DM-3で $1.87 \pm 0.23$  個と多かった。これに対し、CTG配列の反復回数が少ないDM-2 (150回を超える) は、RNA凝集体の数も $0.078 \pm 0.009$  個と有意に少なかった ( $p < 0.01$ )。

[0141] 以上の結果から、今回作成したDM1患者由来のiPSは、多能性幹細胞の基本的な特徴を有し、かつ、筋強直性ジストロフィー1型患者の細胞の表現型を再現していることがわかった。

[0142] 実施例2 DM1患者由来のiPS細胞を用いるASOの評価 (1) 未分化細胞

#### (2. 1) 材料及び方法

図4Aは、本願実施例のASOの相補配列のDMPK-pre mRNA上の相対的な位置関係を示すとともに、ASOの構造タイプを示す、模式図である。ASO-1～3はDMPK-pre mRNA上のエクソン15のノンコーディング領域の配列に相補的で、ASO-4はDMPK-mRNA上のエクソン15のノンコーディング領域のCUG配列の反復配列に相補的で、ASO-5はpre-DMPK-mRNA上のエクソン15のノンコーディング領域の反復配列より3'末端側の配列に相補的である。ASO-4はENA及び2'-OMe-ヌクレオチド類似体からなるミックスマーであるが、他のASO-1～3及び5はウィング領域がENAでギャップ領域が未修飾デオキシリボヌクレオチドからなるギャップマー (以下、「ENA/DNAギャップマー」という) である。なお本明細書の実施例で陰性対照と

して用いるASO-Cは、DMPKとは全く異なる遺伝子の転写産物を標的とするENA/DNAギャップマーである。

[0143] 図5Aは、本願実施例のASO-2及び4と、それぞれに対応する対照のASO-A及びBとについて、相補配列のDMPK-pre mRNA上の相対的な位置関係を示すとともに、ASOの構造タイプを示す、模式図である。ASO-2及びASO-AはDMPK-mRNA上のエクソン15のコーディング領域の同一の配列に相補的で、ASO-4及びASO-BはDMPK-mRNA上のエクソン15のノンコーディング領域のCUG配列の反復配列の同一の配列に相補的である。ASO-2はENA/DNAギャップマーであるのに対し、ASO-Aはウィング領域がMOE-ヌクレオチド類似体でギャップ領域が未修飾デオキシリボヌクレオチドからなるギャップマー（以下、「MOE/DNAギャップマー」という）である。ASO-4はENA及び2'-O-Me-ヌクレオチド類似体からなるミックスマーであるが、ASO-Bは全てのヌクレオチドが2'-O-Me-ヌクレオチド類似体（RNase H非活性型ヌクレオチド）からなる。

[0144] ASO-1～5及びASO-A～Cの塩基配列及び構造的特徴は本明細書の発明の詳細な説明における表2及び3に示す。ASO-1～4及び5の塩基配列は、それぞれ、本明細書に添付する配列表の配列番号11～14及び3に列挙する。ASO-Aの塩基配列は配列番号10に列挙する。ASO-A及びBは、それぞれ、ASO-1及び5と塩基配列が同じである。ENAは神戸天然物化学株式会社（神戸）から入手してオリゴヌクレオチドを合成した。ASOの培養iPS細胞への投与は、最終濃度5又は10nMのASOをDharmaFECT1（ホライゾンディスカバリー、英国、ケンブリッジ）とともに製造者の指示書に従って実行した。ASOを培養iPS細胞に投与した48時間後にCy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISHを行った。

[0145] (2.2) 結果

図4Bは、DM1患者由来の未分化iPS細胞(DM-1)にASO-C

及びASO-1～5のいずれかを投与した48時間後に、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真である

。各蛍光顕微鏡写真の右下のスケールバーは10μmを表す。

[0146] 図4Cは、5nM又は10nMのASO-C及びASO-1～5のいずれかを投与したDM1患者由来の未分化iPS細胞(DM-1)のFISH結果から算出した、細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数を表す棒グラフである。

[0147] 図4Dは、5nM又は10nMのASO-C及びASO-1～5のいずれかを投与したDM1患者由来の未分化iPS細胞(DM-1)のFISH結果から算出した、DAPI染色で検出される全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率を表す棒グラフである。

[0148] 図4B～Dに示すとおり、ASO-1～5の全てがDM1患者由来の未分化iPS細胞のRNA凝集体を有意に減少させた。ENA/DNAギャップマーのASO-1～3及び5においてはASO-5が最も強くRNA凝集体の形成を抑制した(図4C及びD)。CUG反復配列を標的とするENA及び2'-OMe-ヌクレオチド類似体からなるミックスマーASO-4でiPS細胞を処理したとき、RNA凝集体は完全に消失した(図4B～D)。

[0149] 図4Eは、5nM又は10nMのASO-C及びASO-1～5のいずれかを投与したDM1患者由来の未分化iPS細胞(DM-1)の増殖及び生存の状態を示す棒グラフである。縦軸はASO-Cの細胞数を1.0とする細胞数の割合を表す。

[0150] 図4Eに示すとおり、ASO-1、4及び5は5nMでも10nMでも未分化iPS細胞の増殖及び生存には影響を与えないが、ASO-2及び3を投与すると、低用量であっても細胞数の低下をもたらした。

[0151] 図5Aに示すとおり、ASO-2及びASO-Aは同一のDMPK-mRNA上の配列を標的とする。しかしASO-2がENA/DNAギャップマーであるのに対し、ASO-AはMOE/DNAギャップマーである点で異

なる。ASO-AはISIS 445569というコード名で報告された（非特許文献5（Wheeler, T. M. ら、Nature、488、111（2012）））。同様にASO-4及びASO-Bは同一のDMPK-mRNA上の配列を標的とする。しかしASO-4がENA及び2'-OMe-ヌクレオチド類似体からなるミックスマーであるのに対し、ASO-Bは全てのヌクレオチドが2'-OMe-ヌクレオチド類似体からなるミックスマーである点で異なる。ASO-BはPS58というコード名で報告された（非特許文献7（Mulders, S. A. ら、Proc Natl Acad Sci U S A、106:13915（2009）））。そこで今回ASO-A及びBを調製して、それぞれ、ASO-2及び4の陽性対照として用いた。

- [0152] 図5Bは、DM1患者由来の未分化iPS細胞（DM-1）にASO-2又はASO-Aを投与した後に、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真である。各蛍光顕微鏡写真の右下のスケールバーは10μmを表す。
- [0153] 図5C左は、5nM若しくは10nMのASO-2、ASO-A又はASO-Cを投与したDM1患者由来の未分化iPS細胞（DM-1）についてのFISH結果から算出した、細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数を表す棒グラフである。図5C中は、5nM若しくは10nMのASO-2、ASO-A又はASO-Cを投与したDM1患者由来の未分化iPS細胞（DM-1）のFISH結果から算出した、DAPI染色で検出される全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率を表す棒グラフである。図5C右は、5nM若しくは10nMのASO-2、ASO-A又はASO-Cを投与したDM1患者由来の未分化iPS細胞（DM-1）の増殖及び生存の状態を示す棒グラフである。縦軸はASO-Cの細胞数を1.0とする細胞数の割合を表す。
- [0154] 図5Dは、DM1患者由来の未分化iPS細胞（DM-1）にASO-4又はASO-Bを投与した後に、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA

／LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真である。各蛍光顕微鏡写真の右下のスケールバーは10 $\mu$ mを表す。

[0155] 図5E左は、5nM若しくは10nMのASO-4、ASO-B又はASO-Cを投与したDM1患者由来の未分化iPS細胞（DM-1）のFISH結果から算出した、細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数を表す棒グラフである。図5E中は、5nM若しくは10nMのASO-4、ASO-B又はASO-Cを投与したDM1患者由来の未分化iPS細胞（DM-1）のFISH結果から算出した、全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率を表す棒グラフである。図5E右は、5nM若しくは10nMのASO-4、ASO-B又はASO-Cを投与したDM1患者由来の未分化iPS細胞（DM-1）の増殖及び生存の状態を示す棒グラフである。縦軸はASO-Cの細胞数を1.0とする細胞数の割合を表す。

[0156] 図5Cに示すとおり、5nMでも10nMでも、ASO-Aは未分化iPS細胞の数を減少させることなくRNA凝集体を減少させたのに対し、ASO-2はRNA凝集体を減少させたが未分化iPS細胞の数も減少させた。そこで、ASO-2の効果は細胞障害性によるものと考えられる。

[0157] これに対し図5Eに示すとおり、5nMでも10nMでも、ASO-4及びASO-Bはともに未分化iPS細胞の数を減少させることなくRNA凝集体を減少させたので、ASO-4及びASO-Bの効果は細胞傷害性によるものとはいえない。しかもASO-4は、RNA凝集体をほぼ完全に消失させる点で、半分以上のRNA凝集体が残存するASO-Bより顕著に優れたRNA凝集体抑制効果を奏するものといえる。ASO-BとASO-4との相違点は、ASO-4がENA及び2'-OMe-ヌクレオチド類似体からなるミックスマーであるのに対し、ASO-Bは全てのヌクレオチドが2'-OMe-ヌクレオチド類似体からなり、全てのヌクレオチド間結合がホスホロチオアートである点である。そこで、RNase H非活性型ヌクレオチド類似体及び／又はヌクレオチド間結合を少なくとも2種類含むミックスマー構造を有することがASO-4の顕著に優れたRNA凝集体抑制効果

をもたらしたと考えられる。

[0158] 実施例3 筋強直性ジストロフィー患者由来のiPS細胞からの筋細胞の分化

(3. 1) 材料及び方法

本発明の実施例で樹立した未分化iPS細胞から筋細胞を分化させる方法は以下のとおりである。Tet-On誘導性MyoD発現システム（非特許文献22、Shoji, E. ら、Sci Rep, 5, 12831 (2015)）及びピューロマイシン耐性マーカーをpiggyBacベクターのKW110\_PB\_TA\_ERN（アッドジーン、米国マサチューセッツ州、ウォータータウン）に組み込んだ。作成されたベクターを、リポフェクタミンLTX（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）を用いて製造者の指示に従って、トランスポゼースをコードするpCyL43ベクターとともにDM1患者由来のiPS細胞（DM-1～3）及び健常者由来のiPS細胞（HC-1～3）の未分化細胞にコトランスフェクションした。iPS細胞のクローンはピューロマイシン（ナカライテスク株式会社）を用いて選択した。iPS細胞は10 $\mu$ MのRock阻害剤Y27632（ナカライテスク株式会社）を添加したStemFit培地中、マトリゲルでコーティングした細胞培養容器上に播種し、2日間培養し、その後培地を、5%のKnockOut（商標）Serum Replacement（KSR、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）、200 $\mu$ Mの2-メルカプトエタノール（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）、100U/mLのペニシリン／ストレプトマイシン（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）、及び、1 $\mu$ g/mLドキシサイクリン（クロンテック、タカラバイオ株式会社、滋賀）を添加した $\alpha$ -MEM（ナカライテスク株式会社）に切り替えた。ドキシサイクリンは第8日に除去した。培地は隔日に交換した。

[0159] 図6Aは、テトラサイクリン誘導性MyoD発現システムを用いたDM1患者由来のiPS細胞（DM-1～3）及び健常者由来のiPS細胞（HC

－ 1 ～ 3) の未分化細胞から筋細胞への分化実験系の手順を示す概念図である。「S t e m F i t」は未分化 i P S 細胞用の培地で培養される期間を表し、「K S R /  $\alpha$  - M E M」は分化した筋細胞用の培地で培養される期間を表し、「K S R /  $\alpha$  - M E M + D o x」は、分化誘導剤としてドキシサイクリンを添加した筋細胞用の培地で培養される期間を表す。第 0 日に未分化 i P S 細胞にテトラサイクリン誘導性 M y o D 発現システムをトランスフェクションし、第 2 日に分化誘導剤を添加した筋細胞用培地に培地を変更して分化誘導を開始し、第 8 日に分化誘導剤を含まない筋細胞用の培地に変更して分化誘導を終了し、第 12 日に解析を行った。

[0160] D M - 1 ～ 3 及び H C - 1 ～ 3 細胞の未分化細胞から筋細胞に分化した細胞について、実施例 1 で説明した免疫細胞化学的手法及び核内 R N A 凝集体の検出方法を用いて解析した。

[0161] (3. 2) 結果

図 6 B は、図 6 A に示す手順に従って健常者由来の i P S 細胞 (H C - 1 ～ 3) 及び D M 1 患者由来の i P S 細胞 (D M - 1 ～ 3) の未分化細胞から分化誘導された細胞における筋肉分化マーカーの発現を示す蛍光顕微鏡写真のパネルである。上段はミオシン重鎖 (M H C) に対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。中段は  $\alpha$  - アクチニンに対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。下段はミオジェニン (M y o G) に対する抗体で染色し、さらに D A P I で細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。

[0162] 図 6 B に示すとおり、H C - 1 ～ 3 及び D M - 1 ～ 3 のいずれについても、テトラサイクリン誘導性 M y o D 発現システムを用いて、ミオシン重鎖 (M H C)、 $\alpha$  - アクチニン及びミオジェニンを発現する骨格筋細胞への分化を誘導することが可能になった。

[0163] 図 6 C は、図 6 A に示す手順に従って H C - 1 ～ 3 及び D M - 1 ～ 3 細胞の未分化細胞から分化させた筋細胞のうち M H C を発現する細胞核 (M H C / D A P I) の百分率を示す棒グラフである。「n. s.」は、H C - 1 ～

3細胞とDM-1～3細胞との間で有意差が認められないことを示す。

[0164] 図6Dは、図6Aに示す手順に従ってHC-1～3及びDM-1～3細胞の未分化細胞から分化させた筋細胞のDAPI染色陽性細胞核のうち筋肉分化マーカー $\alpha$ -アクチニン発現細胞核 ( $\alpha$ -Actinin/DAPI) の百分率を示す棒グラフである。「n. s.」は、HC-1～3細胞とDM-1～3細胞との間で有意差が認められないことを示す。

[0165] 図6Eは、図6Aに示す手順に従ってHC-1～3及びDM-1～3細胞の未分化細胞から分化誘導された筋細胞のDAPI染色陽性細胞核のうち筋肉分化マーカーミオジェニンを発現する細胞核 (Myogenin/DAPI) の百分率を示す棒グラフである。「n. s.」は、HC-1～3細胞とDM-1～3細胞との間で有意差が認められないことを示す。

[0166] 図6Fは、図6Aに示す手順に従ってHC-1～3及びDM-1～3細胞から分化させた筋細胞について、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISHを行った結果の蛍光顕微鏡写真のパネルである。各蛍光顕微鏡写真の右下のスケールバーは10  $\mu$ mを表す。

[0167] 図6G左は、図6Aに示す手順に従ってHC-1～3及びDM-1～3細胞から分化させた筋細胞のそれぞれについてのFISH結果から算出した細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数を表す棒グラフである。図6G右は、図6Aに示す手順に従ってHC-1～3及びDM-1～3細胞から分化させた筋細胞のそれぞれについてのFISH結果から算出した、DAPI染色で検出される全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率を表す棒グラフである。「\*\*」はHC-1～3の数値に対してDM-1～3の数値は有意差があることを示す ( $p < 0.01$ )。

[0168] 図6B～Dに示すとおり、HC-1～3及びDM-1～3細胞由来筋細胞の70%以上がミオシン重鎖(MHC)及び $\alpha$ -アクチニンを発現した。図6Eに示すとおり、HC-1及びDM-1細胞由来筋細胞では、DAPI染色陽性細胞核のうち60～70%がミオジェニンを発現した。しかしHC-2及び3細胞並びにDM-2及び3細胞に由来する筋細胞では、DAPI染

色陽性細胞核のうち20～40%しかミオジェニンを発現しなかった。

[0169] 実施例4 DM1患者由来のiPS細胞を用いるASOの評価(2)筋細胞

(4.1)材料及び方法

実施例3に説明したHC-1～3及びDM-1～3由来の筋細胞について、実施例1に説明した核内RNA凝集体の検出方法及び実施例2に説明したASOの培養iPS細胞への投与方法を用いて解析した。

[0170] (4.2)結果

図6Fは、図6Aに示す手順に従ってHC-1～3及びDM-1～3細胞から分化させた筋細胞について、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISHを行った結果の蛍光顕微鏡写真のパネルである。各蛍光顕微鏡写真の右下のスケールバーは10μmを表す。

[0171] 図6G左は、図6Aに示す手順に従ってHC-1～3及びDM-1～3細胞から分化させた筋細胞のそれぞれについてのFISH結果から算出した細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数を表す棒グラフである。図6G右は、図6Aに示す手順に従ってHC-1～3及びDM-1～3細胞から分化させた筋細胞のそれぞれについてのFISH結果から算出した、DAPI染色で検出される全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率を表す棒グラフである。「\*\*」は、HC-1～3の数値に対してDM-1～3の数値は有意差があることを示す( $p < 0.01$ )。

