

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-513932
(P2025-513932A)

(43)公表日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 Q	1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全53頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2025-504030(P2025-504030)			(71)出願人	524363858
(86)(22)出願日	令和5年3月30日(2023.3.30)				スティヒティング アムステルダム ユー
(85)翻訳文提出日	令和6年11月14日(2024.11.14)				エムシー
(86)国際出願番号	PCT/NL2023/050168				オランダ王国 1 0 8 1 H V アムステル
(87)国際公開番号	WO2023/191631				ダム デブーレラーン 1 1 1 7
(87)国際公開日	令和5年10月5日(2023.10.5)			(74)代理人	100095407
(31)優先権主張番号	22165710.9				弁理士 木村 満
(32)優先日	令和4年3月30日(2022.3.30)			(74)代理人	100132883
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)				弁理士 森川 泰司
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			(74)代理人	100148633
	最終頁に続く				弁理士 桜田 圭
				(74)代理人	100147924
					弁理士 美恵 英樹
				(72)発明者	ビント、イガルーマルティン
					オランダ王国 1 1 0 5 A Z アムステル
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 L M N A 変異キャリアのための治療における使用のためのアンチセンス核酸

(57)【要約】

本発明は、哺乳動物細胞における L M N A 遺伝子の発現を阻害することができる単離されたアンチセンス分子であって、当該アンチセンス分子が、 L M N A 遺伝子によってコードされる転写物の標的領域に実質的に相補的であるアンチセンス核酸鎖を含み、当該アンチセンス核酸鎖が、当該標的領域における S N P r s 5 3 8 0 8 9、r s 5 0 5 0 5 8、又は r s 4 6 4 1 に少なくとも相補的である、単離されたアンチセンス分子に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物細胞における LMNA 遺伝子の対立遺伝子特異的発現を阻害低減することができる単離されたアンチセンス分子であって、前記アンチセンス分子が、前記 LMNA 遺伝子によってコードされる転写物の標的領域に実質的に相補的であるアンチセンス核酸鎖を含み、前記アンチセンス核酸鎖が、前記標的領域における SNP rs538089、rs505058、又は rs4641 に少なくとも相補的である、単離されたアンチセンス分子。

【請求項 2】

二本鎖核酸 (dsNA) 若しくはその化学的に修飾されたバージョン、又はアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) から選択される、請求項 1 に記載の単離されたアンチセンス分子。

【請求項 3】

前記標的領域が、

GAUGACCUGCUCCAUCAACCACCAACGUGAGUGGUAGCCGC CGCUGA (配列番号 1)、

GAUGACCUGCUCCAUCAACCACCAUGUGAGUGGUAGCCGC CGCUGA (配列番号 2)、

GAUGACCUGCUCCAUCAACCACCAACGGCUC CCAACUGCAGC AGCUC (配列番号 3)、及び

GAUGACCUGCUCCAUCAACCACCAUGGGCUC CCAACUGCAGC AGCUC (配列番号 4)

又はそれと少なくとも 80% 相同である配列からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の単離されたアンチセンス分子。

【請求項 4】

前記アンチセンス核酸鎖が、配列番号 151、配列番号 152、配列番号 153、又は配列番号 154 に記載の核酸配列から選択される少なくとも 12 個のヌクレオチドの連続した鎖を有する核酸配列を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の単離されたアンチセンス分子。

【請求項 5】

前記アンチセンス核酸が、配列番号 71、配列番号 72、配列番号 73、及び配列番号 74 からなる群から選択される核酸配列を含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の単離されたアンチセンス分子。

【請求項 6】

配列番号 73 及び配列番号 74 に記載のアンチセンス核酸を含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の単離されたアンチセンス分子。

【請求項 7】

前記アンチセンス分子が、15～30ヌクレオチド長のセンス核酸鎖を含み、前記センス核酸鎖が、前記アンチセンス領域に相補的であり、前記センス核酸鎖及び前記アンチセンス核酸鎖が、二本鎖領域を形成する、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の単離されたアンチセンス分子。

【請求項 8】

アンチセンス鎖及びセンス鎖が、RNA ループ鎖によって作動可能に連結されて、二本鎖構造及びループ構造を含むヘアピン構造を形成する、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の単離されたアンチセンス分子。

【請求項 9】

請求項 1～8 のいずれか一項に記載の単離されたアンチセンス分子をコードする、核酸。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載のアンチセンス分子をコードする核酸を含む、発現

10

20

30

40

50

カセット。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載の発現カセットを含む、発現ベクター。

【請求項 1 2】

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の単離されたアンチセンス分子、請求項 9 に記載の核酸、請求項 1 0 に記載の発現カセット、又は請求項 1 1 に記載の発現ベクター、及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 1 3】

医学的治療における使用のための、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の単離されたアンチセンス分子、請求項 9 に記載の核酸、請求項 1 0 に記載の発現カセット、請求項 1 1 に記載の発現ベクター、又は請求項 1 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 4】

心不全の治療における使用のための、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の単離されたアンチセンス分子、請求項 9 に記載の核酸、請求項 1 0 に記載の発現カセット、請求項 1 1 に記載の発現ベクター、又は請求項 1 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 5】

遺伝子の変異体対立遺伝子に存在する常染色体優性変異によって引き起こされる疾患の医学的治療に適しているアンチセンス分子を選択するための方法であって、

遺伝子の変異体対立遺伝子に存在する常染色体優性変異によって引き起こされる疾患に罹患している対象の核酸試料を提供することと、

前記疾患に関連する前記遺伝子の前記変異体対立遺伝子のヘテロ接合性を決定することと、

前記遺伝子中のヘテロ接合性 S N P の存在を決定することと、

前記遺伝子の前記変異体対立遺伝子の転写物にヘテロ接合性 S N P を含む標的領域の核酸配列を決定することと、

前記標的領域に相補的である単離されたアンチセンス分子を選択することと、を含む、方法。

【請求項 1 6】

細胞における変異体 L M N A 対立遺伝子の発現を阻害低減するためのインビトロ方法であって、

前記細胞に、L M N A 変異体対立遺伝子を発現する細胞での接触導入時に、前記 L M N A 変異体対立遺伝子の発現を阻害低減する、本発明のアンチセンス分子を導入するステップと、