[0172] 図6F及びGに示すとおり、DM1患者由来のiPS細胞(DM-1～3)由来筋細胞ではRNA凝集体が検出された。図3B及び図6Gのグラフを比較すると、全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率は、未分化DM-1～3細胞とDM-1～3由来筋細胞との間で顕著な相違は認められないが、細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数は、未分化DM-1及び3細胞(2～3.5個)とDM-1及び3由来筋細胞(11～16個)との間で非常に大きな相違が認められる。なお、DM-2由来筋細胞ではRNA凝集体がほとんど検出されなかった。

- [0173] 図7Aは、DM-1～3由来筋細胞に10nMのASO-C又はASO-4をリポフェクションにより投与した後に、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-C A DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真のパネルである。
- [0174] 図7Bは、10nMのASO-C又はASO-4を投与されたDM-1～3細胞由来筋細胞のFISH結果から算出した、細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数を表す棒グラフである。
- [0175] 図7Cは、10nMのASO-C又はASO-4を投与されたDM-1～3細胞由来筋細胞のFISH結果から算出した、DAPI染色で検出される全細胞核中RNA凝集体陽性細胞核の百分率(ASO-C投与筋細胞を100%とする)を表す棒グラフである。
- [0176] 図7Dは、10nMのASO-C又はASO-4を投与されたDM-1～3細胞由来筋細胞の増殖及び生存の状態を示す、棒グラフである。いずれの棒グラフにおいても、縦軸はASO-Cの細胞数を1.0とする細胞数の割合を表す。
- [0177] 図7A～Dに示すとおり、ASO-Cと比較して、ASO-4の投与によってDM-1及び3細胞由来筋細胞における細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数は顕著に減少した。ASO-4の投与によってDM-2細胞由来筋細胞における細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数はほとんど変化が認められなかった。これはDM-2細胞がDMPK遺伝子のCTG配列の反復回数が少ない患者に由来したことと関係する可能性がある。表7及び図1Cに示すとおり、DM-2細胞の提供者はCTG配列の反復回数がせいぜい150回であり、DM-1及び3細胞の提供者のCTG配列の反復回数が、それぞれ、1000～1150回及び2300～2850回であるのと比較して、非常に少ない。そのため、DM-2細胞はDM-1及び3細胞と比較して、ASO-4投与によるRNA凝集体減少の効果が顕在化しにくいと考えられる。
- [0178] 以上の結果から、ASO-4はDM1患者iPS細胞由来骨格筋細胞にお

いてRNA凝集体を減少させることができるとの結論を得た。

[0179] 実施例5 筋強直性ジストロフィー患者由来のiPS細胞からの神経筋オルガノイドの分化

(5. 1) 材料及び方法

神経筋オルガノイドは、Faustino Martins, J. M. et al. によって公表されたプロトコル (Cell Stem Cell, 26: 172–186 e176. (2020)) に若干の修正を加えて作成した。図8Aの模式図に概略を示すが、70%コンフルエントなiPS細胞が単一細胞に解離され、10  $\mu$ MのY27632、3  $\mu$ MのCHIR99021 (Tocris Bioscience) 及び40 ng/mLのFGF-2 (Wako) を添加したNeurobasal (NB) 培地中75,000個/cm<sup>2</sup>の密度でマトリゲルでコーティングされた培養容器に播種された。NBは、1×N2 (Gibco) を添加したAdvanced Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (Gibco) と、1×B27 (Gibco)、2 mMのL-グルタミン (Gibco)、75  $\mu$ g/mLのBSA分画V (Sigma)、0.1 mMの2-メルカプトエタノール (Gibco) を添加したNeurobasal培地 (Gibco) との1:1混合液であった。翌日、Y27632は除去され、細胞は2日間で神経中胚葉前駆細胞 (NMPs) に分化させた。オルガノイド形成0日目にmNMPsはAccumax (Innovative Cell Technologies) で解離され、ウェル1個あたり50  $\mu$ MのY27632、10 ng/mLのFGF-2、2 ng/mLのIGF及び2 ng/mLのHGF (Peprotech) を添加したNB培地100  $\mu$ Lに懸濁された4,500ないし7,200個のNMPsがPrimeSurface 96穴プレートに播種された。2日目に、2 ng/mLのIGF及び2 ng/mLのHGFを添加したNB培地で培養液の半分を置換した。4日目以降はNB培地でオルガノイドを維持した。10日目にオルガノイドを60 mmの培養ディッシュに移し、30日目に10

0 mm培養ディッシュにうつした。オルガノイドは75 rpmで巡回培養され、週2回新鮮なNB培地に交換された。オルガノイドのASO処理には、500 nMのASOを含むNB培地中でオルガノイドを巡回培養した。

[0180] オルガノイドの免疫組織化学的検討は以下のとおりに行った。

オルガノイドの固定は4%のパラホルムアルデヒドで室温、15分間行い、PBS中で10分間3回洗浄し、30%ショ糖液中に終夜浸漬して沈下させた。オルガノイドはOCTコンパウンド（サクラファインテックジャパン株式会社、東京）に包埋して、液体窒素で急速冷凍した。凍結オルガノイドを $-18^{\circ}\text{C}$ ないし $-20^{\circ}\text{C}$ でクリオスタット（CM1850、Leica Microsystems、Wetzlar、ドイツ）を用いて厚さ $12\mu\text{m}$ の凍結切片を作成した。免疫組織化学検査には、切片は0.5%のTriton-X100/PBS（0.5%PBST）中で室温、30分間透過処理し、Blocking One Histo（ナカライテスク）中で室温、2時間インキュベーションした。切片は $4^{\circ}\text{C}$ 終夜ブロッキング液中で一次抗体とインキュベーションした。0.1%のPBSTで毎回15分間ずつ4回洗浄した後、サンプルは2次抗体と室温、2時間遮光してインキュベーションした。その後、サンプルは0.1%のPBSTで毎回15分間ずつ4回洗浄し、ProLong（商標）Gold Antifade Mountant（サーモフィッシャーサイエンティフィック）でマウントした。データは共焦点レーザー顕微鏡（Nikon A1、Nikon、東京）を用いて取得した。画像解析には、NIS-Element AR Analysis（バージョン5.11.0.1、Nikon）を用いた。

[0181] （5.2）結果

本発明に係るASOが、筋細胞だけでなく、筋肉に分化する前駆細胞及び骨格筋線維においてもRNA凝集体を減少又は消失させるかどうかを検証するために、Faustino Martins, J. M. et al. によって報告された方法に従って、神経筋オルガノイド（NMOs）を50日間3次元培養した。3次元集合体はiPS細胞由来の神経筋由来の神経筋

前駆細胞（NMPs）から形成され、3次元集合体は神経外胚葉系及び中胚葉系細胞を分化させるように運命づけられている。図8Bに示すとおり、3次元集合体は、5日目までに神経領域及び中胚葉領域を含むオルガノイドに成長し、50日目には、NMOsにはTUJ1を発現するニューロンの多い神経コンパートメントと、MHC発現細胞が多い骨格筋コンパートメントとが観察された。図8Bのパネルの左側に示すとおり、50日目のNMOsの筋領域の免疫蛍光解析から、骨格筋線維にはサルコメアタンパク質のTITINの発現が観察された。

[0182] 図8Cの上段に示すとおり、オルガノイドの骨格筋コンパートメントには、デスミンを発現する筋細胞及び筋管に沿って、PAX7を発現する筋前駆細胞／サテライト細胞が観察された。図8Cの下段に示すとおり、DM1患者のiPS細胞由来の神経筋オルガノイドでは、PAX7を発現する細胞にも、デスミンを発現する細胞にも、RNA凝集体が検出された。

[0183] 実施例6 DM1患者由来のiPS細胞を用いるASOの評価（3）神経筋オルガノイド

#### （6.1）材料及び方法

健常者及び筋強直性ジストロフィー患者由来のiPS細胞からの神経筋オルガノイドの分化と、オルガノイドの免疫組織化学的検討とを実施例5と同様に行った。核内RNA凝集体を検出するために、Cy3標識した（CAG）<sub>6</sub>-CA-DNA/LNAプローブを用いたFISHを実施例1等と同様に行った。オルガノイドのASO処理には、500nMのASOを含むNB培地中でオルガノイドを7日間旋回培養した。

[0184] （6.2）結果

図8Cの下段及び図8Dに示すとおり、DM1患者のiPS細胞由来の神経筋オルガノイドに500nMのASO-4M処理を行うと、デスミンを発現する筋細胞と、PAX7を発現する筋前駆細胞／サテライト細胞との両方で、RNA凝集体の数が減少した。

[0185] また図8Cの上段の写真から、健常者のiPS細胞由来の神経筋オルガノ

イドと比較すると、DM1患者のiPS細胞由来の神経筋オルガノイドの培養50日目のPAX7を発現する筋前駆細胞／サテライト細胞の数が減少したことが窺えた。そこで、NMOsの骨格筋コンパートメントにおいて、PAX7発現細胞数と全細胞数との比（PAX7<sup>+</sup>／DAPI）、及び、PAX7発現細胞数とMYODを発現する筋分化能のある細胞の数との比（PAX7<sup>+</sup>／MYOD<sup>+</sup>）を解析した（図8E及びF）。その結果健常者由来の神経筋オルガノイドと比較すると、PAX7を発現する筋前駆細胞／サテライト細胞の数はDM1患者由来の神経筋オルガノイドで有意に減少した。反対に、MYODを発現する筋分化能のある細胞数と全細胞数との比、及び、Ki67を発現する細胞数とPAX7を発現する筋前駆細胞／サテライト細胞の数との比はDM1患者と健常者とで変化がなかった。これらの結果は、DM1患者の神経筋オルガノイドではサテライト細胞が減少するが、ASO-4M処理により健常者の神経筋オルガノイドと同程度まで回復したことを示唆した。

[0186] 本実施例の結果から、DM1特異的な核内RNA凝集体形成が、デスミンを発現する筋細胞と、PAX7を発現する筋前駆細胞／サテライト細胞との両方で検出できた。またPAX7を発現する細胞がDM1患者の神経筋オルガノイドでは減少したことも明らかになった。CUG配列の反復配列が伸長したDMPKのRNAの作用は、サテライト細胞の挙動から筋線維形成までの骨格筋分化の全過程に影響を与える可能性を示唆した。したがって、3次元筋オルガノイド培養の実験系は試験管内疾患モデルとして新たな局面を提供できる。

[0187] 実施例7 筋強直性ジストロフィー患者由来のiPS細胞からの水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞の分化

#### （7.1）材料及び方法

水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞は、表6に掲げた参考文献のFu, Q. et al. (Invest Ophthalmol Vis Sci. 58: 517-527 (2017))にもとづいて未分化のiPS

S細胞から作成した。まず、約20個ずつのiPS細胞コロニー約80個を播種し、マトリゲルでコーティングした培養ディッシュにmTesR培地（Stemcell, Vancouver, Canada）で培養した。プレーティングから4時間後、iPS細胞は100 ng/mlのBMP阻害剤nogginを介して誘導され、培養6日目にコロニーの周辺部に上皮様細胞が最初に出現するまで外胚葉／神経外胚葉に分化するよう誘導された。次に、約50個の分化したiPS細胞を周囲の上皮様細胞とともに機械的に分離し、30～50個の分化したiPS細胞コロニーを選択してマトリゲルでコーティングした培養ディッシュに再播種した。その後、BMPシグナルをそのアゴニストであるBMP4およびBMP7（20 ng/ml）を介して再活性化させた。同時にbFGF（100 ng/ml）により線維芽細胞増殖因子シグナルを活性化した。形態学的に周辺の細胞と異なって培養基質上に伸展した水晶体上皮細胞を含む細胞クラスターが培養11日目に観察された。培養15日目にBMP4とBMP7をWnt3a（20 ng/ml）に置き換えてWntシグナルを活性化し、水晶体上皮細胞の水晶体線維細胞への分化を誘発させた。

[0188] 水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞の分化は、 $\alpha$ A-クリスタリンをマーカーとして確認した。抗 $\alpha$ A-クリスタリン抗体の免疫細胞化学的検出は実施例1と同様にして行った。また、水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞に分化した細胞を含むiPS細胞由来の培養について、実施例1で説明した核内RNA凝集体の検出方法を用いて解析した。

[0189] （7.2）結果

図9Aは、健常者及びDM1患者のiPS細胞由来の水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞（それぞれ、HC及びDM1）の位相差顕微鏡写真である。図9Aのスケールバーは100  $\mu$ mを表す。図9Bは、健常者及びDM1患者のiPS細胞由来の水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞（それぞれ、HC及びDM1）を抗 $\alpha$ A-クリスタリン抗体で染色し、さらにDAPIで細胞核を対比染色した蛍光顕微鏡写真である。図9Bのスケールバーは200  $\mu$ m

mを表す。図9Bから、図9Aで観察される扁平な細胞は $\alpha$ A-クリスタリンを発現するので、水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞であることが確認された。

[0190] 図9Cは、健常者及びDM1患者のiPS細胞由来の水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞（それぞれ、HC及びDM1）のFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真である。HCではRNA凝集体は検出されなかったが、DM1ではRNA凝集体が観察された。

[0191] 実施例8 DM1患者由来のiPS細胞を用いるASOの評価（4）水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞

#### （8.1）材料及び方法

実施例7で説明したDM1患者のiPS細胞由来の水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞にリポフェクションにより10nMのASOを投与した48時間後、実施例7と同様にCy3標識した（CAG）6-CA DNA/LNAプローブを用いたFISHを行った。

[0192] （8.2）結果

図9Cに示すとおり、DM1患者のiPS細胞由来の水晶体上皮細胞及び水晶体線維細胞（DM1）ではRNA凝集体が検出されたが、ASO-4Mで処理するとRNA凝集体はほぼ消失した。

[0193] 図9Dの左のグラフは、図9CのHC、DM1及びDM1+ASO-4MのそれぞれについてのFISH結果から算出した細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数±標準偏差を表す棒グラフである。ASO-4M処理によってDM1患者細胞由来水晶体上皮及び線維細胞における細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数は顕著に減少した。図9Dの右のグラフは、図9CのHC、DM1及びDM1+ASO-4MのそれぞれについてのFISH結果から算出した全細胞中RNA凝集体の百分率の平均±標準偏差を表す棒グラフである。ASO-4M処理によってDM1患者細胞由来の水晶体上皮及び線維細胞の全細胞数に対するRNA凝集体が検出された細胞数の百分率は顕著に減少した。以上の結果から、ASO-4M処理はDM1患者細胞由来の

水晶体上皮及び線維細胞においてもRNA凝集体を減少させることができる  
との結論を得た。

[0194] 実施例9 筋強直性ジストロフィー患者由来のiPS細胞からの皮膚オル  
ガノイドの分化

(9. 1) 材料及び方法

皮膚オルガノイドは、Lee, J. et al. (Nature, 582: 399-404. (2020)) にもとづいて作成した。DM1患者及び健常者由来のiPS細胞はAccutaseを用いて解離され、20  $\mu$ MのY27632及び100  $\mu$ g/mlのNormocinを添加したEssential 8 Flex (Gibco) 培地 (以下、E8-20Y培地という。) に懸濁され、ウェルあたりE8-20Y培地100  $\mu$ L中にトリパンブルー染色で確認した生細胞3,500個を丸底96ウェルプレートに播種して、プレートごと100rcfで遠心して集合体形成を促進した。24時間後、100  $\mu$ g/mlのNormocinを添加したEssential 8 Flex (Gibco) 培地 (以下、E8Y培地という。) を100  $\mu$ L添加してさらに培養した。24時間後に細胞の集合体を個別に回収して、2%のマトリゲル、10  $\mu$ MのSB (Stemgent)、4 ng/mL b-FGF及び2.5 ng/mLのBMP-4を添加したEssential 6 (Gibco) 培地 (以下、E6培地という。) をウェルあたり100  $\mu$ Lとともに新たな丸底96ウェルプレートに移して皮膚オルガノイドへの分化を開始した。分化3日目に頭部神経堤細胞形成を誘導するために、200 ng/mlのLDN (BMP阻害剤、Stemgent)、50  $\mu$ g/mLのFGFを添加したE6培地を1ウェルあたり25  $\mu$ L加え、最終的に125  $\mu$ Lとした。分化6日目に、75  $\mu$ Lの新鮮なE6培地を加え、最終体積を200  $\mu$ Lとした。8日目と10日目に培地の半分を交換した。12日目に、表皮の自己組織化を誘導するために、すべての集合体を、1%マトリゲルを含む500  $\mu$ Lのオルガノイド成熟培地 (OMM) 中の24ウェル低付着性プレートの個々のウェルに移した。集合体を浮遊

培養して一定の培地循環を維持するために、24ウェルプレートに5% CO<sub>2</sub>を含む37℃のインキュベーター内で65 rpmの速度で振とうするオービタルシェーカーに置いた。OMMは、Advanced DMEM/F12 (Gibco) とNeurobasal (Gibco) を1:1の割合で混合した培地に、1X GlutaMax™ (Gibco)、0.5X B-27 Minus Vitamin A (Gibco)、0.5X N2 (Gibco) supplements、0.1 mMの2-Mercaptoethanol (Gibco) 及び100 µg/mLのNormocinを添加した培地である。分化15日目に、1%マトリゲルを含むOMMで使用済み培地の半分を補充した。18日目以降、3日ごと(18日目から45日目まで)または隔日ごと(45日目から150日目までまたはそれ以降)に培地の半量をマトリゲルなしの新鮮なOMM培地で交換し、45日目からは週に1回全培地交換を行った。集合体が成熟し大きくなるにつれて、80日目以降はウェルあたりの培地の総量を1 mLに増やす必要がある場合があった。

[0195] 皮膚オルガノイドの分化は、毛包構造の形成により確認した。また、皮膚オルガノイドの凍結切片について、実施例5と同様に核内RNA凝集体の検出方法を用いて解析した。

[0196] (9.2) 結果

図10Aに示すとおり、分化条件での培養4カ月後には、健常者及びDM1患者のiPS細胞由来皮膚オルガノイド(それぞれ、HC及びDM1)には毛包構造が形成された。図10B及びCに示すとおり、培養4カ月後のDM1患者のiPS細胞由来皮膚オルガノイドの切片では、RNA凝集体が検出されたが、健常者のiPS細胞由来皮膚オルガノイドの切片では、RNA凝集体は検出されなかった。

[0197] 実施例10 DM1患者由来のiPS細胞を用いるASOの評価(5) 皮膚オルガノイド

(10.1) 材料及び方法

健常者及び筋強直性ジストロフィー患者由来のiPS細胞からの皮膚オルガノイドの分化と、核内RNA凝集体を検出するために、Cy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA-DNA/LNAプローブを用いたFISHとを実施例9と同様に行った。オルガノイドのASO処理には、500nMのASO-4Mを含むNB培地中でオルガノイドを旋回培養した。

[0198] (10.2) 結果

図10Bの左のASO-4M処理した皮膚オルガノイド(DM1+ASO-4M)ではRNA凝集体が減少した。図10Cは、図10BのHC、DM1及びDM1+ASO-4MのそれぞれについてのFISH結果から算出した全細胞中RNA凝集体が検出される細胞の百分率の平均±標準偏差を表す棒グラフである。図10Cから、DM1患者iPS細胞由来の皮膚オルガノイドにおけるRNA凝集体の形成が、ASO-4M処理により有意に減少したことが確認された。

[0199] 実施例11 筋強直性ジストロフィー患者由来のiPS細胞からのニューロンの分化

(11.1) 材料及び方法

DM1患者及び健常者由来iPS細胞から分化させたニューロンはImamura, K. et al. (Sci Rep., 6:34904.

(2016))にもとづいて作成した。図11Aは、テトラサイクリン誘導性NGN2発現システムを用いたDM1患者由来のiPS細胞(DM-1~3)及び健常者由来のiPS細胞(HC-1~3)の未分化細胞から神経細胞への分化実験系の手順を示す概念図である。図11Aに示すとおり、「B27/N2/NB+DOX」及び「B27/NB+DOX」は分化誘導剤としてドキシサイクリンを添加した神経細胞誘導用の培地で培養される期間を表し、「B27/NB」は分化した神経細胞用の培地で培養される期間を表す。テトラサイクリン誘導性NGN2発現システムをトランスフェクションにより導入した未分化iPS細胞に、神経細胞誘導用培地に培地を変更して分化誘導を第0日に開始し、第8日に分化誘導剤を含まない神経細胞用の

培地に変更して分化誘導を終了し、第11日に解析を行った。

[0200] (11. 2) 結果

図11Bは、抗チューブリン $\beta$  III抗体で染色し、DAPI対比染色を行ったDM1患者由来iPS細胞から分化したニューロンの蛍光顕微鏡写真である。スケールバーは100 $\mu$ mを表す。図11Bに示すとおり、本実施例の手順によって、チューブリン $\beta$  IIIを発現し、神経軸索が伸長したニューロンが均質に得られる。図11Cは、健常者由来のiPS細胞(HC-1~3)及びDM1患者由来のiPS細胞(DM-1~3)から分化したニューロンを、抗チューブリン $\beta$  III抗体(上段)、抗MAP2抗体(中段)又は抗チューブリン $\beta$  III抗体及び抗Tbr1抗体で染色し、DAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真の合成画像である。図11Cに示すとおり、DM1患者由来iPS細胞は、健常者由来iPS細胞と大差なくニューロンへの分化が起こる。

[0201] 図11Dは、健常者由来のiPS細胞(HC-1~3)及びDM1患者由来のiPS細胞(DM-1~3)から分化したニューロンについてCy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISH及びDAPI対比染色を行った蛍光顕微鏡写真である。図11Dから、実施例2及び3と同様に、DM1患者由来のiPS細胞のうち、iPS細胞DM-2由来のニューロンではiPS細胞DM-1及びDM-3由来のニューロンより、RNA凝集体の細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数も、全細胞中RNA凝集体の百分率も著しく少ない。実施例2及び3と異なり、iPS細胞DM-1及びDM-3由来のニューロンでのRNA凝集体の細胞核1個あたりのRNA凝集体の平均数も全細胞中RNA凝集体の百分率もほとんど違いがみられなかった。

[0202] 実施例12 DM1患者由来のiPS細胞を用いるASOの評価(5) ニューロン

(12. 1) 材料及び方法

実施例11で説明したDM1患者のiPS細胞由来のニューロンに分化誘

導第8日にリポフェクションにより10nMのASOを投与し、第11日に実施例7と同様にCy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISHを行った。

[0203] (12.2) 結果

図11Fの上左は、Control ASOで処理したDM1患者由来のiPS細胞(DM-1)についてCy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISHと、抗チューブリンβIII抗体による染色と、DAPI対比染色とを行った蛍光顕微鏡写真の合成画像(Control)である。図11Fの上右は、ASO-4M(ASO-4と同じ)で処理したDM1患者由来のiPS細胞(DM-1)についてCy3標識した(CAG)<sub>6</sub>-CA DNA/LNAプローブを用いたFISHと、抗チューブリンβIII抗体による染色と、DAPI対比染色とを行った蛍光顕微鏡写真の合成画像(ASO-4M)である。図11Fに示すとおり、ASO-4M処理により、ニューロンのRNA凝集体は顕著に減少した。

### 産業上の利用可能性

[0204] 以上本明細書の実施例で示したとおり、本願発明のASO処理によって、DM1患者由来の未分化iPS細胞と、該iPS細胞から分化させた骨格筋細胞、水晶体上皮細胞、水晶体線維細胞、ニューロン、神経筋オルガノイド及び皮膚オルガノイドにおいて核内RNA凝集体を減少させることができた。またASO処理により、DM1患者由来神経筋オルガノイドで減少したサテライト細胞を健常者由来神経筋オルガノイドと同程度まで回復することができた。したがって、本発明の医薬組成物は、筋強直性ジストロフィー1型疾患を含む疾患の治療に有用である。さらに、本発明のiPS細胞又は該細胞から分化させた細胞及びオルガノイドは、筋強直性ジストロフィー1型疾患に限らず、ASO処理が有効とされる他の全てのトリプレット病における治療用ASOのアッセイ系として有用である。

[0205] 本出願は、2020年12月22日付で日本国に出願された特願2020-213000を基礎としており、ここで言及することにより、その内容の

全てが本明細書に組み込まれるものである。

## 請求の範囲

- [請求項1] 5'末端から3'末端に、シトシンーアデニンーグアニンのトリヌクレオチドが5～13回繰り返す反復配列のいずれかの塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含み、
- 該オリゴヌクレオチドは、R N a s e H非活性型ヌクレオチド類似体を少なくとも2種類含むミックスマー構造を有する、医薬組成物。
- [請求項2] 前記オリゴヌクレオチドは、
- (1) 配列番号1～9のいずれかの塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、
- (2) 5'末端から3'末端に、アデニンーグアニンと、配列番号1～9のいずれかの塩基配列と、シトシンとからなる塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、又は、
- (3) 5'末端から3'末端に、グアニンと、配列番号1～9のいずれかの塩基配列と、シトシンーアデニンとからなる塩基配列からなるオリゴヌクレオチド
- である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項3] 前記R N a s e H非活性型ヌクレオチド類似体は、リボースの2'位が修飾されたヌクレオチド類似体、及び／又は、リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体である、請求項1又は2に記載の医薬組成物。
- [請求項4] 前記リボースの2'位が修飾されたヌクレオチド類似体は、2'-OMe-ヌクレオチド類似体、及び／又は、MOE-ヌクレオチド類似体である、請求項3に記載の医薬組成物。
- [請求項5] 前記リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体は、 $\beta$ -D-オキシー-L-LNA、 $\beta$ -D-ENA及び／又はR型のcEtである、請求項3に記載の医薬組成物。
- [請求項6] 前記リボースの2'位が修飾されたヌクレオチド類似体はすべて同

じ修飾糖を有する、請求項3ないし5のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[請求項7] 前記リボースの2'位が修飾されたヌクレオチド類似体は少なくとも2個の異なる修飾糖を有する、請求項3ないし5のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[請求項8] 前記リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体はすべて同じ修飾糖を有する、請求項3ないし7のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[請求項9] 前記リボースの2'位と4'位との間が架橋修飾されたヌクレオチド類似体は少なくとも2個の異なる修飾糖を有する、請求項3ないし7のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[請求項10] 前記オリゴヌクレオチドは、 $\beta$ -D-ENA-シチジン、2'-OMe-アデノシン及び2'-OMe-グアノシンを含む、請求項3ないし9のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[請求項11] 前記オリゴヌクレオチドの全てのシチジンは $\beta$ -D-ENA-シチジンであり、全てのアデノシンは2'-OMe-アデノシンであり、全てのグアノシンは2'-OMe-グアノシンである、請求項10に記載の医薬組成物。

[請求項12] 前記オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート及びボラノホスフェートからなる群より選択される少なくとも1種類のヌクレオチド連結を含む、請求項1ないし11のいずれか1項に記載の医薬組成物。

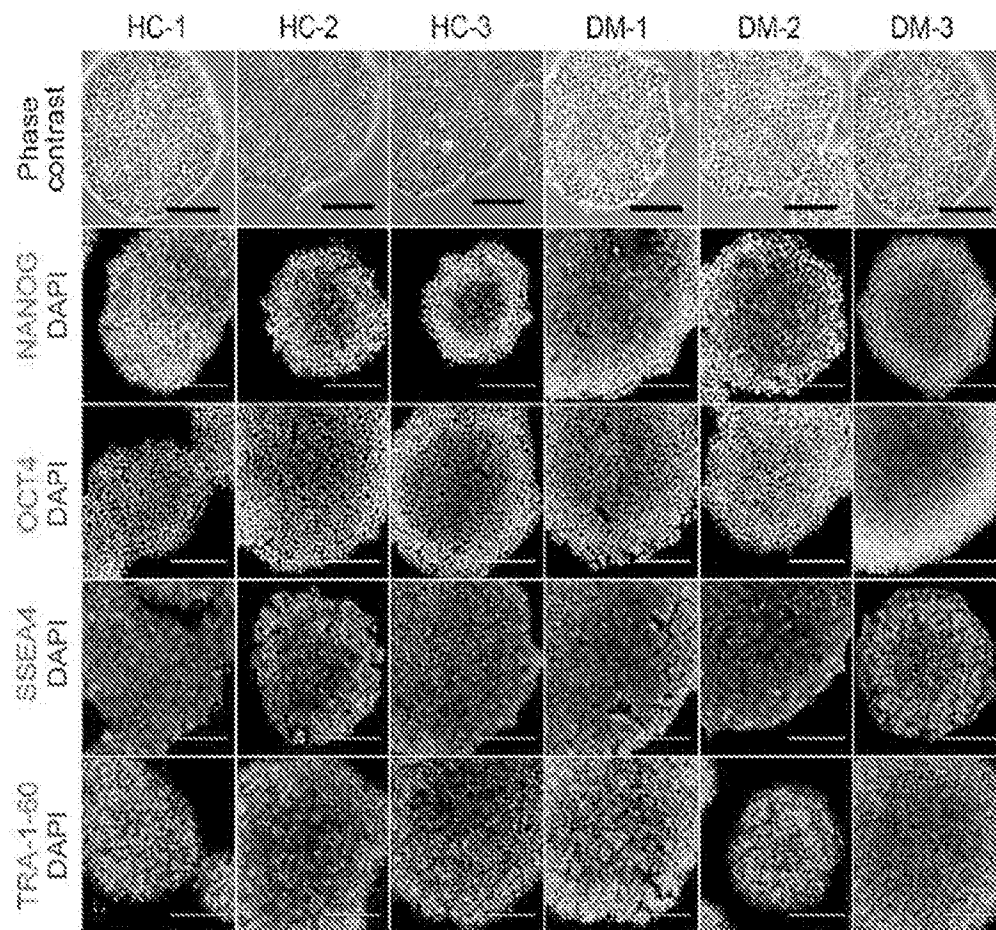
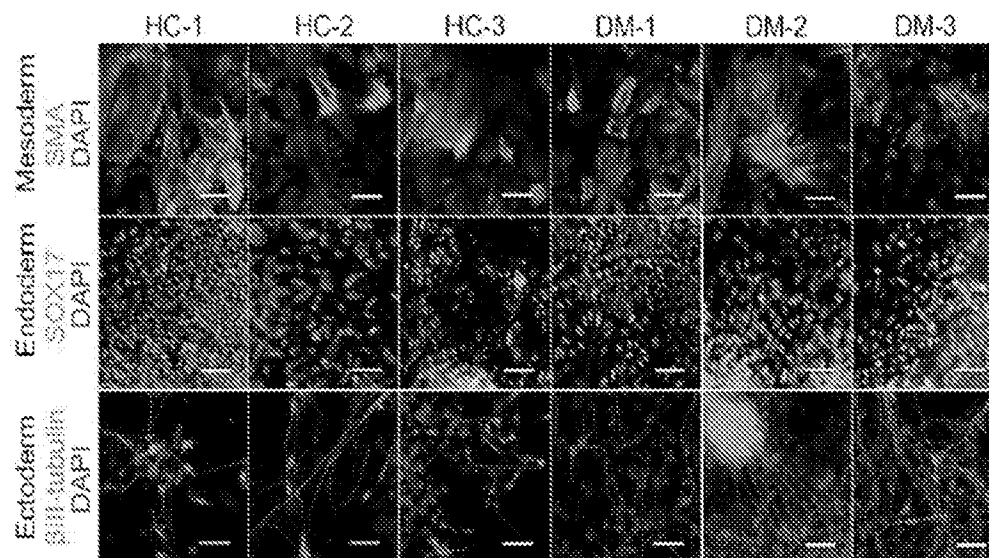
[請求項13] 薬学的に許容可能な担体又は希釈剤を含む、請求項1ないし12のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[請求項14] 前記担体は細胞膜透過用担体及び／又は核内送達用担体を含む、請求項13に記載の医薬組成物。

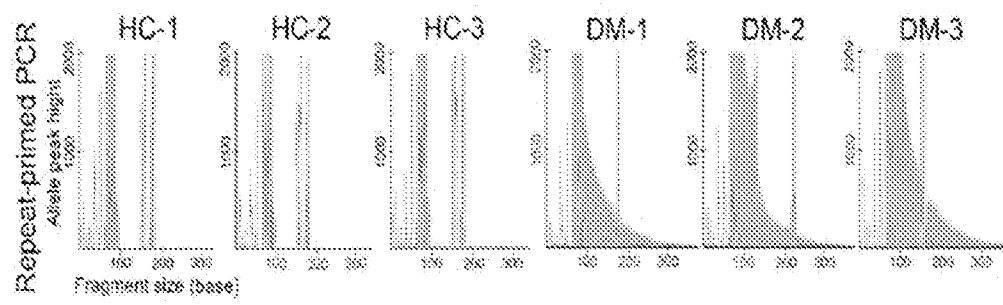
[請求項15] 経皮投与、眼球内投与、水晶体内投与、消化管粘膜内投与、消化管粘膜下投与、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、腹腔

内投与、頭蓋内投与及び髄腔内投与からなる群より選択される非経口的投与によって送達される、請求項 1 ないし 14 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