ステップ (a) において産生される細胞を、前記 L M N A 変異体対立遺伝子の m R N A 転写物の分解を得るのに十分な時間にわたって維持し、それによって前記細胞における前記 L M N A 変異体対立遺伝子の発現を阻害低減するステップと、を含む、インビトロ方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、心臓疾患の治療に好適なアンチセンス分子に関する。より具体的には、本発明は、心臓ラミノパシー、特に拡張型心筋症の治療における使用に好適な s i R N A 及び s h R N A に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

心不全のために現在使用される療法は、心不全のほとんどの形態について症状及び生存を改善することに成功している。しかしながら、少数の患者において、これらのエビデンスベースの治療は、疾患の進行を停止せず、これは、これらの患者に治療抵抗性心不全を残す。皮肉なことに、これはほとんどの場合、ラミン A / C (L M N A) 遺伝子における変異によって引き起こされる心不全を有する患者を含む、心不全の遺伝性形態を有する若

10

20

30

40

50

い患者に関与する。

【0003】

現在、450超のLMNA変異が報告されており、拡張型心筋症を含む広範囲の疾患（ラミノパシー）につながっている。

【0004】

本発明の目的は、LMNA遺伝子における変異によって引き起こされる遺伝性形態の心不全に対する治療を提供することである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、哺乳動物細胞におけるLMNA遺伝子の対立遺伝子の発現を低減又は阻害することができる単離されたアンチセンス分子であって、当該アンチセンス分子が、LMNA遺伝子によってコードされる転写物の標的領域に実質的に相補的であるアンチセンス核酸鎖を含み、当該アンチセンス核酸鎖が、当該標的領域におけるSNP rs538089、rs505058、又はrs4641に少なくとも相補的である、単離されたアンチセンス分子を提供する。

【0006】

好ましくは、当該アンチセンス分子は、変異体LMNA対立遺伝子の発現を低減することができる。最も好ましい実施形態では、当該アンチセンス分子は、変異されていないLMNA対立遺伝子を低減されないままにしながら、変異体LMNA対立遺伝子の発現を低減することができる。

【0007】

好ましくは、当該単離されたアンチセンス分子は、

- a. 二本鎖核酸（dsNA）若しくはその化学的に修飾されたバージョン、又は
- b. アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）から選択される。

【0008】

好ましくは、当該dsNAは、RNA、より好ましくは、ショートヘアピン（shRNA）又は小干渉RNA（siRNA）である。好ましくは、当該dsNAは、dsRNAである。

【0009】

本発明による好ましい単離されたアンチセンス分子は、15～30ヌクレオチド長のアンチセンス核酸鎖を含む。好ましくは、当該アンチセンス核酸鎖は、当該標的領域における少なくとも7個、より好ましくは8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、又は21個のヌクレオチドに相補的である。いくつかの実施形態では、アンチセンス分子が変異体LMNA対立遺伝子に特異的に結合することを条件に、アンチセンス核酸鎖と標的領域との間に1つ又は2つのミスマッチが存在し得る。好ましくは、当該アンチセンス核酸鎖は、少なくとも7個、より好ましくは8、9、10、11、又は12個の連続したヌクレオチドに相補的である。好ましくは、当該標的領域は、当該標的領域に少なくとも15、16、17、18、又は19個のヌクレオチドを含む。

【0010】

当該単離されたアンチセンス分子の好ましい実施形態では、当該標的領域は、

- i. GAUGACCUGCUCCAUCACCAACCAACGUGAGUGGGUAGCCGCCGCUGA（配列番号1）、
- ii. GAUGACCUGCUCCAUCACCAACCAUGUGAGUGGGUAGCCGCCGCUGA（配列番号2）、
- iii. GAUGACCUGCUCCAUCACCAACCAACGGCUCGCCACUGCAGCAGCUC（配列番号3）、及び
- iv. GAUGACCUGCUCCAUCACCAACCAUGGCUCGCCACUGCAGCAGCUC（配列番号4）

又はそれと少なくとも 80% 相同である核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含む。より好ましくは、それと少なくとも 81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99% が相同である。

【0011】

別の好ましい実施形態では、当該標的領域は、

i. CCUGCUCCAUCACCAACCAACGUGAGUGGUAGCCGCCGC
(配列番号 5)、

ii. CCUGCUCCAUCACCAACCAUGUGAGUGGUAGCCGCCGC
(配列番号 6)、

iii. CCUGCUCCAUCACCAACCAACGGCUCGCCACUGCAGCAGC
(配列番号 7)、及び

iv. CCUGCUCCAUCACCAACCAUGGGCUCGCCACUGCAGCAGC
(配列番号 8)

又はそれと少なくとも 80% 相同である核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含む。より好ましくは、それと少なくとも 81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99% が相同である。

【0012】

本発明による単離されたアンチセンス分子の好ましい実施形態では、当該アンチセンス核酸鎖は、配列番号 151、配列番号 152、配列番号 153、又は配列番号 154 に記載の核酸配列から選択される少なくとも 12、13、14、15、16、17、18、又は 19 個のヌクレオチドの連続した鎖を有する核酸配列を含む。好ましくは、当該アンチセンス核酸鎖は、表 1 に定義されるアンチセンス鎖又はその核酸アナログ配列を含む。好ましくは、当該アンチセンス核酸鎖は、表 1 に定義されるセンス鎖又はその核酸アナログ配列を更に含む。好ましくは、当該単離されたアンチセンスは、配列番号 71、配列番号 72、配列番号 73、及び配列番号 74 からなる群から選択される核酸配列を含む。

【0013】

当該単離された dsNA の好ましい実施形態では、dsNA は、15~30 ヌクレオチド長のセンス核酸鎖を含み、センス核酸鎖は、当該アンチセンス核酸鎖に相補的であり、センス核酸鎖及びアンチセンス核酸鎖は、二本鎖領域を形成する。

【0014】

好ましくは、アンチセンス鎖及びセンス鎖は、ループ鎖によって作動可能に連結されて、二本鎖構造及びループ構造を含むヘアピン構造を形成する。ループ構造は、4、5、又は 6 個のヌクレオチドなどの、4~13 個のヌクレオチドを含有し得る。好ましくは、当該ループは、配列 UCAAGAC を含有する。