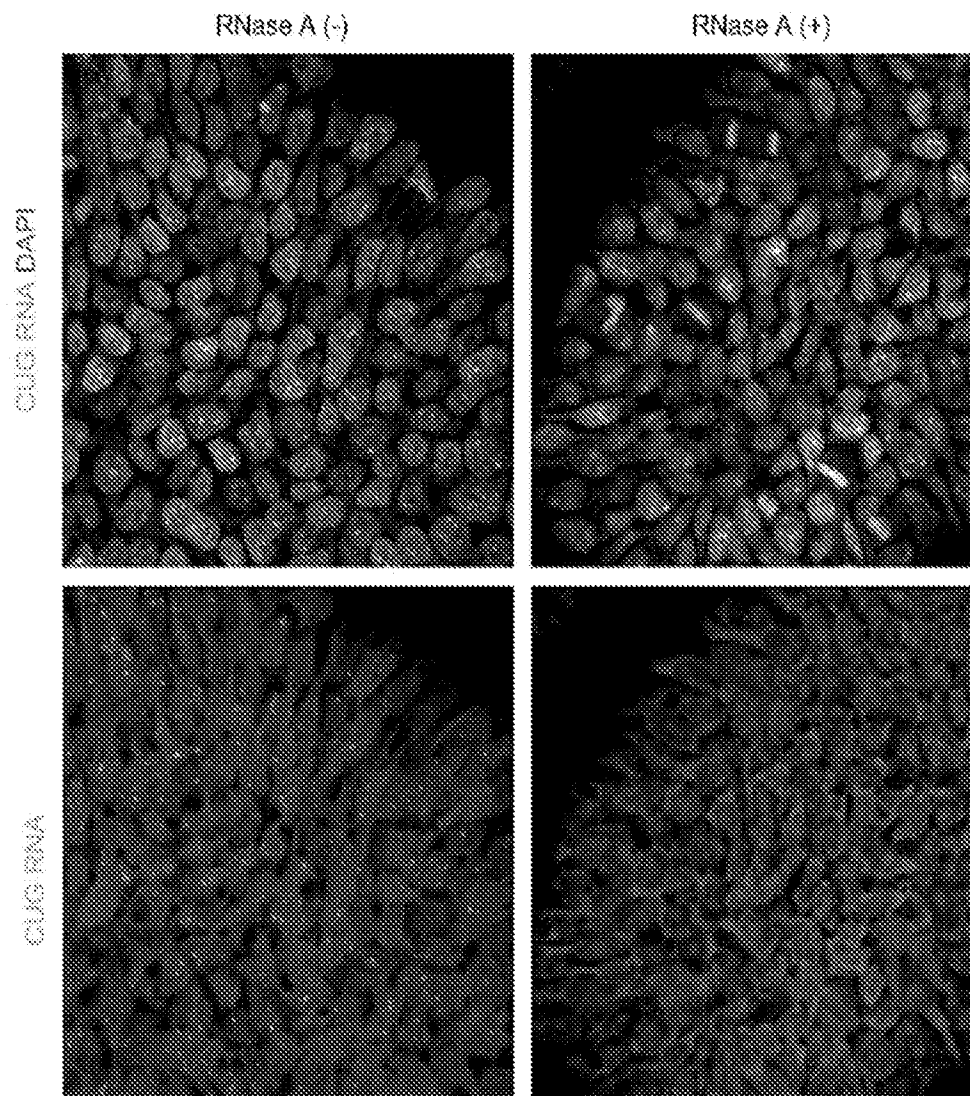
[請求項16] 筋強直性ジストロフィー 1 型疾患のいずれかの症状の治療のために用いる、請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

[1A][1B]

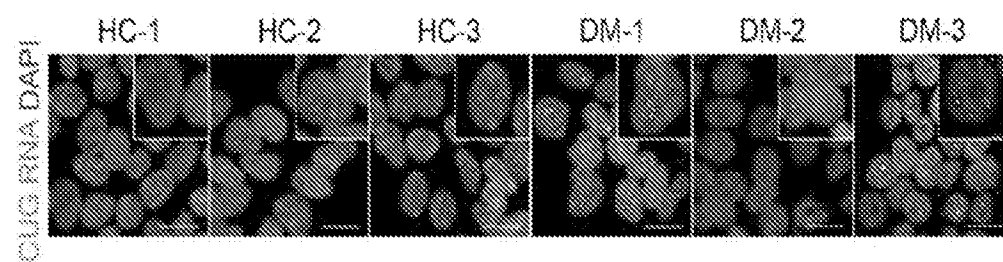
[図1C]



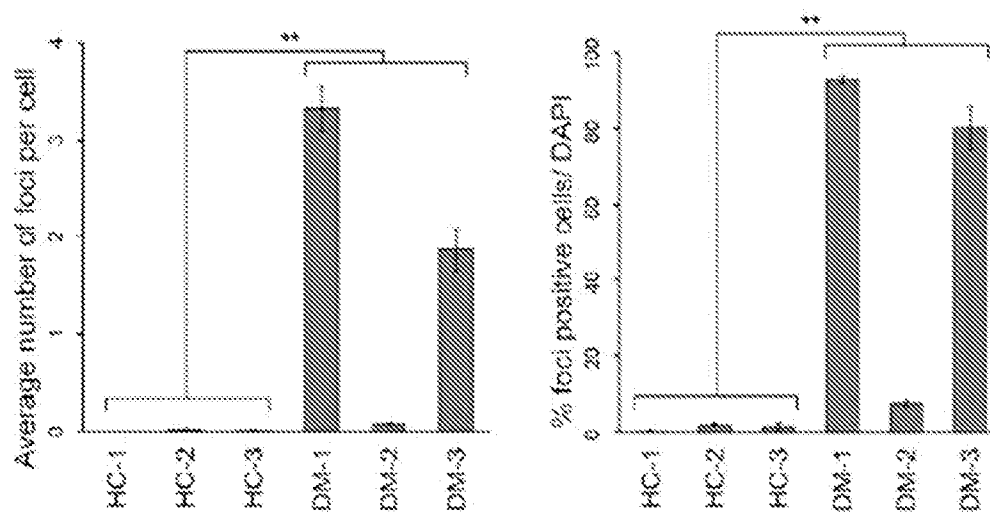
[図2]



[図3A]

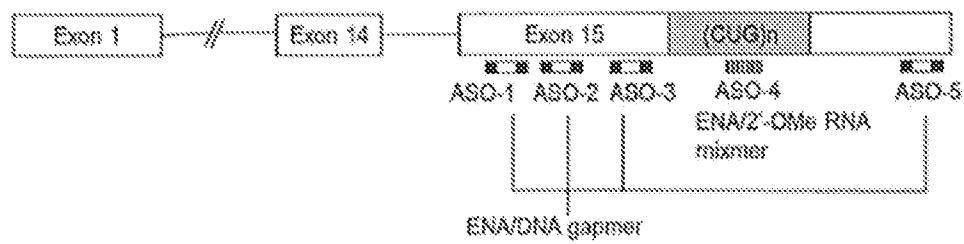


[図3B]

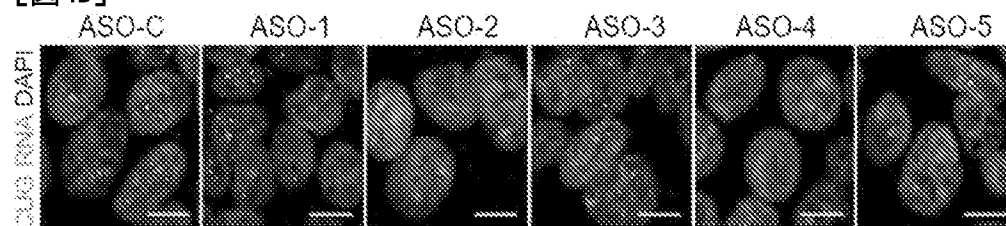


[図4A]

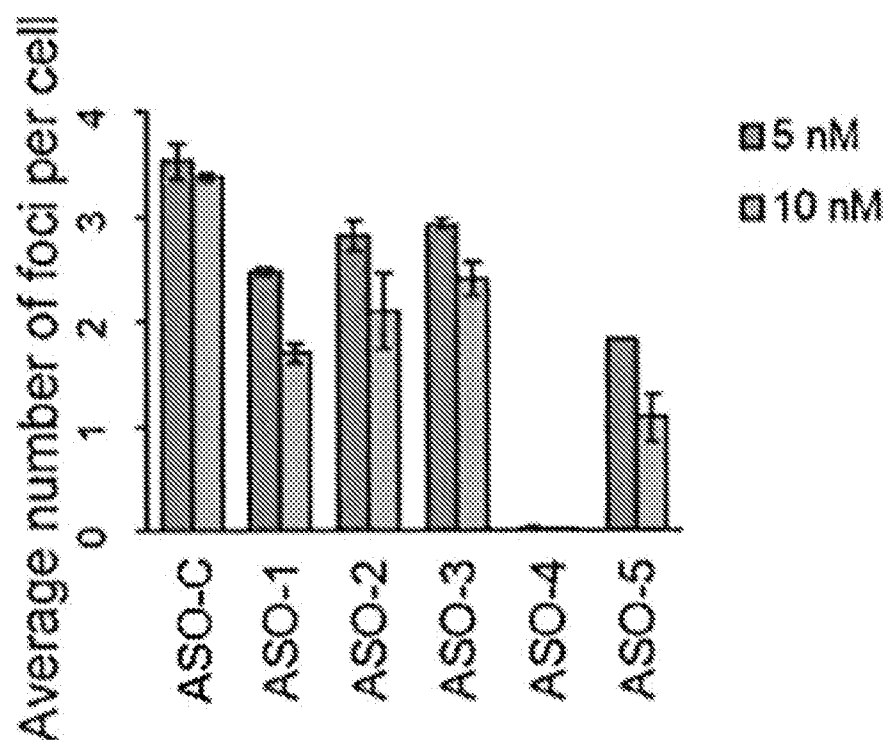
DMPK



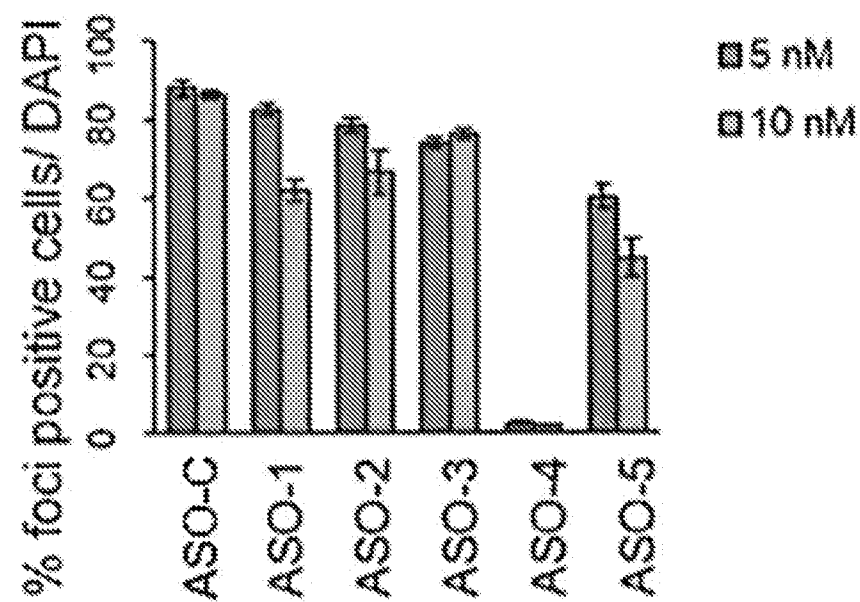
[図4B]



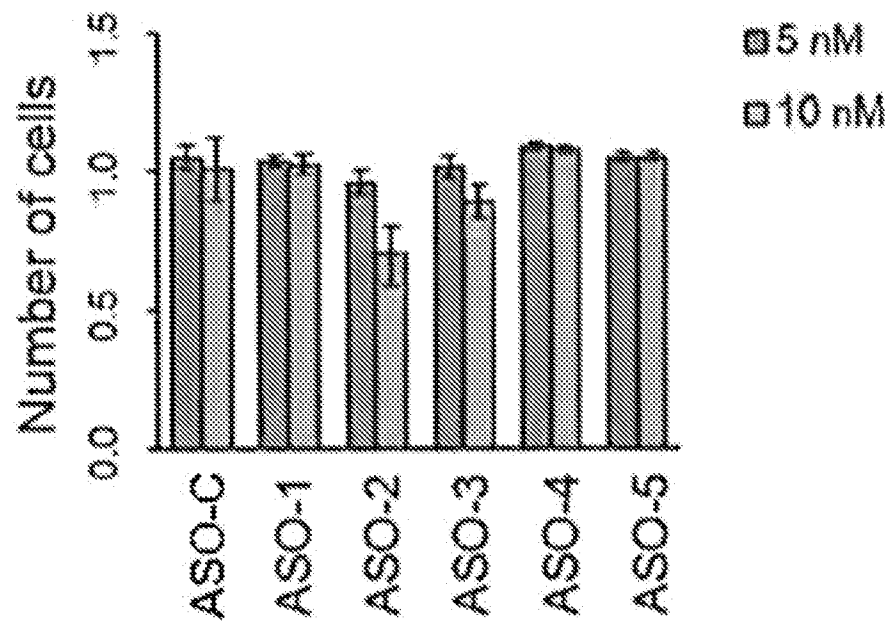
[図4C]



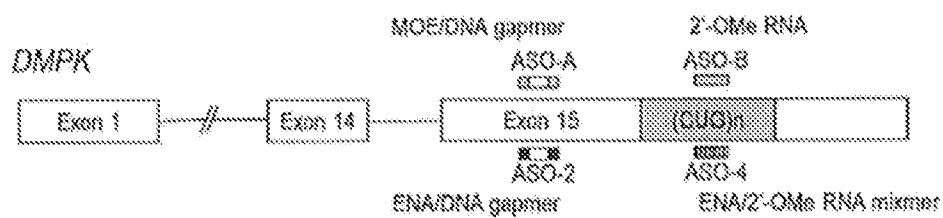
[図4D]



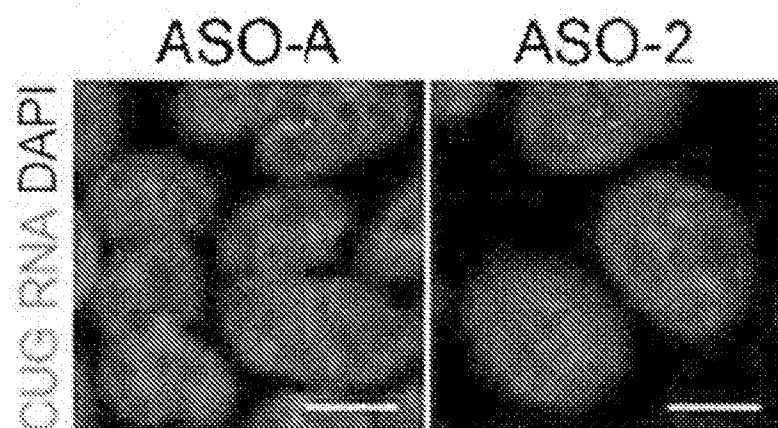
[図4E]



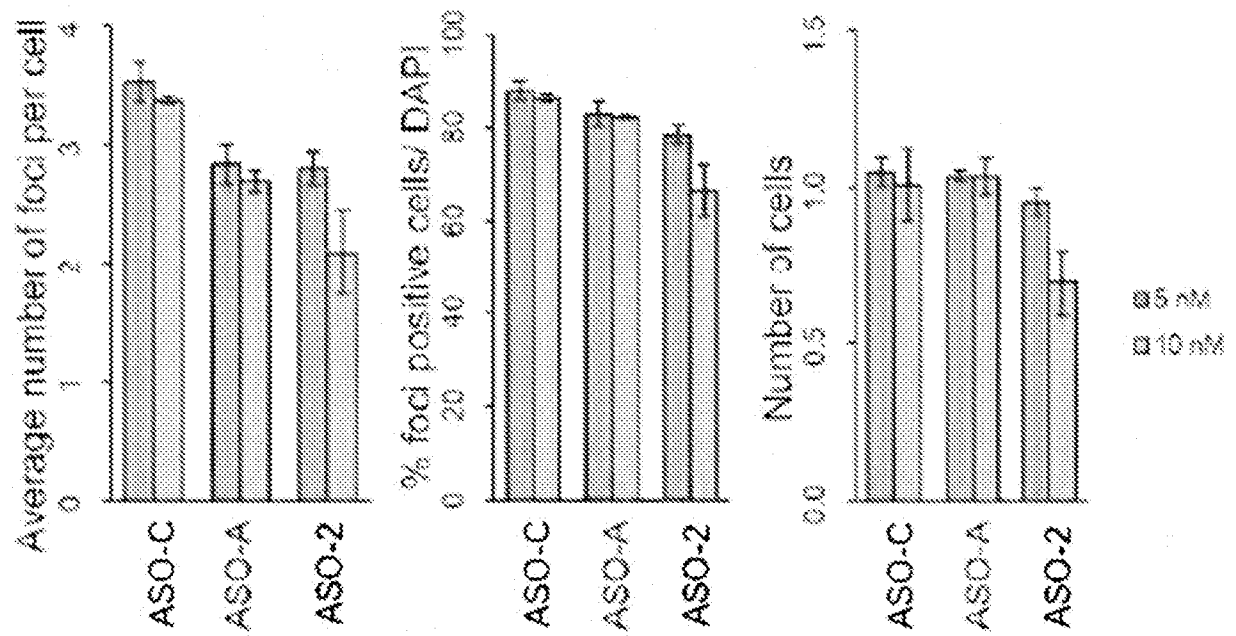
[図5A]