【0015】

当該単離された二本鎖核酸 (dsNA) 又はアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) の好ましい実施形態では、当該アンチセンス核酸鎖は、好ましくは、15~30 ヌクレオチド長である。好ましくは、当該 dsNA は、5' 末端及び 3' 末端を有する 15~30 ヌクレオチド、好ましくは 19 ヌクレオチド長の RNA の単離されたアンチセンス鎖であって、アンチセンス鎖が、好ましくは当該標的領域の少なくとも 15 個のヌクレオチドに相補的であり、好ましくは、RNA のセンス鎖の 5' 末端が、G ヌクレオチドに作動可能に連結されて、RNA の第 1 のセグメントを形成する、単離されたアンチセンス鎖、並びに 5' 末端及び 3' 末端を有する 15~30 ヌクレオチド長の RNA の単離されたアンチセンス鎖であって、好ましくはアンチセンス及びセンス鎖の少なくとも 12 個のヌクレオチドが、互いに相補的であり、好ましくは、生理学的条件下で、小干渉 RNA (siRNA) 二本鎖を形成する、単離されたアンチセンス鎖を含有する shRNA である。好ましくは、当該 siRNA は、細胞における LMNA 遺伝子の 1 つの対立遺伝子のみをサイレンシングする。RNA の 2 つの鎖によって形成される二本鎖は、15~25 塩基対長、好ま

10

20

30

40

50

しくは19塩基対長であり得る。アンチセンス鎖は、好ましくは、19ヌクレオチド長である。センス鎖は、好ましくは、19ヌクレオチド長である。

【0016】

本発明では、RNAのセンス及びアンチセンス鎖は、ヘアピン構造を形成して「二本鎖構造」及び「ループ構造」を形成するために、RNAループ鎖によって一緒に作動可能に連結され得る。これらのループ構造は、4～13、より好ましくは4～10ヌクレオチドのヌクレオチド長であり得る。例えば、ループ構造は、4、5、又は6ヌクレオチド長であり得る。shRNAは、オーバーハング領域を更に含有し得る。そのようなオーバーハングは、3'オーバーハング領域又は5'オーバーハング領域であり得る。オーバーハング領域は、例えば、1～6ヌクレオチド長であり得る。好ましい実施形態では、5'オーバーハングは、核酸配列CCGGを有する。好ましい実施形態では、3'オーバーハングは、核酸配列Gを有する。

10

【0017】

本発明は、本発明の単離された二本鎖核酸又はASOをコードする核酸を更に提供する。好ましい実施形態では、shRNAなどの本発明の当該アンチセンスRNAは、以下の構造を有するオリゴヌクレオチドによってコードされる：5'-CCGGAA-19bpセンス鎖-TCAAGAC-19bpアンチセンス鎖-TTTTTTTT-3'、及びリバース5'-AAATTCAAAAA-19bpセンス鎖-GTCTTGA-19bpアンチセンス鎖-TT-3'。本明細書において、センス鎖は、まさにmRNAにおける標的化された配列であり、アンチセンス鎖は、最終的にmRNAに結合し、その分解及び／又は阻害を誘導するその逆相補配列である。

20

【0018】

本発明はまた、本発明による当該アンチセンス核酸鎖をコードする核酸を含む発現カセットを提供する。好ましい実施形態では、本発明の当該アンチセンス核酸鎖をコードする当該核酸は、配列番号75～150のいずれかによる核酸配列を含む。

【0019】

これらの発現カセットは、プロモーターを更に含有し得る。そのようなプロモーターは、調節可能なプロモーター又は構成的プロモーターであり得る。好適なプロモーターの例としては、CMV、RSV、pol II、又はpol IIIプロモーターが挙げられる。発現カセットは、合成最小ポリアデニル化シグナルなどの、ポリアデニル化シグナルを更に含有し得る。発現カセットは、マーカー遺伝子を更に含有し得る。一実施形態では、当該発現カセットは、本発明による当該アンチセンス核酸鎖をコードする2つの核酸を含み、第1の核酸は、ラミンAアイソフォームを低減するアンチセンス鎖をコードし、第2の核酸は、ラミンCアイソフォームを低減することができるアンチセンス鎖をコードする。アンチセンス核酸鎖の発現は、好ましくは、アンチセンス核酸鎖のうちの1つのみが標的細胞において発現するか、又は発現することができるよう調節可能である。

30

【0020】

本発明は、上述の発現カセットを含有するベクターを提供する。更に、ベクターは、2つの発現カセット、RNA二本鎖のアンチセンス鎖をコードする核酸を含有する第1の発現カセット、及びRNA二本鎖のセンス鎖をコードする核酸を含有する第2の発現カセットを含有し得る。適切なベクターの例としては、アデノウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ポリオウイルス、HSV、又はマウスマロニーベースのウイルスベクターが挙げられる。好ましい実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクターである。別の好ましい実施形態では、ベクターは、AAVである。好ましくは、当該発現カセットは、上述のようなASO又はdsNAのいずれかをコードする。

40

【0021】

本発明は、本発明による発現カセットを含有する細胞を更に提供する。好ましくは、当該細胞は、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞である。好ましくは、当該細胞は、心臓細胞であり、好ましくはヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞(hiPSC-CM)である。

【0022】

50

本発明は、本発明のアンチセンス分子及び薬学的に許容される担体を含む、生物における LMNA 遺伝子の発現を低減するための薬学的組成物を更に提供する。

【0023】

本発明は、医学的治療における使用のための本発明による単離されたアンチセンス分子を更に提供する。

【0024】

本発明は、本発明による単離されたアンチセンス分子、本発明の単離されたアンチセンス分子をコードする核酸、本発明の発現カセット、又は本発明の発現ベクター、心不全の治療における使用のための本発明による薬学的組成物を更に提供する。好ましくは、当該治療は、ラミノパシー、好ましくは拡張型心筋症の治療である。

10

【0025】

本発明は、遺伝子の変異体対立遺伝子上に存在する常染色体優性変異によって引き起こされる疾患の医学的治療に適しているアンチセンス分子を選択するための方法であって、

a. 遺伝子の変異体対立遺伝子上に存在する常染色体優性変異によって引き起こされる疾患に罹患している対象の核酸試料を提供することと、

b. 当該疾患に関与する当該遺伝子の変異体対立遺伝子のヘテロ接合性を決定することと、

c. 遺伝子中のヘテロ接合性 SNP の存在を決定することと、

d. 当該遺伝子の変異体対立遺伝子のヘテロ接合性 SNP を含む標的領域の核酸配列を決定することと、

20

e. 当該標的核酸鎖に相補的である単離されたアンチセンス分子を選択することと、を含む、方法を更に提供する。

【0026】

好ましい実施形態では、当該アンチセンス分子は、本明細書に記載の通りである。好ましくは、当該遺伝子は、LMNA 遺伝子である。好ましくは、当該 SNP は、rs538089、rs505058、及び rs4641 から選択される。