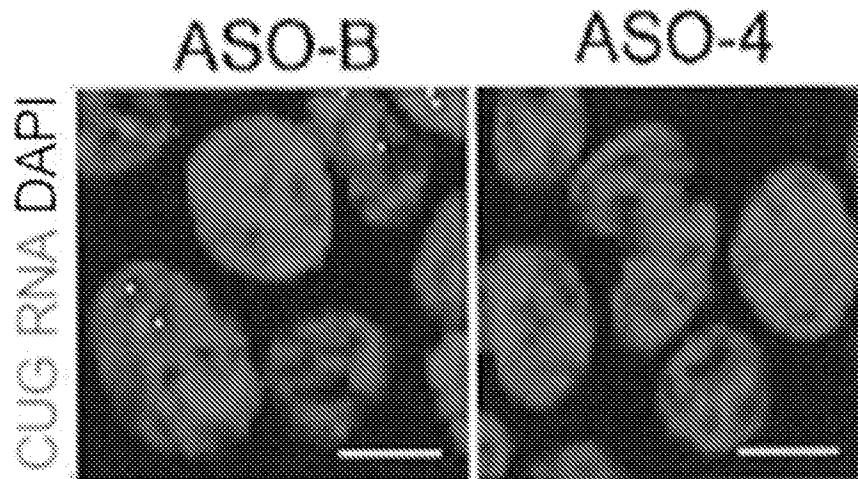
[図5B]

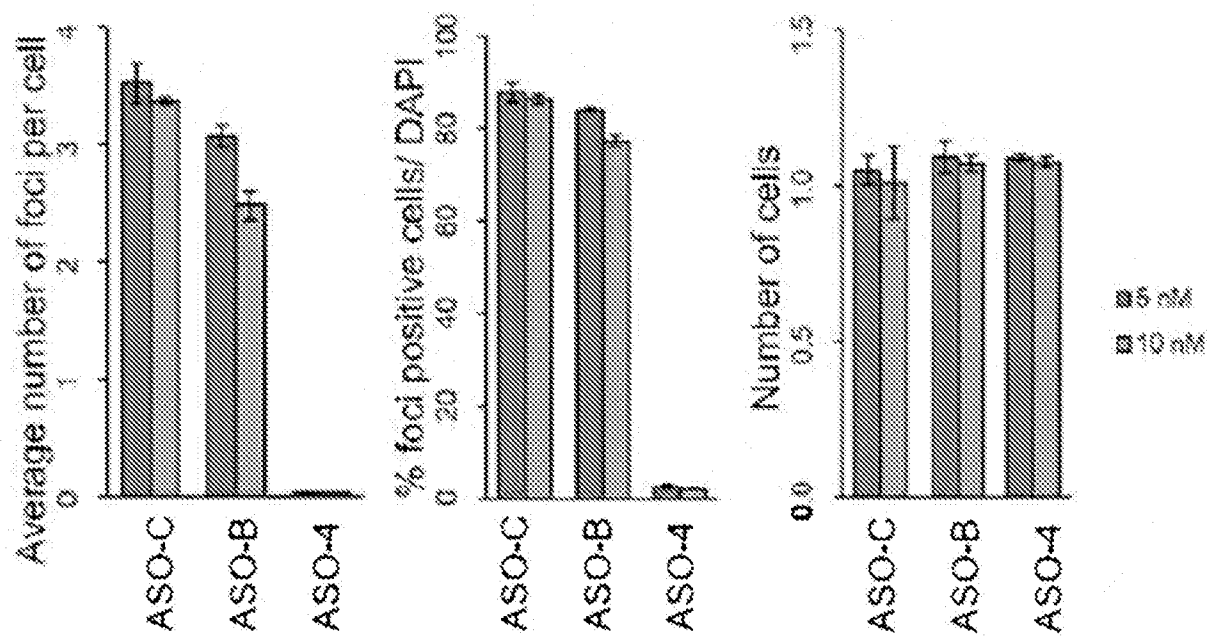
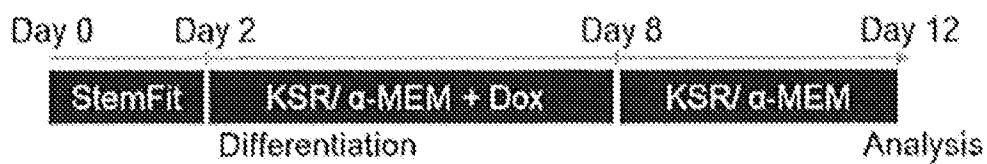
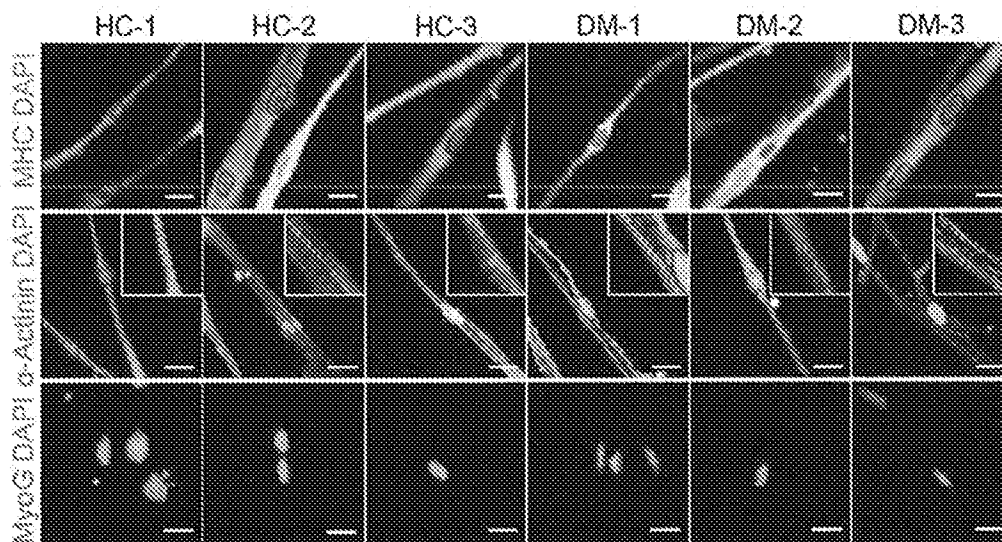


[Fig. 5C]

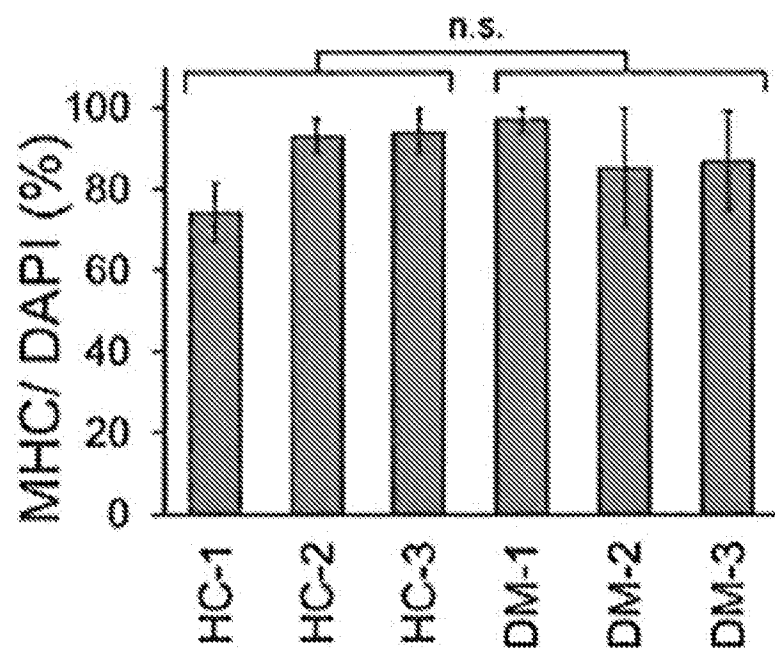


[Fig. 5D]

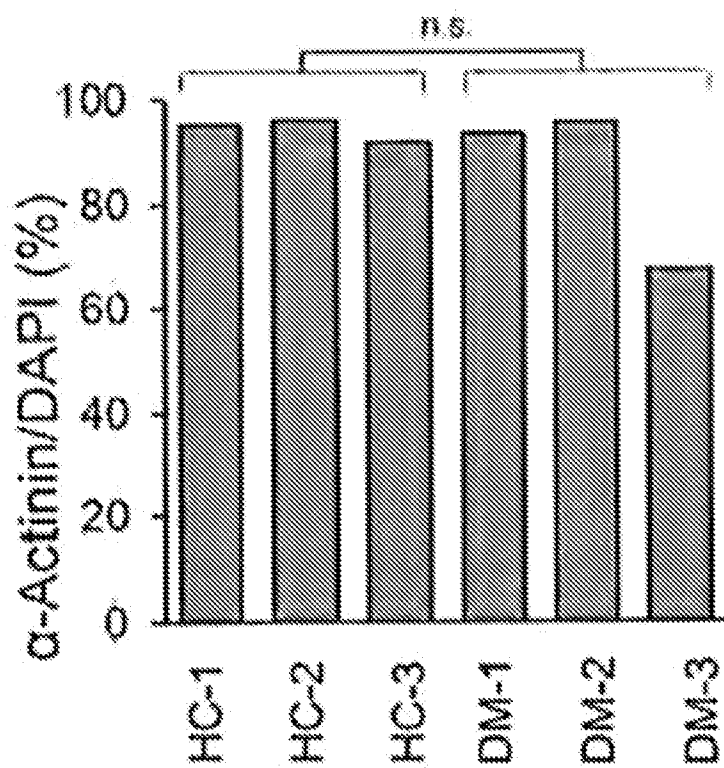


[5E][6A][6B]

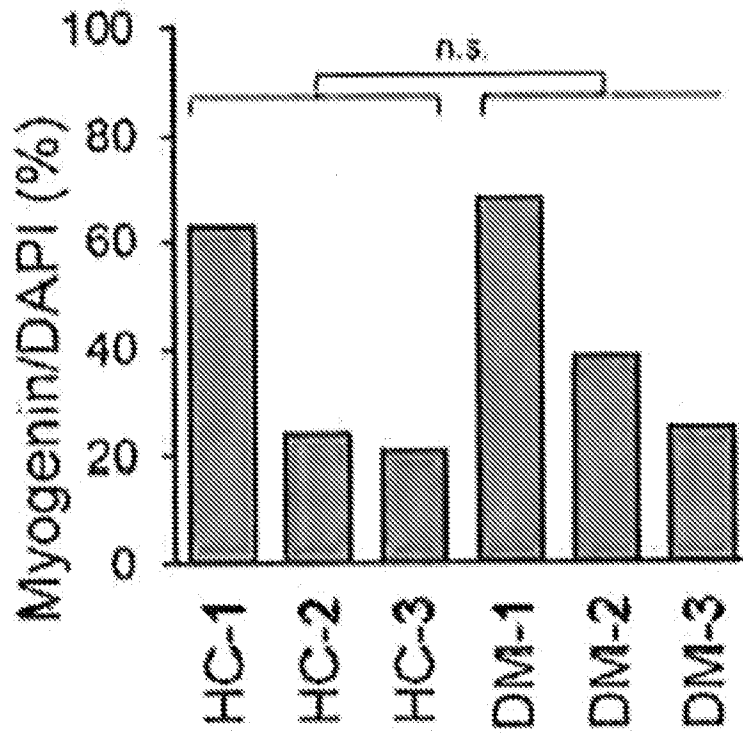
[図6C]



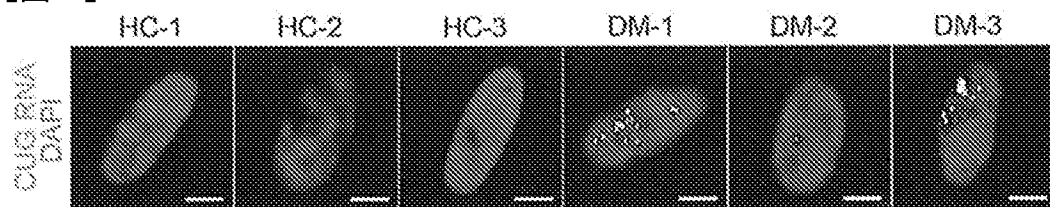
[図6D]



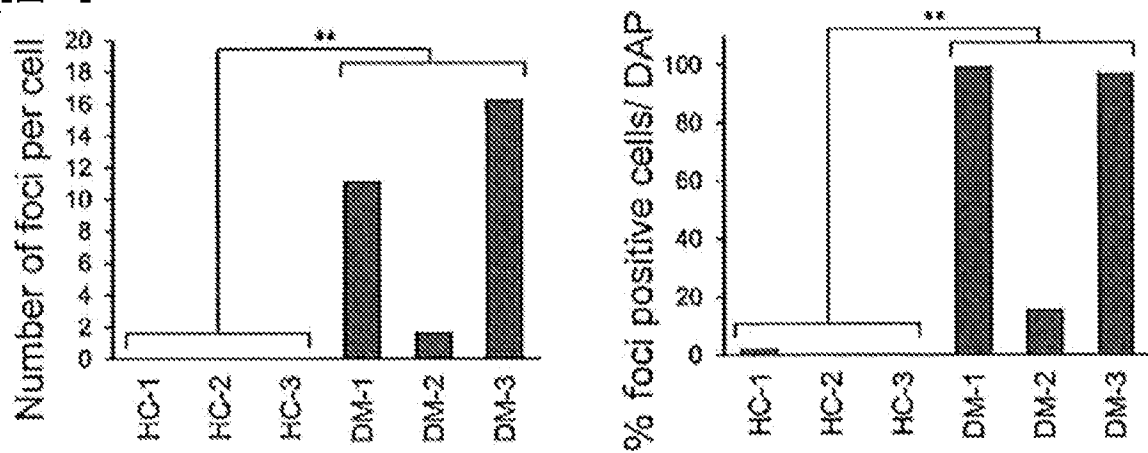
[図6E]



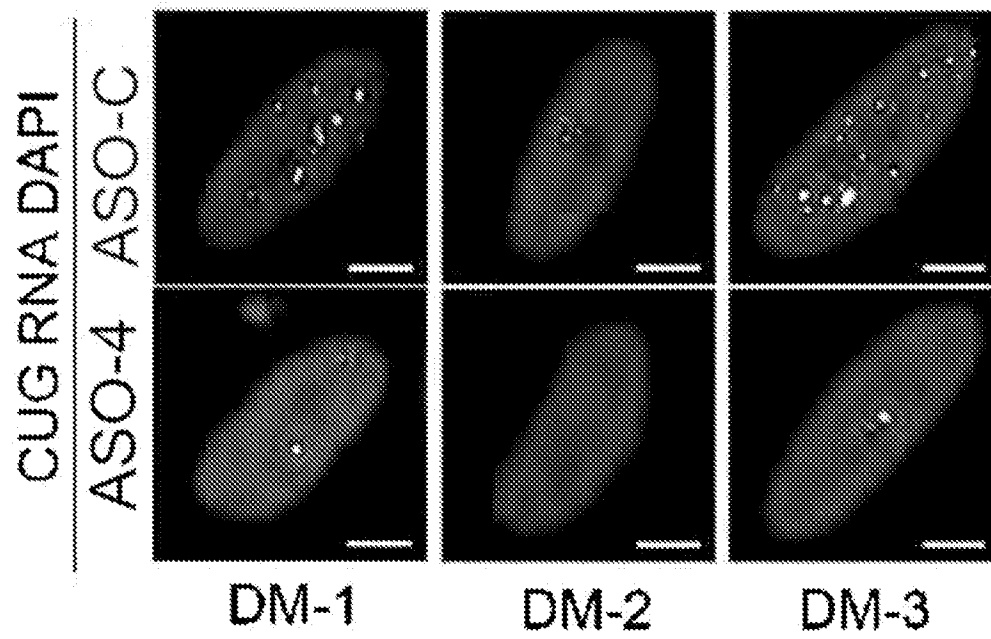
[図6F]