【0027】

当該疾患は、心不全、具体的には、拡張型心筋症などのラミノパシーである。

【0028】

本発明は、細胞における変異体 LMNA 対立遺伝子の発現を低減するためのインビトロ方法であって、以下：

30

(a) 細胞に、LMNA 変異体対立遺伝子を発現する細胞への導入後、LMNA 変異体対立遺伝子の発現を低減する、本発明のアンチセンス分子を導入するステップと、

(b) ステップ (a) において産生される細胞を、LMNA 変異体対立遺伝子の mRNA 転写物の分解を得るのに十分な時間にわたって維持し、それによって細胞における LMNA 変異体対立遺伝子の発現を低減するステップと、を含む、方法を更に提供する。好ましくは、LMNA 変異体遺伝子の当該発現は、少なくとも 20% である。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】設計及び試験された siRNA の概要を示す。黒色の輪郭の長方形は、ラミン A 及びラミン C アイソフォーム間の共通の共有エクソン 10 を示す。SNP rs4641 (ヌクレオチドは太字、Cヌクレオチド=C対立遺伝子、Tヌクレオチド=T対立遺伝子)の後、ラミン C はエクソン 10B (灰色のハッチングされた長方形)に続き、ラミン A はエクソン 11 (灰色の塗りつぶされた長方形)及びエクソン 12 (図示せず)に続く。shRNA は、各特異的アイソフォームについて、C対立遺伝子又はT対立遺伝子のいずれかを標的とするように設計された。

40

【図2】LMNA H222P hiPSC-CMにおけるラミンCを標的とする shRNA の結果の概要を示す。図2Aは、ラミンCにおける rs4641 のC対立遺伝子を標的とする shRNA での処理後のC対立遺伝子、T対立遺伝子、及び総ラミンAの相対発現を示す。図2Bは、ラミンCにおける rs4641 のC対立遺伝子を標的とする shR

50

NAでの処理後のC対立遺伝子、T対立遺伝子、及び総ラミンCの相対発現を示す。図2Cは、ラミンCにおけるrs4641のT対立遺伝子を標的とするshRNAでの処理後のC対立遺伝子、T対立遺伝子、及び総ラミンAの相対発現を示す。図2Dは、ラミンCにおけるrs4641のT対立遺伝子を標的とするshRNAでの処理後のC対立遺伝子、T対立遺伝子、及び総ラミンCの相対発現を示す。バーは平均値を提示し、エラーバーはSEMを提示する。3～4つの実験においてN=4～12。

【図3】LMNA H222P及び健常hiPSC-CMにおけるラミンAにおけるrs4641のC対立遺伝子を標的とするshRNAの結果の概要を示す。図3Aは、LMNA H222P hiPSC-CMにおけるラミンAにおけるrs4641のC対立遺伝子を標的とするshRNAでの治療後のC対立遺伝子、T対立遺伝子、及び総ラミンAの相対発現を示す。図3Bは、LMNA H222P hiPSC-CMにおけるラミンAにおけるrs4641のC対立遺伝子を標的とするshRNAでの治療後のC対立遺伝子、T対立遺伝子、及び総ラミンCの相対発現を示す。図3Cは、健常hiPSC-CMにおけるラミンAにおけるrs4641のC対立遺伝子を標的とするshRNAでの治療後のC対立遺伝子、T対立遺伝子、及び総ラミンAの相対発現を示す。図3Dは、健常hiPSC-CMにおけるラミンAにおけるrs4641のC対立遺伝子を標的とするshRNAでの治療後のC対立遺伝子、T対立遺伝子、及び総ラミンCの相対発現を示す。バーは平均を表し、エラーバーはSEMを表す。2～3つの実験においてN=4～9。

【図4】LMNA H222P及び健常hiPSC-CMにおけるラミンAにおけるrs4641のT対立遺伝子を標的とするshRNAの結果の概要を示す。図4Aは、LMNA H222P hiPSC-CMにおけるラミンAにおけるrs4641のT対立遺伝子を標的とするshRNAでの治療後のC対立遺伝子、T対立遺伝子、及び総ラミンAの相対発現を示す。図4Bは、LMNA H222P hiPSC-CMにおけるラミンAにおけるrs4641のT対立遺伝子を標的とするshRNAでの治療後のC対立遺伝子、T対立遺伝子、及び総ラミンCの相対発現を示す。図4Cは、健常hiPSC-CMにおけるラミンAにおけるrs4641のT対立遺伝子を標的とするshRNAでの治療後のC対立遺伝子、T対立遺伝子、及び総ラミンAの相対発現を示す。図4Dは、健常hiPSC-CMにおけるラミンAにおけるrs4641のT対立遺伝子を標的とするshRNAでの治療後のC対立遺伝子、T対立遺伝子、及び総ラミンCの相対発現を示す。バーは平均を表し、エラーバーはSEMを表す。2～3つの実験においてN=5～9。

【図5】LMNA H222P hiPSC-CMにおけるshRNA T17によってrs4641のT対立遺伝子を標的とすることによる変異体LMNA対立遺伝子の下方調節後の核円形度の改善を示す。陰性対照shRNA (NC)、rs4641のC対立遺伝子を標的とすることによって野生型LMNA対立遺伝子を下方調節する対立遺伝子特異的shRNA C17 (C17)、及びrs4641のT対立遺伝子を標的とすることによって変異体LMNA対立遺伝子を下方調節する対立遺伝子特異的shRNA T17 (T17)でのH222P hiPSC-CMの処理。3つの異なる分化からのN=305～364。黒色のバーは平均を示し、***=p<0.001。

【図6】標的化siRNAの概略図である。LMNA遺伝子は、2つのmRNAスプライスアイソフォーム、LMNA及びLMNCをコードする。SNP rs4641 (太字で示される)は、エクソン10の中央における両方のアイソフォームによって共有される最後のヌクレオチドであり、その後、LMNCはスプライスせず、エクソン10で終了し、LMNAはrs4641の直後にエクソン11にスプライスする。スプライシングのために、LMNA (siRNAの下パネル)及びLMNC (siRNAの上パネル)特異的siRNAを設計する必要がある、対立遺伝子特異性について試験するその配列が図に示される。siRNA配列は、3'から5'まで記載されるが、全ての他の配列は、5'から3'まで記載されることに留意されたい。

【図7】shRNA設計及び活性siRNAへのその変換である。ウイルスによってコードされるshRNAは、中央に非相補配列を有する2つの相補配列 (灰色の網掛け) からなる。これらの配列は、ウイルスから転写されるとき、相補部分が結合し、非相補部分が

10

20

30

40

50

ループを形成する、ヘアピン様構造を形成する。このループは、酵素 *Dicer* によって除去されて、*siRNA* 二本鎖を形成する。この二本鎖のうち、いわゆるガイド又はアンチセンス鎖（濃灰色の網掛け）は、*RNA* 誘導サイレンシング複合体に組み込まれ、標的化 *mRNA* に結合して分解する一方で、*siRNA* 二本鎖の他のパッセンジャー又はセンス鎖は分解される。

【図 8-1】それぞれ *LMNA* 及び *LMNC* スプライスアイソフォームの対立遺伝子特異的発現に対する *LMNA* の *C* 対立遺伝子を標的とする *shRNA* の効果である。SCR 陰性対照条件における発現と比較して、それぞれ *LMNA* 及び *LMNC* の野生型 (*C*) 対立遺伝子及び変異体 (*T*) 対立遺伝子の *A & C* 対立遺伝子特異的発現、並びに総 *LMNA* 発現レベルに対する効果。B & D は、2 つの対立遺伝子の発現間の均衡を視覚化するために、それぞれ *LMNA* 及び *LMNC* の変異体 (*T*) 及び野生型対立遺伝子 (*C*) の発現のパーセンテージを示す。

10

【図 8-2】図 8-1 の説明を参照。

【図 9】*LMNA* スプライスアイソフォームを標的とする *shRNA-C17* 及び *shRNA-T17* におけるミスマッチの概略図である。それぞれの余分なミスマッチ（太字下線で示される）を有する元の配列及び *shRNA* が図に示される。*siRNA* 配列は、3' から 5' まで記載されるが、全ての他の配列は、5' から 3' まで記載されることに留意されたい。

【図 10-1】*LMNA* の *C* 対立遺伝子を標的とする *shC17* における追加のミスマッチの効果である。*A & C* : SCR 陰性対照条件における発現と比較して、それぞれ *LMNA* 及び *LMNC* の野生型 (*C*) 対立遺伝子及び変異体 (*T*) 対立遺伝子の対立遺伝子特異的発現、並びに総 *LMNA* / *C* 発現レベルに対する効果。B & D は、それぞれ、*LMNA* 及び *LMNC* の変異体 (*T*) 及び野生型対立遺伝子 (*C*) の発現のパーセンテージを示す。

20

【図 10-2】図 10-1 の説明を参照。

【図 11-1】それぞれ *LMNA* 及び *LMNC* スプライスアイソフォームの対立遺伝子特異的発現に対する *LMNA* の *T* 対立遺伝子を標的とする *shRNA* の効果である。SCR 陰性対照条件における発現と比較して、それぞれ *LMNA* 及び *LMNC* の野生型 (*C*) 対立遺伝子及び変異体 (*T*) 対立遺伝子の *A & C* 対立遺伝子特異的発現、並びに総 *LMNA* 発現レベルに対する効果。B & D は、2 つの対立遺伝子の発現間の均衡を視覚化するために、それぞれ *LMNA* 及び *LMNC* の変異体 (*T*) 及び野生型対立遺伝子 (*C*) の発現のパーセンテージを示す。

30

【図 11-2】図 11-1 の説明を参照。

【図 12-1】*LMNA* の *T* 対立遺伝子を標的とする *shT17* における追加のミスマッチの効果である。SCR 陰性対照条件における発現と比較して、それぞれ *LMNA* 及び *LMNC* の野生型 (*C*) 対立遺伝子及び変異体 (*T*) 対立遺伝子の *A & C* 対立遺伝子特異的発現、並びに総 *LMNA* / *C* 発現レベルに対する効果。B & D は、2 つの対立遺伝子の発現間の均衡を視覚化するために、それぞれ *LMNA* 及び *LMNC* の変異体 (*T*) 及び野生型対立遺伝子 (*C*) の発現のパーセンテージを示す。

【図 12-2】図 12-1 の説明を参照。

40

【図 13-1】それぞれ *LMNC* 及び *LMNA* スプライスアイソフォームの対立遺伝子特異的発現に対する *LMNC* の *C* 対立遺伝子を標的とする *shRNA* の効果である。SCR 陰性対照条件における発現と比較して、それぞれ *LMNC* 及び *LMNA* の野生型 (*C*) 対立遺伝子及び変異体 (*T*) 対立遺伝子の *A & C* 対立遺伝子特異的発現、並びに総 *LMNA* / *C* 発現レベルに対する効果。B & D は、2 つの対立遺伝子の発現間の均衡を視覚化するために、それぞれ *LMNC* 及び *LMNA* の変異体 (*T*) 及び野生型対立遺伝子 (*C*) の発現のパーセンテージを示す。

【図 13-2】図 13-1 の説明を参照。

【図 14】*LMNC* スプライスアイソフォームを標的とする *shRNA-C11*、*shRNA-C13*、及び *shRNA-T14* におけるミスマッチの概略図である。それぞれの

50

余分なミスマッチ（太字下線で示される）を有する元の配列及び s h R N A が図に示される。s i R N A 配列は、3' から 5' まで記載されるが、全ての他の配列は、5' から 3' まで記載されることに留意されたい。

【図 15-1】LMNC の C 対立遺伝子を標的とする s h C 1 1 における追加のミスマッチの効果である。S C R 陰性対照条件における発現と比較して、それぞれ、LMNC 及び LMNA の野生型 (C) 対立遺伝子及び変異体 (T) 対立遺伝子の A & C 対立遺伝子特異的発現、並びに総 LMNA / C 発現レベルに対する効果。B & D は、2つの対立遺伝子の発現間の均衡を視覚化するために、それぞれ、LMNC 及び LMNA の変異体 (T) 及び野生型対立遺伝子 (C) の発現のパーセンテージを示す。

【図 15-2】図 15-1 の説明を参照。

10

【図 16-1】LMNC の C 対立遺伝子を標的とする s h C 1 3 における追加のミスマッチの効果である。S C R 陰性対照条件における発現と比較して、それぞれ、LMNC 及び LMNA の野生型 (C) 対立遺伝子及び変異体 (T) 対立遺伝子の A & C 対立遺伝子特異的発現、並びに総 LMNA / C 発現レベルに対する効果。B & D は、2つの対立遺伝子の発現間の均衡を視覚化するために、それぞれ、LMNC 及び LMNA の変異体 (T) 及び野生型対立遺伝子 (C) の発現のパーセンテージを示す。