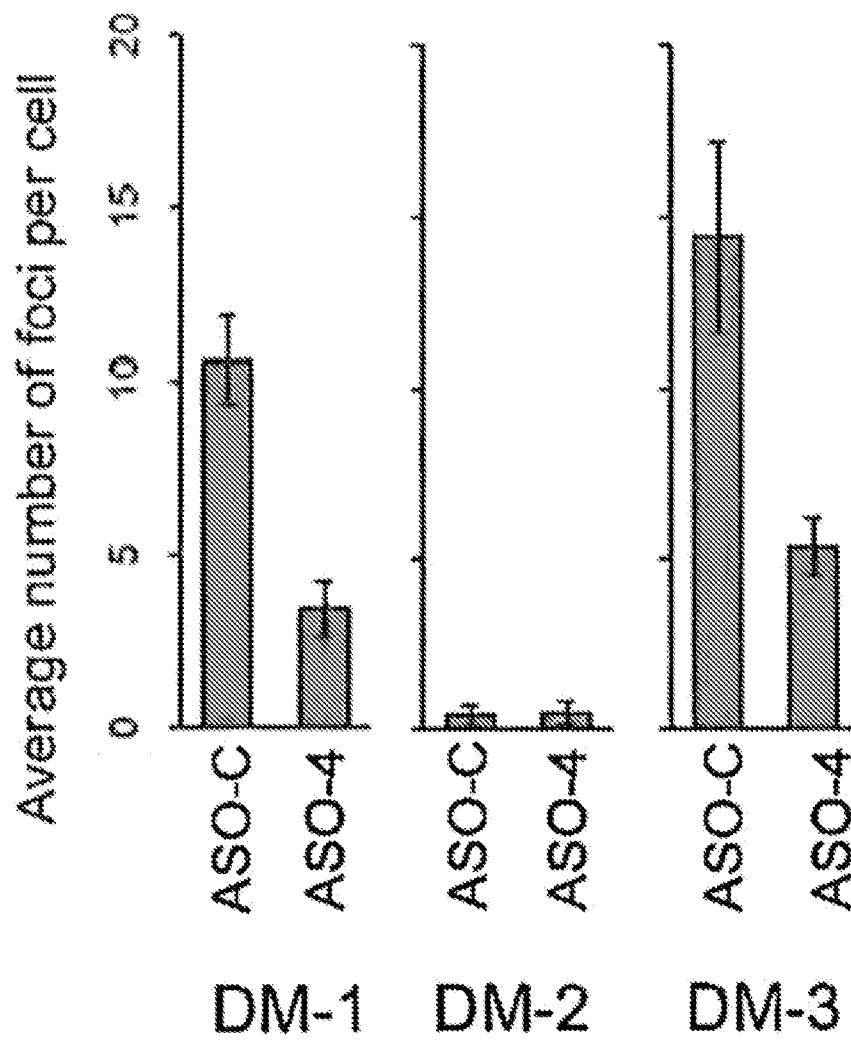
[図6G]



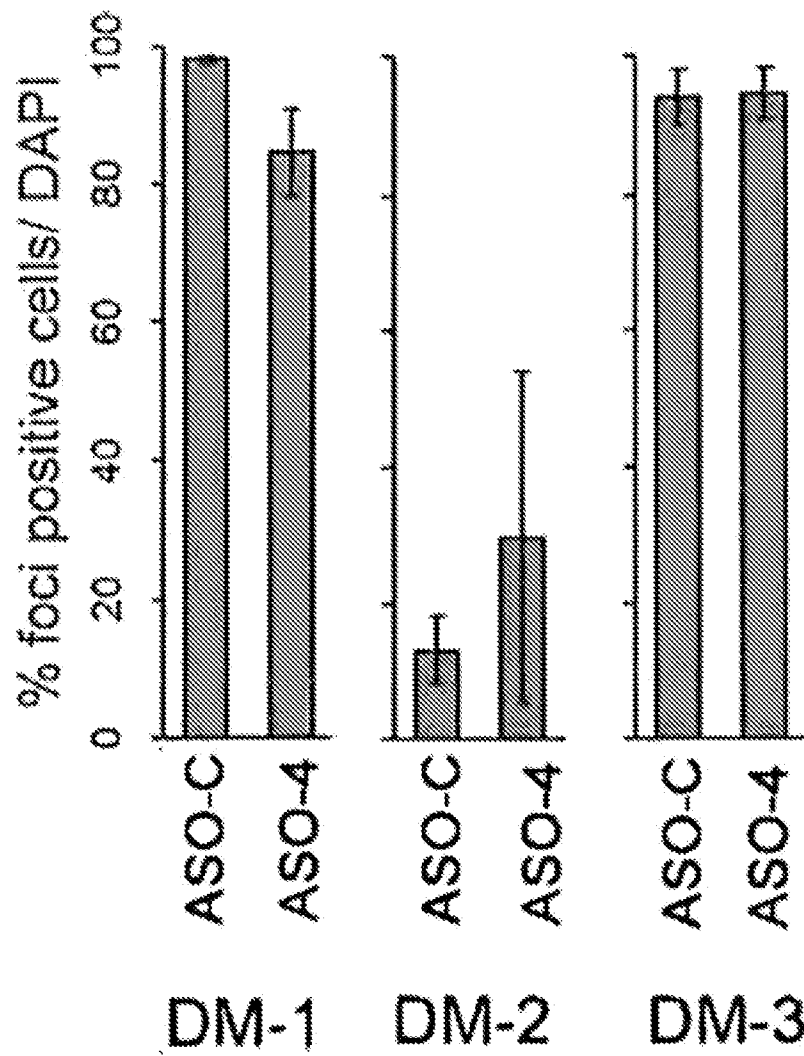
[図7A]



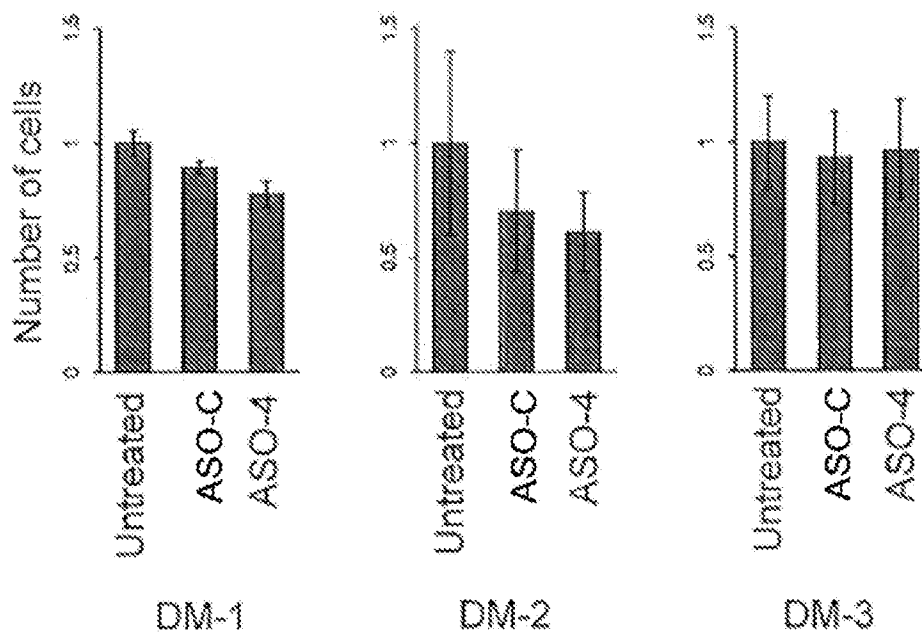
[図7B]

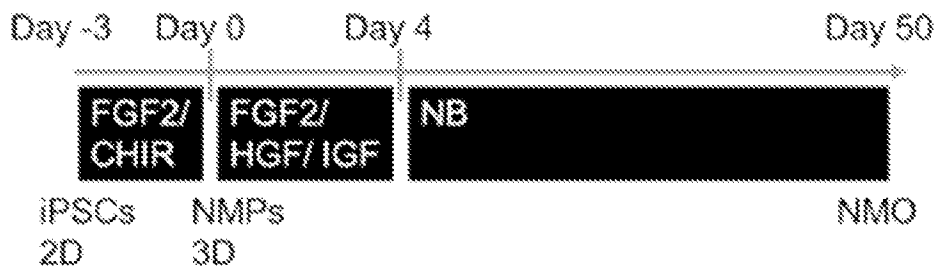
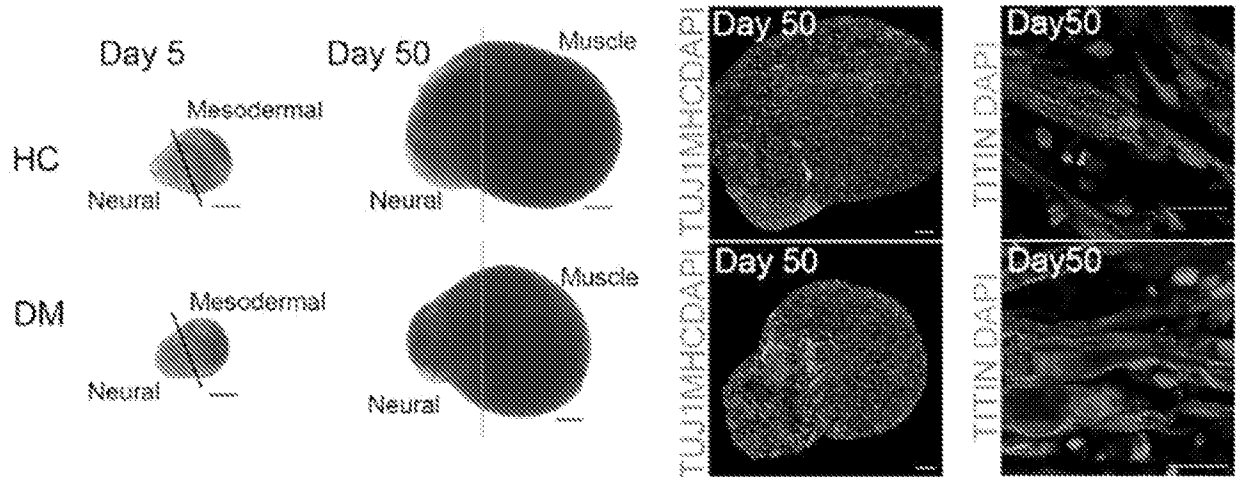
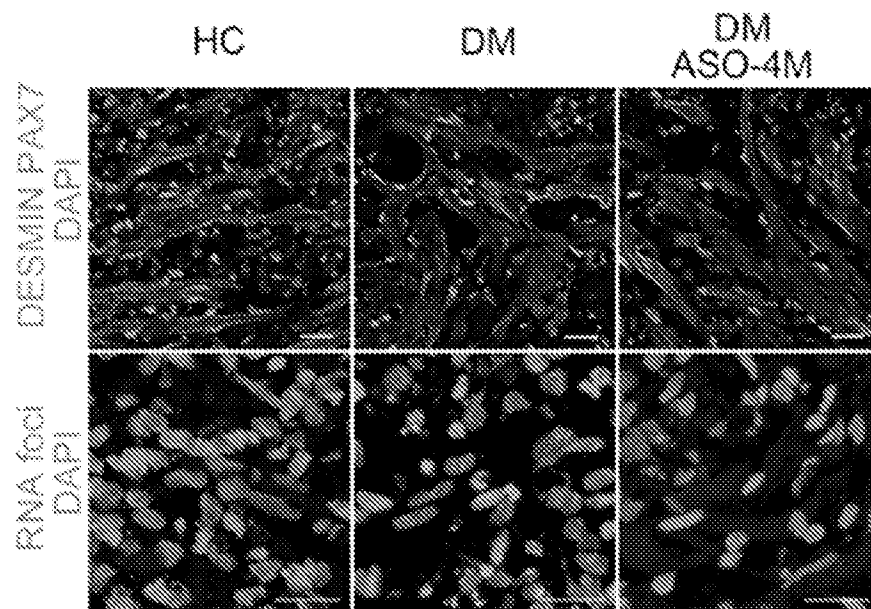


[図7C]

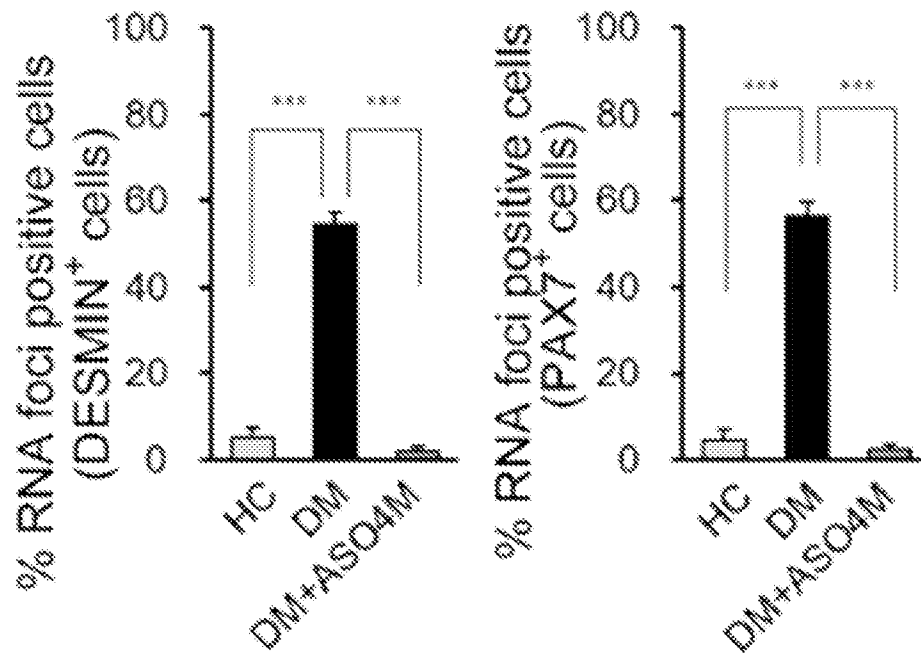


[図7D]

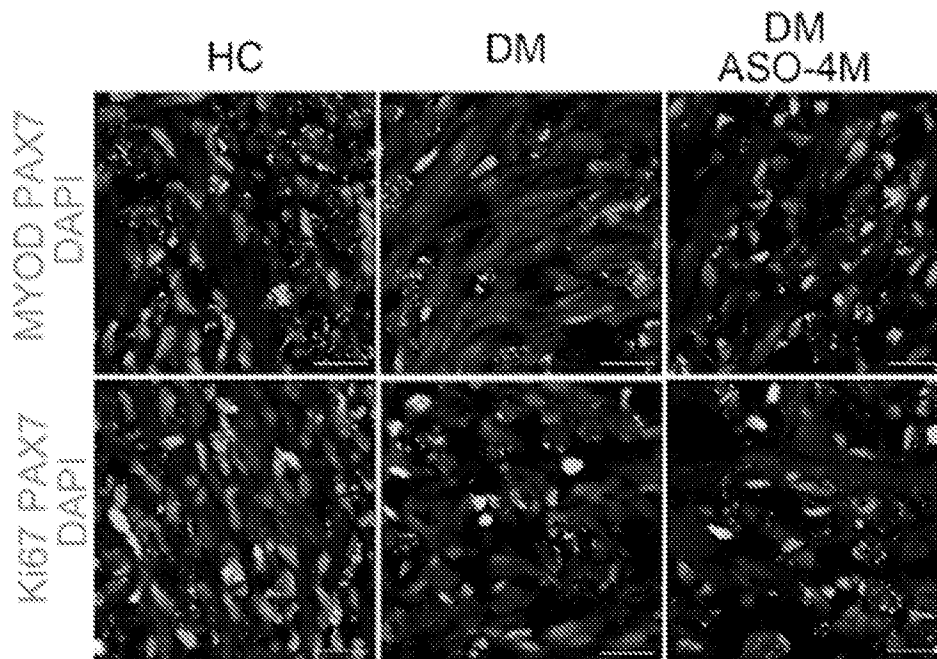


[8A][8B][8C]