【図 16-2】図 16-1 の説明を参照。

【図 17-1】それぞれ LMNC 及び LMNA スプライスアイソフォームの対立遺伝子特異的発現に対する LMNC の T 対立遺伝子を標的とする s h R N A の効果である。S C R 陰性対照条件における発現と比較して、それぞれ、LMNC 及び LMNA の野生型 (C) 対立遺伝子及び変異体 (T) 対立遺伝子の A & C 対立遺伝子特異的発現、並びに総 LMNA / C 発現レベルに対する効果。B & D は、2つの対立遺伝子の発現間の均衡を視覚化するために、それぞれ、LMNC 及び LMNA の変異体 (T) 及び野生型対立遺伝子 (C) の発現のパーセンテージを示す。

20

【図 17-2】図 17-1 の説明を参照。

【図 18-1】LMNC の T 対立遺伝子を標的とする s h T 1 4 における追加のミスマッチの効果である。S C R 陰性対照条件における発現と比較して、それぞれ、LMNC 及び LMNA の野生型 (C) 対立遺伝子及び変異体 (T) 対立遺伝子の A & C 対立遺伝子特異的発現、並びに総 LMNA / C 発現レベルに対する効果。B & D は、2つの対立遺伝子の発現間の均衡を視覚化するために、それぞれ、LMNC 及び LMNA の変異体 (T) 及び野生型対立遺伝子 (C) の発現のパーセンテージを示す。

30

【図 18-2】図 18-1 の説明を参照。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明は、小干渉 RNA (s i R N A) の発現を通じた LMNA 遺伝子の対立遺伝子特異的サイレンシングの驚くべき発見に基づく。本発明者らは、一塩基多型 r s 4 6 4 1 を含有する遺伝子の領域を標的とすることによって、この遺伝子の特定の対立遺伝子の発現を著しく減少させた。本発明者らは、健常対照及び LMNA H 2 2 2 P ヒト人工多能性幹細胞 (h i P S C) 株に由来するゲノム DNA を使用することによって、r s 4 6 4 1 を含有する P C R アンプを配列決定し、両方の h i P S C 株が S N P r s 4 6 4 1 (C / T) のヘテロ接合性キャリアであり、他のバリエーションを担持しないことを見出した。

40

【0031】

S N P r s 4 6 4 1 は、LMNA に由来する 2 つの m R N A アイソフォーム、すなわち、ラミン A 及びラミン C の最後の共有ヌクレオチドである。両方のアイソフォームは、最初の 566 個のアミノ酸を共有するが、選択的スプライシングのために、エクソン 10 後で異なる。ラミン A は、エクソン 11 及び 12 に続き、ラミン C は、エクソン 10 B に続く。S N P r s 4 6 4 1 は、両方のアイソフォームの最後の共有ヌクレオチドであるため、本発明者らは、アイソフォーム特異的 s i R N A を設計した。更に、LMNA 変異、すなわち、疾患を引き起こす変異は、S N P の両方の対立遺伝子 (C 又は T 対立遺伝子) 上に位置することができ、本発明者らが両方のラミン A 及びラミン C アイソフォーム上

50

の両方のSNP対立遺伝子についてsiRNAを設計したことを意味する。

【0032】

本発明者らは、上記の領域を標的とするshRNAによるLMNAの変異体対立遺伝子の下方調節後の核円形度の改善を示し、これはこのサイレンシングが有効であることを実証する。

【0033】

本発明の1つの目標は、変異体対立遺伝子が抑制される治療を提供することである。変異体対立遺伝子と野生型(=健常)対立遺伝子との間を区別するために、本発明者らは、LMNAにおける共通バリエーション(SNP rs4641)を使用する。したがって、どの対立遺伝子が抑制される必要があるかを決定するためには、どの対立遺伝子上に変異が位置するかを決定する必要がある。例えば、ある特定の変異がSNP T対立遺伝子上に位置する(すなわち、変異及びSNP Tがシスである)場合、SNP T対立遺伝子は、抑制される必要がある。しかしながら、変異がSNP C対立遺伝子上に位置する(すなわち、変異及びSNP Cがシスである)場合、SNP C対立遺伝子は、抑制される必要がある。本発明者らは、ラミノパシーを引き起こす特異的変異とは無関係に変異体対立遺伝子を抑制するため、本発明の単離されたアンチセンス分子は、LMNA遺伝子における全ての変異について機能する。

【0034】

本発明者らは、LMNA H2222P変異を保有する細胞株を使用した。H2222P変異は、rs4641 T対立遺伝子上に位置する。したがって、rs4641 C対立遺伝子を抑制することによって、それらは潜在的に疾患を悪化させるであろうが(野生型が健常対立遺伝子であるため)、rs4641 T対立遺伝子を抑制することによって、それらは潜在的に疾患を軽減するであろう(変異体対立遺伝子を抑制する)。

【0035】

I. 定義

「アンチセンス分子」という用語は、mRNA、ウイルスRNA、又は他のRNA種などの、標的RNA分子に対する配列相補性を含有し、配列特異的結合後にそれらの標的RNAの機能を低減するオリゴヌクレオチド分子を指す。アンチセンス分子の例は、アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)、siRNA、shRNA、干渉RNA分子、及びアンチセンスオリゴマーという用語によって提供され、これらの用語は、本明細書において以下で交換可能に使用され得る。

【0036】

「核酸」という用語は、糖、リン酸塩、及びプリン又はピリミジンのいずれかである塩基を含有するモノマー(ヌクレオチド)で構成される、一本鎖又は二本鎖のいずれかの形態のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド及びそのポリマーを指す。特に限定されない限り、用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、自然発生ヌクレオチドと同様の方法で代謝される天然ヌクレオチドの既知のアナログを含有する核酸を包含する。別段の指示がない限り、特定の核酸配列はまた、その保存的に修飾されたバリエーション(例えば、縮重コドン置換)及び相補配列、並びに明示的に示された配列を包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択された(又は全ての)コドンの第3位が混合塩基及び/又はデオキシイノシン残基で置換される配列を生成することによって達成され得る(Batzner et al., (1991) Nucleic Acids Research 19:5081, Ohtsuka et al., (1985) J Biol Chem 260:2605-2608, Rossolini et al., (1994) Mol Cell Probes 8:91-98)。

【0037】

「核酸断片」は、所与の核酸分子の一部である。

【0038】

「ヌクレオチド配列」という用語は、DNA又はRNAポリマーへの組み込みができる合成、非天然、又は改変ヌクレオチド塩基を任意選択で含有する、一本鎖又は二本鎖であ

10

20

30

40

50

り得るDNA又はRNAのポリマーを指す。

【0039】

「核酸」、「核酸分子」、「核酸断片」、「核酸配列若しくはセグメント」、又は「ポリヌクレオチド」という用語は、交換可能に使用され、遺伝子、cDNA、遺伝子によってコードされるDNA及びRNAと交換可能に使用され得る。

【0040】

「核酸アナログ」という用語は、自然発生RNA及びDNAに類似（構造的に類似）する化合物を指す。例えば、RNAは、DNAの自然発生核酸アナログである。核酸は、3つの部分で構成されるヌクレオチドの鎖である：リン酸塩骨格、ペントース糖、リボース又はデオキシリボースのいずれか、及び4つの核酸塩基のうちの1つ。アナログは、これらの改変されたもののうちのいずれかを有し得る。典型的には、アナログ核酸塩基は、とりわけ、異なる塩基対合及び塩基スタッキング特性を付与する。例としては、全ての4つのカノニカル塩基と対合することができるユニバーサル塩基、及びPNAなどのリン酸塩-糖骨格アナログが挙げられる。人工核酸としては、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ及びロックド核酸（LNA）、並びにグリコール核酸（GNA）、トレオース核酸（TNA）、及びヘキシトール核酸（HNA）が挙げられる。これらの各々は、分子の骨格の変化によって自然発生DNA又はRNAと区別される。

【0041】

「ある特定の配列番号の核酸配列の核酸アナログ配列」という用語は、当該配列番号に類似する核酸配列を指す。例えば、配列番号83は、DNA配列ccggaaatcaccaccacgtg agtggtcag acccactcac gtgggtgtga ttttttttttgを指す。そのRNAアナログ核酸は、ウラシルについて交換されたチミジンを含む。配列番号83の核酸配列の核酸アナログ配列の別の例は、同じ塩基を含むPNA核酸配列である。

【0042】

「核酸の化学修飾バージョン」という用語は、その相補鎖への当該核酸の結合を悪化させない、核酸における1つ以上のヌクレオチドの化学修飾を指す。多くの既知の化学修飾の長い説明は、参照により本明細書に組み込まれる公開PCT特許出願第WO2003/70918号に記載され、ここでは繰り返されない。好適な修飾は、糖部分（すなわち、例えば、2'-O-（2-メトキシエチル）若しくは2'-MOEなどの、糖部分の2'位（Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504）すなわち、アルコキシアルコキシ基）又は塩基部分（すなわち、代替ヌクレオチド鎖における別の特定の塩基と対合する能力を維持する非天然若しくは修飾塩基）の修飾を含むが、これらに限定されない。他の修飾は、ホスホエステル基を置き換えること（隣接するリボヌクレオチドを、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、又はホスホロジチオエートと接続すること）を含むがこれに限定されない、いわゆる「骨格」修飾を含む。

【0043】

本発明のアンチセンス分子又はdsNA分子は、自然発生ヌクレオチドで構成され得るか、又は2'-O-メチル修飾ヌクレオチド、5'-ホスホロチオエート基を含むヌクレオチド、及びコレステリル誘導体又はドデカン酸ビスデシルアミド基に連結された末端ヌクレオチドなどの、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドで構成され得る。代替的に、修飾ヌクレオチドは、以下の群から選択され得る：2'-デオキシ-2'-フルオロ修飾ヌクレオチド、2'-デオキシ修飾ヌクレオチド、ロックドヌクレオチド、無塩基性ヌクレオチド、2'-アミノ修飾ヌクレオチド、2'-アルキル修飾ヌクレオチド、モルホリノヌクレオチド、ホスホロアミド酸塩、及びヌクレオチドを含む非天然塩基。

【0044】

「単離された及び／又は精製された」という用語は、核酸、例えば、DNA又はRNA分子の、その天然細胞環境からの、及び核酸又はポリペプチドなどの、細胞の他の成分との会合からの、それを配列決定、複製、及び／又は発現することができるような、インビ

10

20

30

40

50

トロ単離を指す。例えば、「単離された核酸」は、s i R N Aに転写される31個未満の連続したヌクレオチドを含有するDNA分子であり得る。そのような単離されたs i R N Aは、例えば、目的の遺伝子における配列に相補的であるか、又はハイブリダイズし、ストリンジェント下で安定に結合したままである二本鎖21塩基対長を有するヘアピン構造を形成し得る。よって、RNA又はDNAは、RNA又はDNAの天然源においてそれが通常会合している少なくとも1つの汚染核酸を含まず、好ましくは、任意の他の哺乳動物RNA又はDNAを実質的に含まないという点で「単離」される。「それが通常会合している少なくとも1つの汚染源核酸を含まない」という句は、核酸が、源若しくは天然細胞に再導入されるが、異なる染色体位置にあるか、又はそうでなければ源細胞、例えば、ベクター若しくはプラスミドに通常見られない核酸配列に隣接している場合を含む。

10

【0045】

開示されるヌクレオチド配列及びタンパク質又はそれによってコードされる部分長タンパク質の断片及びバリエーションもまた、本発明によって包含される。「断片」又は「部分」とは、ポリペプチド又はタンパク質をコードするヌクレオチド配列、又はそのアミノ酸配列の全長又は全長未満を意味する。「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、交換可能に使用されることに留意されたい。両方の用語は、共有ペプチド結合を介して一緒に結合したアミノ酸残基の鎖で構成される分子を指す。

【0046】

「遺伝子」という用語は、生物学的機能に関連する核酸の任意のセグメントを指すために広く使用される。よって、遺伝子は、コード配列及び／又はそれらの発現に必要な調節配列を含む。例えば、「遺伝子」は、調節配列を含む、mRNA、機能的RNA、又は特異的タンパク質を発現する核酸断片を指す。「遺伝子」はまた、例えば、他のタンパク質についての認識配列を形成する、非発現DNAセグメントを含む。「遺伝子」は、目的の源からのクローニング、又は既知若しくは予測配列情報からの合成を含む、様々な源から得ることができ、所望のパラメータを有するように設計された配列を含み得る。「対立遺伝子」は、染色体上の所与の遺伝子座を占める遺伝子のいくつかの代替形態のうちの1つである。