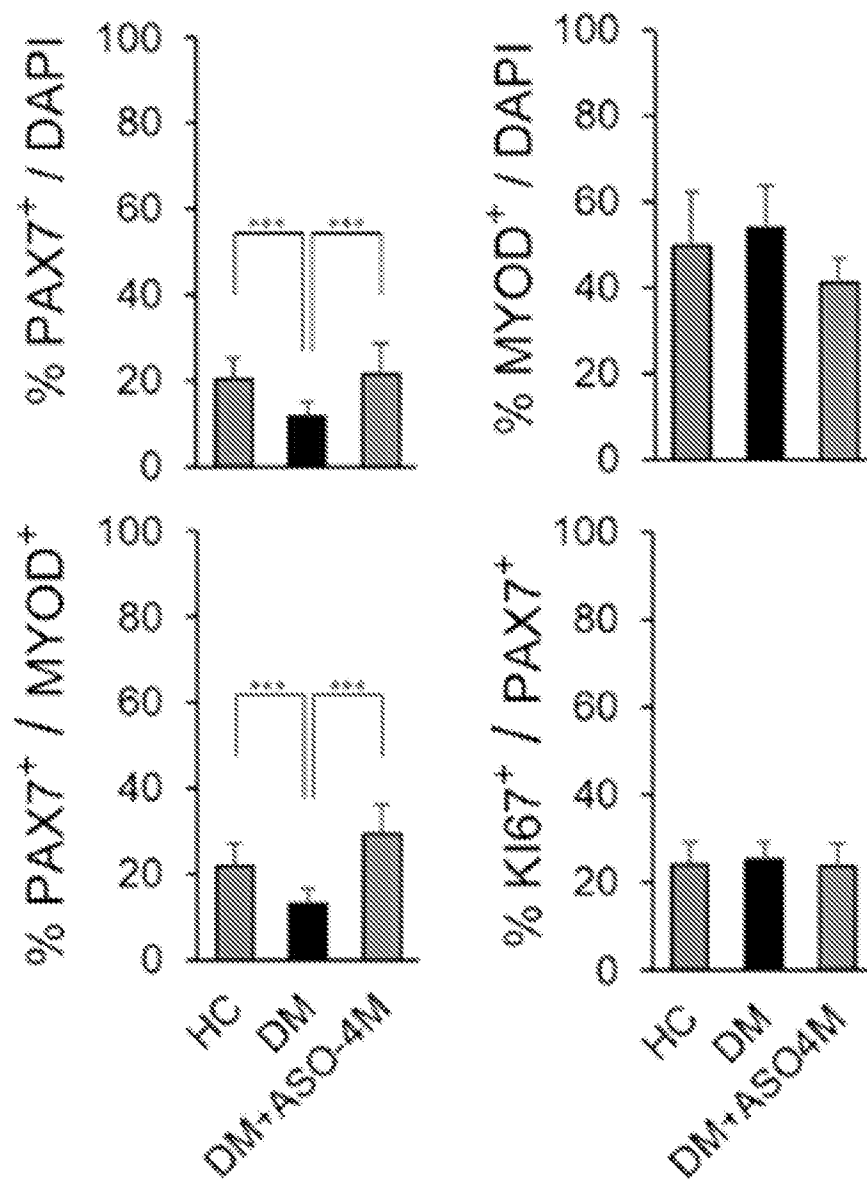
[図8D]



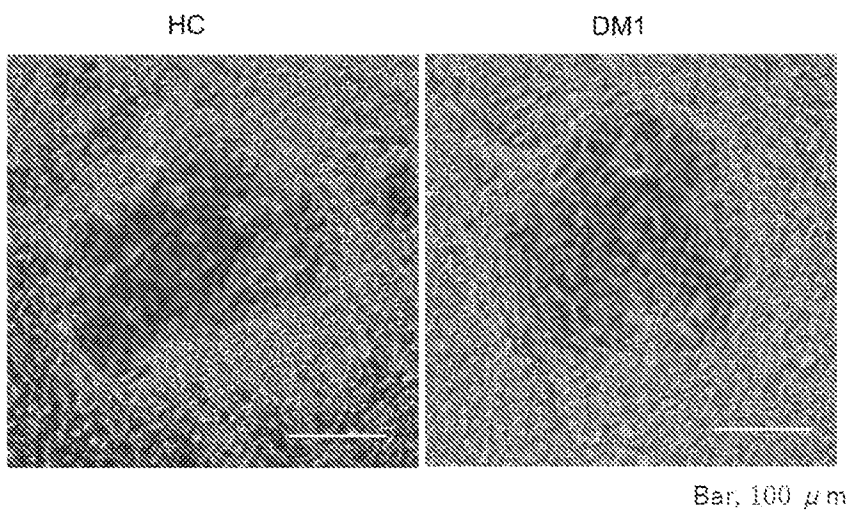
[図8E]



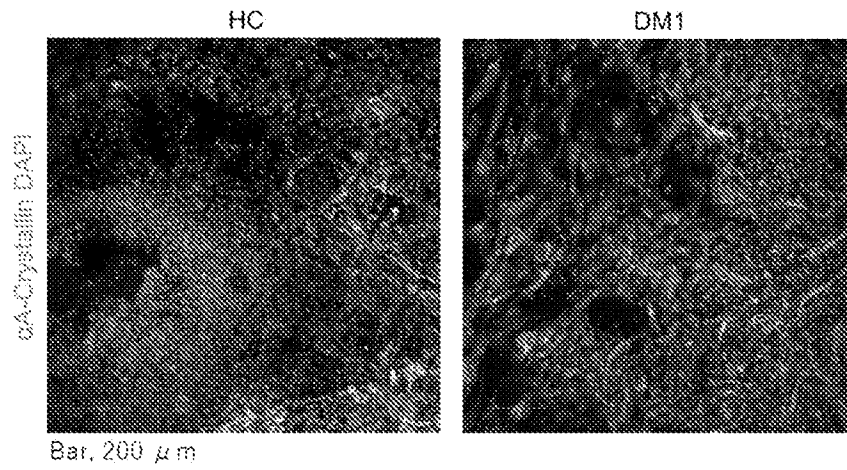
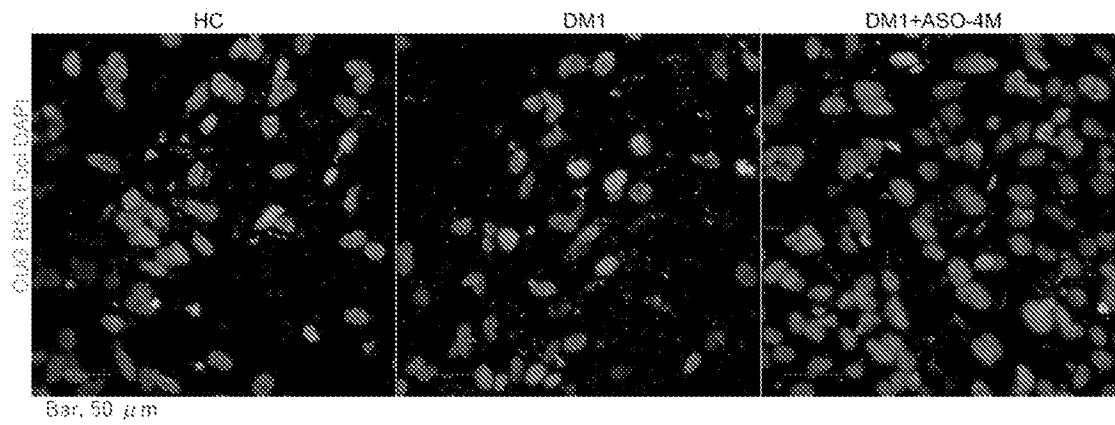
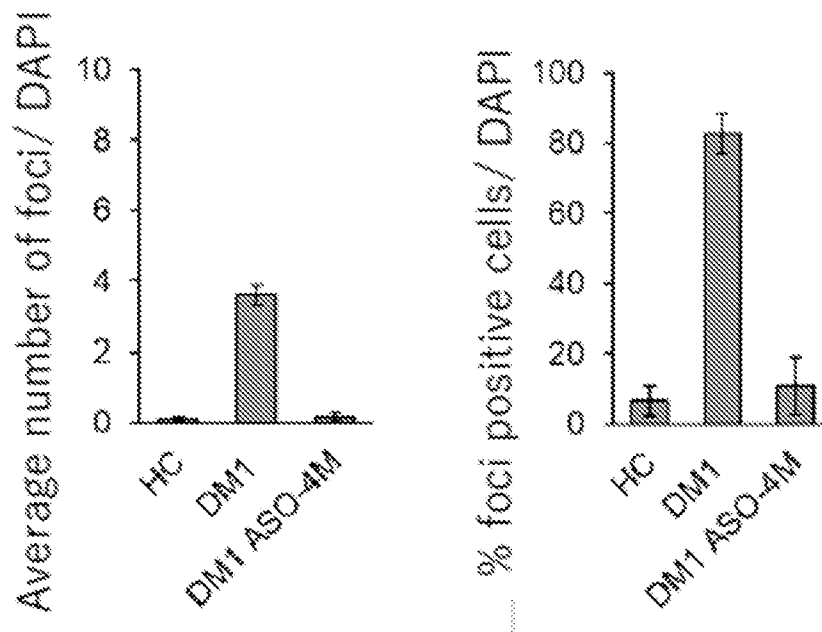
[図8F]



[図9A]



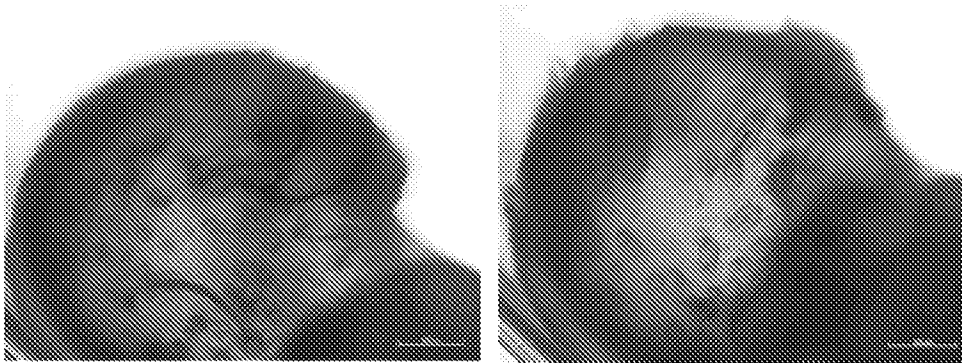
Bar, 100 μm

[9B][9C][9D]

[図10A]

HC

DM1

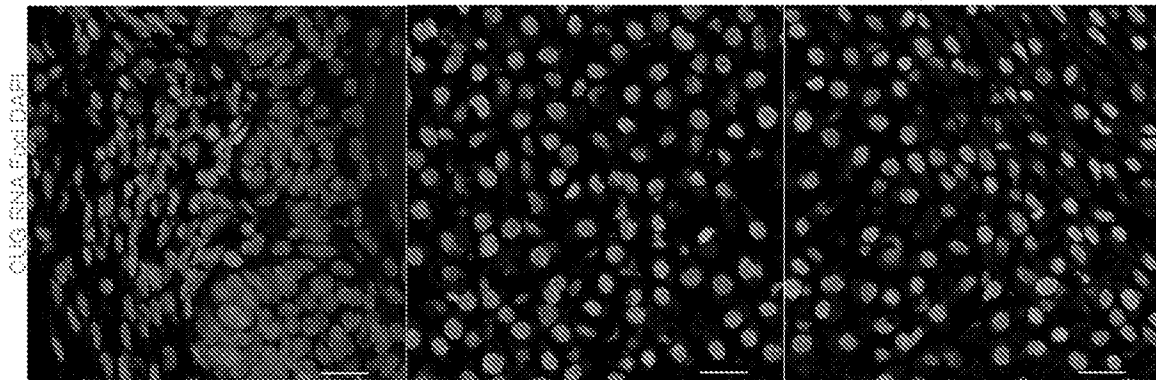
Bar, 500  $\mu$ m

[図10B]

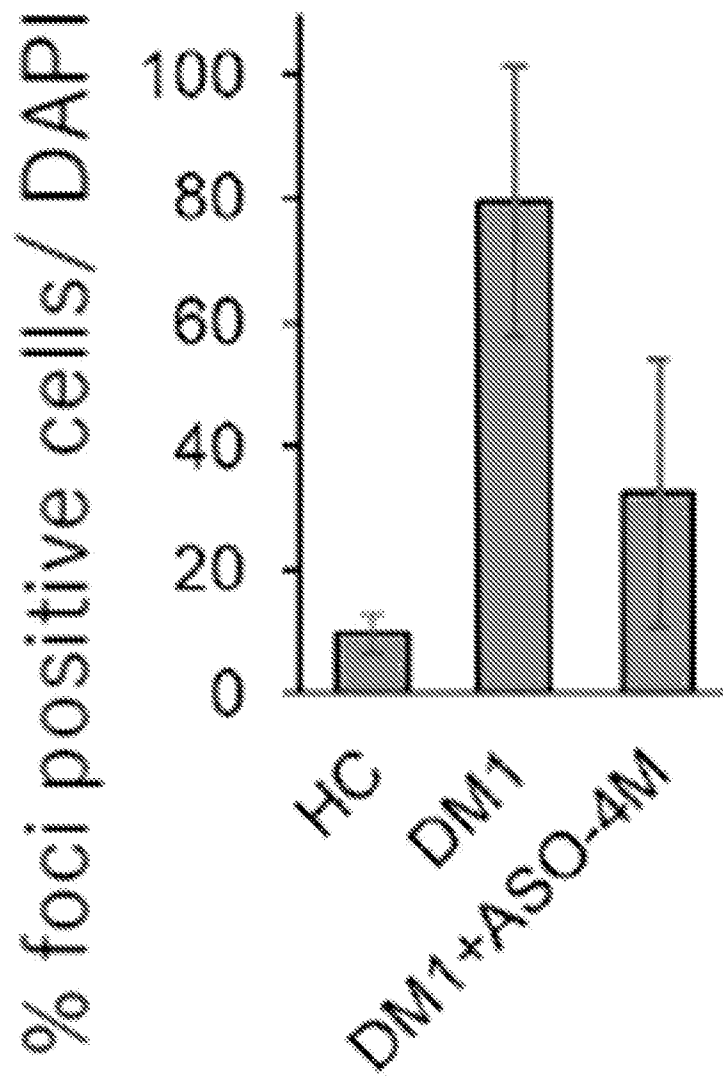
HC

DM1

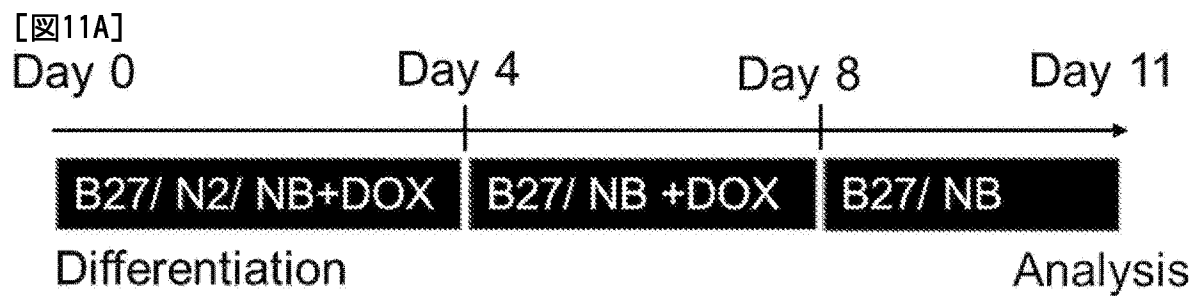
DM1+ASO-4M

Bar, 20  $\mu$ m

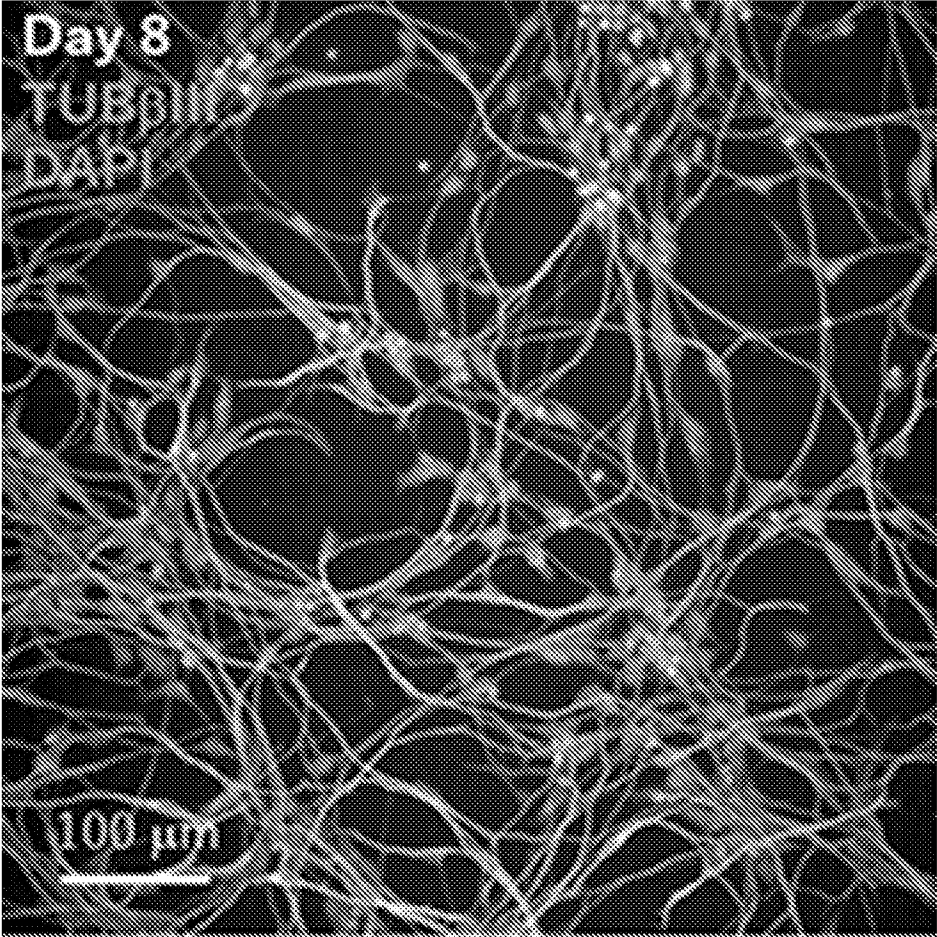
[図10C]