20

【0047】

分子の「バリエーション」は、天然分子の配列と実質的に類似する配列である。ヌクレオチド配列について、バリエーションは、遺伝コードの縮重のために、天然タンパク質の同一のアミノ酸配列をコードする配列を含む。これらのような自然発生対立遺伝子バリエーションは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）及びハイブリダイゼーション技法と同様に、分子生物学技法の使用で特定することができる。バリエーションヌクレオチド配列はまた、例えば、天然タンパク質をコードする部位特異的変異誘発を使用することによって生成されるもの、及びアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードするものなどの、合成由来ヌクレオチド配列を含む。概して、本発明のヌクレオチド配列バリエーションは、少なくとも40%、50%、60%、～70%、例えば、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、～79%、一般に少なくとも80%、例えば、81%～84%、少なくとも85%、例えば、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、～98%の、天然（内因性）ヌクレオチド配列に対する配列同一性を有するであろう。

30

40

【0048】

特定の核酸配列の「保存的に修飾されたバリエーション」は、同一又は本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸配列を指す。遺伝コードの縮重のために、多数の機能的に同一の核酸は、任意の所与のポリペプチドをコードする。例えば、コドンCGT、CGC、CGA、CGG、AGA、及びAGGは全て、アミノ酸アルギニンをコードする。よって、アルギニンがコドンによって指定される全ての位置において、コドンは、コードされたタンパク質を改変することなく、記載される対応するコドンのいずれかに改変することができる。そのような核酸バリエーションは、「保存的に修飾されたバリエーション」の1つの種である「サイレントバリエーション」である。ポリペプチドをコードする本明細

50

書に記載の全ての核酸配列は、別段に記載される場合を除き、全ての可能なサイレントバリエーションも記載する。当業者であれば、核酸における各コドンが（通常はメチオニンの唯一のコドンであるATGを除き）、標準的な技法によって機能的に同一の分子をもたらすように修飾され得ることを認識するであろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各「サイレントバリエーション」は、各記載配列において暗示される。

【0049】

「組換えDNA分子」は、例えば、Sambrook and Russell (2001) "Molecular Cloning". CSHL Press: Long Island, NY, USAに記載されるように、組換えDNA技術及びDNA配列と一緒に連結するために使用される手順を使用して一緒に連結されるDNA配列の組み合わせである。

10

【0050】

「相同」DNA又はRNA配列は、それが導入される宿主細胞に自然に会合している配列である。

【0051】

「ベクター」は、とりわけ、任意のウイルスベクター、及び自己伝達性若しくは可動性であるか、又はそうではない場合があり、細胞ゲノムへの組み込みによるか、又は染色体外に存在するか（例えば、複製起点を有する自律複製プラスミド）のいずれかの原核又は真核宿主を形質転換することができる、二本鎖又は一本鎖線状又は環状形態の任意のプラスミド、コスミド、ファージ、又はバイナリーベクターを含むように定義される。

20

【0052】

本明細書で使用される「発現カセット」とは、適切な宿主細胞における特定のヌクレオチド配列の発現を指向することができる核酸配列を意味し、これは、終止シグナルに作動可能に連結され得る目的のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含み得る。それはまた、ヌクレオチド配列の適切な翻訳に必要な配列を含み得る。コード領域は、通常、目的のタンパク質についてコードするが、目的の機能的RNA、例えば、本発明によるアンチセンス分子、アンチセンスRNA、センス若しくはアンチセンス方向における非翻訳RNA、又はsiRNAについてコードし得る。目的のヌクレオチド配列を含む発現カセットは、キメラであり得る。発現カセットはまた、自然発生するが、異種発現に有用な組換え形態で得られたものであり得る。発現カセットにおけるヌクレオチド配列の発現は、構成的プロモーター又は宿主細胞がいくらかの特定の刺激に曝露されるときにのみ転写を開始する調節可能なプロモーターの制御下にあり得る。多細胞生物の場合、プロモーターはまた、特定の組織若しくは器官又は発達段階に特異的であり得る。

30

【0053】

「遺伝子サイレンシング」は、遺伝子発現、例えば、導入遺伝子、異種遺伝子、及び／又は内因性遺伝子発現の抑制を指す。遺伝子サイレンシングは、転写に影響を与えるプロセスを通して及び／又は転写後メカニズムに影響を与えるプロセスを通して媒介され得る。いくつかの実施形態では、遺伝子サイレンシングは、siRNAがRNA干渉を介して配列特異的な方法で目的の遺伝子のmRNAの分解を開始するときを生じる。いくつかの実施形態では、遺伝子サイレンシングは、対立遺伝子特異的であり得る。「対立遺伝子特異的」遺伝子サイレンシングは、遺伝子の1つの対立遺伝子の特異的サイレンシングを指す。

40

【0054】

「RNA干渉(RNAi)」は、siRNAによって開始される配列特異的、転写後遺伝子サイレンシングのプロセスである。RNAiは、ショウジョウバエ、線虫、真菌、及び植物などの多くの生物に見られ、抗ウイルス防御、トランスポゾン活性の調整、及び遺伝子発現の調節に関与すると考えられている。RNAiの間、siRNAは、標的mRNAの分解を誘導し、結果として遺伝子発現の配列特異的低減又は更には阻害を伴う。

【0055】

本発明による「siRNA」又は「小干渉リボ核酸」は、以下の態様を含む、当該技術

50

分野で既知の意味を有する。s i R N A は、生理学的条件下で相補領域に沿ってハイブリダイズするリボヌクレオチドの 2 つの鎖からなる。鎖は別個であるが、ある特定の実施形態では、分子リンカーによって連結され得る。個々のリボヌクレオチドは、未修飾自然発生リボヌクレオチド、未修飾自然発生デオキシリボヌクレオチドであり得るか、又はそれらは、本明細書の他の場所に記載されるように化学的に修飾若しくは合成され得る。

【0056】

「RNA二本鎖」又は「dsRNA」は、RNA分子の2つの領域間の相補対合によって形成された構造を指す。s i R N A は、s i R N A の二本鎖部分のヌクレオチド配列が L M N A 遺伝子のヌクレオチド配列に相補的であるという点で、遺伝子に「標的化」される。いくつかの実施形態では、s i R N A の二本鎖の長さは、30個未満のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、二本鎖は、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、又は10