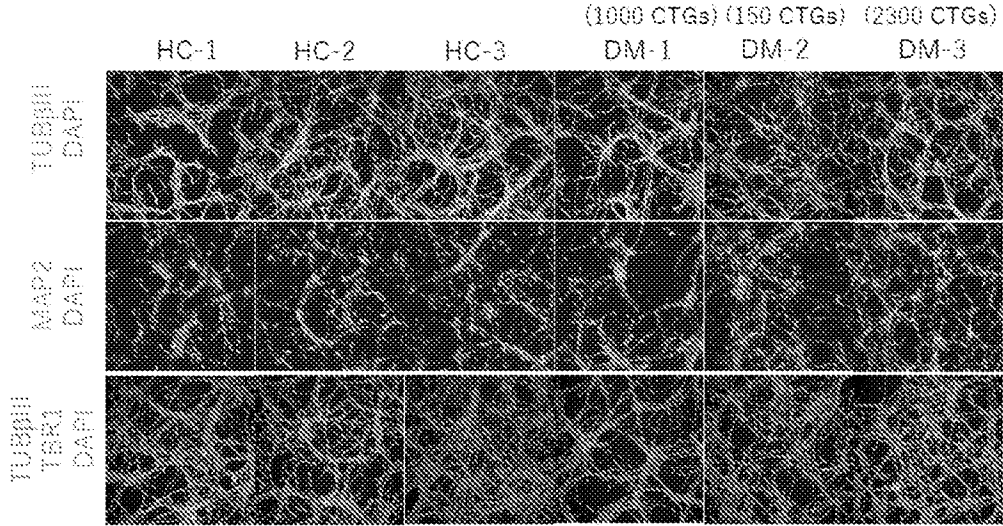
[図11A]



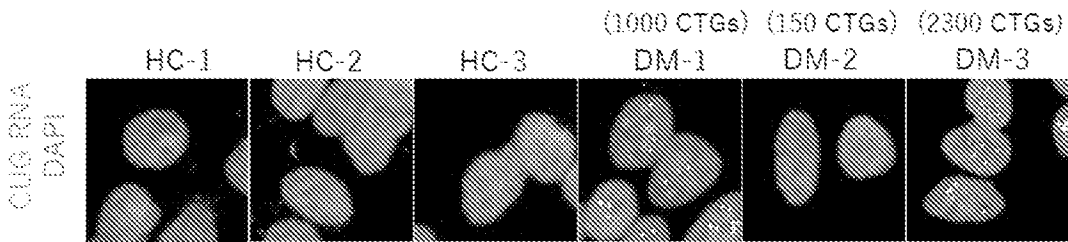
[図11B]



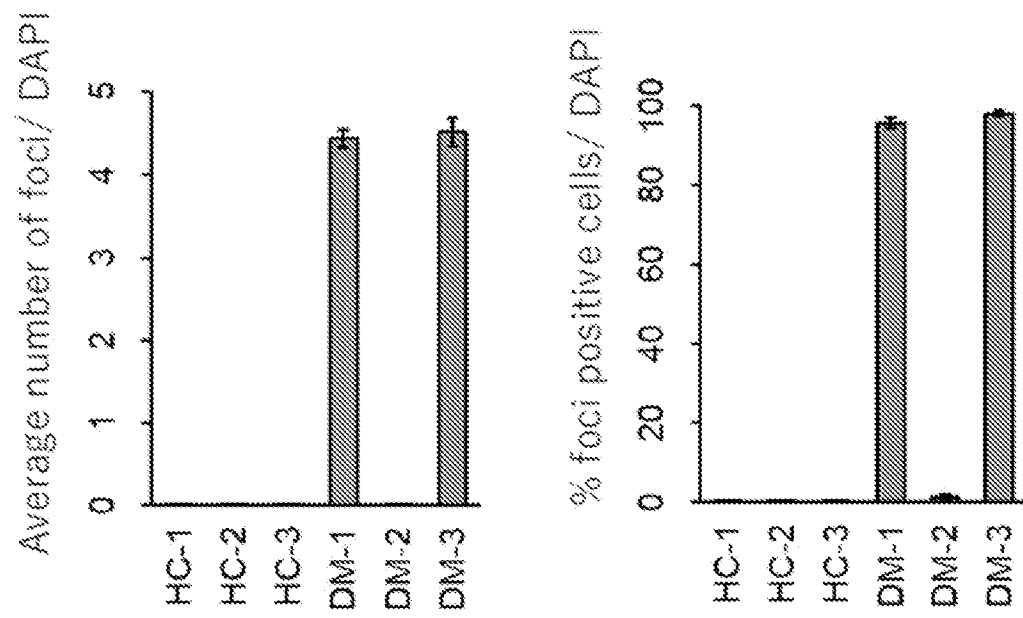
[図11C]



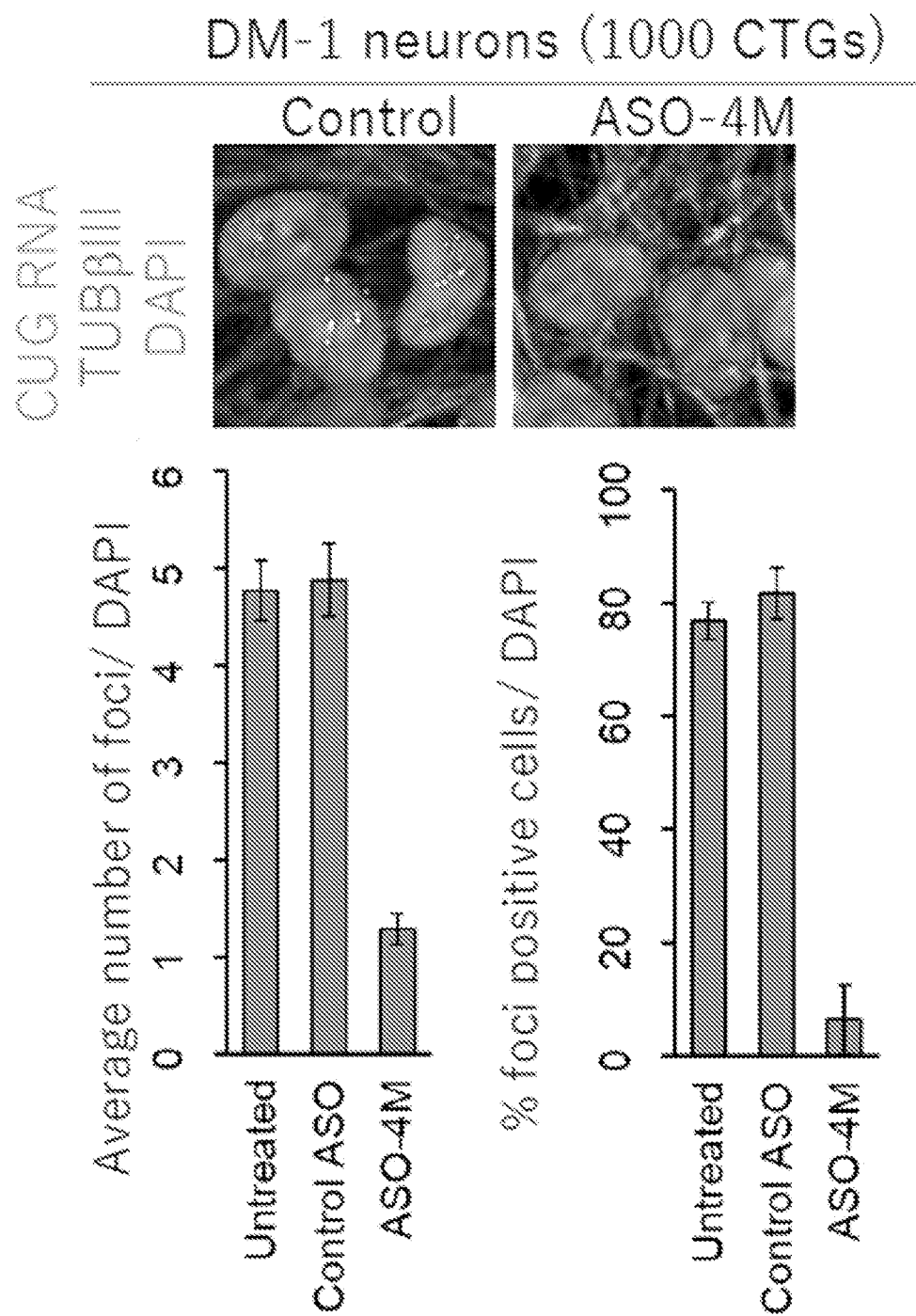
[図11D]



[Figure 11E]



[FIG. 11F]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/047754

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

**A61K 31/712**(2006.01)i; **A61K 31/7125**(2006.01)i; **A61K 48/00**(2006.01)i; **A61P 21/00**(2006.01)i; **C12N 15/113**(2010.01)i  
 FI: A61K31/712 ZNA; A61K31/7125; A61K48/00; A61P21/00; C12N15/113; C12N15/113 130Z

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/712; A61K31/7125; A61K48/00; A61P21/00; C12N15/113

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996  
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022  
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022  
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSISI (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                            | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | CHRISTOU, M. et al., Systemic Evaluation of Chimeric LNA/2'-O-Methyl Steric Blockers for Myotonic Dystrophy Type 1 Therapy, March 2020, vol. 30, no. 2, pp. 80-93<br>abstract, table 1, fig. 2                                                | 1-9, 12-16            |
| Y         | abstract, table 1, fig. 2                                                                                                                                                                                                                     | 5-16                  |
| Y         | MORITA, K. et al., 2'-O,4'-C-Ethylene-Bridged Nucleic Acids (ENA): Highly Nuclease-Resistant and Thermodynamically Stable Oligonucleotides for Antisense Drug, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002, vol. 12, pp. 73-76<br>abstract | 5-16                  |
| Y         | MATSUO, M. et al., A PH1/2 STUDY OF ENA ANTISENSE OF OLIGONUCLEOTIDE (DS-5141B) WITH EXON 45 SKIPPING ACTIVITY IN PATIENTS WITH DMD, Journal of Neuromuscular Diseases, 2018, vol. 5 Suppl. 1, S145-146, PS1Group1-052/#285<br>Background     | 5-16                  |
| A         | GAGNON, K.T. et al., Allele-Selective Inhibition of Mutant Huntingtin Expression with Antisense Oligonucleotides Targeting the Expanded CAG Repeat, Biochemistry, 2010, vol. 49, pp.1 0166-10178<br>entire text                               | 1-16                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**28 January 2022**

Date of mailing of the international search report

**22 February 2022**

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)  
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915  
 Japan**

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/JP2021/047754****C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | GONZALEZ-BARRIGA, A. et al., Design and Analysis of Effects of Triplet Repeat Oligonucleotides in Cell Models for Myotonic Dystrophy, Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2013, vol. 2, e81, pp. 1-12<br>entire text | 1-16                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/047754

**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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).
    - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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:

| <p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 31/712(2006.01)i; A61K 31/7125(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i;<br/>C12N 15/113(2010.01)i<br/>FI: A61K31/712 ZNA; A61K31/7125; A61K48/00; A61P21/00; C12N15/113; C12N15/113 130Z</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                              |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------|----------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------|---------------------------|------|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））<br/>A61K31/712; A61K31/7125; A61K48/00; A61P21/00; C12N15/113</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> <p>国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）<br/>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                              | 日本国実用新案公報       | 1922-1996年                        | 日本国公開実用新案公報    | 1971-2022年 | 日本国実用新案登録公報                                                                                                                                                                             | 1996-2022年 | 日本国登録実用新案公報 | 1994-2022年                |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
| 日本国実用新案公報                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1922-1996年                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                              |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
| 日本国公開実用新案公報                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1971-2022年                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                              |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
| 日本国実用新案登録公報                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1996-2022年                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                              |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
| 日本国登録実用新案公報                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1994-2022年                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                              |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
| <p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の<br/>カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する<br/>請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CHRISTOU, M. et al., Systemic Evaluation of Chimeric LNA/2'-O-Methyl Steric Blockers for Myotonic Dystrophy Type 1 Therapy, 2020.03, Vol.30, No.2, p.80-93<br/>Abstract, Table 1, Fig. 2</td> <td>1-9,12-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Abstract, Table 1, Fig. 2</td> <td>5-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>MORITA, K. et al., 2'-O,4'-C-Ethylene-Bridged Nucleic Acids (ENA): Highly Nuclease-Resistant and Thermodynamically Stable Oligonucleotides for Antisense Drug, Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters, 2002, Vol.12, p.73-76<br/>Abstract</td> <td>5-16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>MATSUO, M. et al., A PH1/2 STUDY OF ENA ANTISENSE OF OLIGONUCLEOTIDE (DS-5141B) WITH EXON 45 SKIPPING ACTIVITY IN PATIENTS WITH DMD, Journal of Neuromuscular Diseases, 2018, Vol.5 Suppl.1, S145-146, PS1Group1-052/#285<br/>Background</td> <td>5-16</td> </tr> </tbody> </table> |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                              | 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する<br>請求項の番号 | X          | CHRISTOU, M. et al., Systemic Evaluation of Chimeric LNA/2'-O-Methyl Steric Blockers for Myotonic Dystrophy Type 1 Therapy, 2020.03, Vol.30, No.2, p.80-93<br>Abstract, Table 1, Fig. 2 | 1-9,12-16  | Y           | Abstract, Table 1, Fig. 2 | 5-16 | Y | MORITA, K. et al., 2'-O,4'-C-Ethylene-Bridged Nucleic Acids (ENA): Highly Nuclease-Resistant and Thermodynamically Stable Oligonucleotides for Antisense Drug, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002, Vol.12, p.73-76<br>Abstract | 5-16 | Y | MATSUO, M. et al., A PH1/2 STUDY OF ENA ANTISENSE OF OLIGONUCLEOTIDE (DS-5141B) WITH EXON 45 SKIPPING ACTIVITY IN PATIENTS WITH DMD, Journal of Neuromuscular Diseases, 2018, Vol.5 Suppl.1, S145-146, PS1Group1-052/#285<br>Background | 5-16 |
| 引用文献の<br>カテゴリー*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                          | 関連する<br>請求項の番号                                                               |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | CHRISTOU, M. et al., Systemic Evaluation of Chimeric LNA/2'-O-Methyl Steric Blockers for Myotonic Dystrophy Type 1 Therapy, 2020.03, Vol.30, No.2, p.80-93<br>Abstract, Table 1, Fig. 2                                                    | 1-9,12-16                                                                    |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Abstract, Table 1, Fig. 2                                                                                                                                                                                                                  | 5-16                                                                         |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | MORITA, K. et al., 2'-O,4'-C-Ethylene-Bridged Nucleic Acids (ENA): Highly Nuclease-Resistant and Thermodynamically Stable Oligonucleotides for Antisense Drug, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2002, Vol.12, p.73-76<br>Abstract | 5-16                                                                         |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | MATSUO, M. et al., A PH1/2 STUDY OF ENA ANTISENSE OF OLIGONUCLEOTIDE (DS-5141B) WITH EXON 45 SKIPPING ACTIVITY IN PATIENTS WITH DMD, Journal of Neuromuscular Diseases, 2018, Vol.5 Suppl.1, S145-146, PS1Group1-052/#285<br>Background    | 5-16                                                                         |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                              |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
| <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                              |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
| <p>国際調査を完了した日</p> <p>28.01.2022</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                            | <p>国際調査報告の発送日</p> <p>22.02.2022</p>                                          |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |
| <p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP)<br/>〒100-8915<br/>日本国<br/>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                            | <p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>高橋 樹理 4U 4498</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p> |                 |                                   |                |            |                                                                                                                                                                                         |            |             |                           |      |   |                                                                                                                                                                                                                                            |      |   |                                                                                                                                                                                                                                         |      |

| C. 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                       |                |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                     | 関連する<br>請求項の番号 |
| A               | GAGNON, K.T. et al., Allele-Selective Inhibition of Mutant Huntingtin Expression with Antisense Oligonucleotides Targeting the Expanded CAG Repeat, Biochemistry, 2010, Vol.49, p.10166-10178<br>全文   | 1-16           |
| A               | GONZALEZ-BARRIGA, A. et al., Design and Analysis of Effects of Triplet Repeat Oligonucleotides in Cell Models for Myotonic Dystrophy, Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2013, Vol.2, e81, p.1-12<br>全文 | 1-16           |

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

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表  
    ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式  
    ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表  
    ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))  
    ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見: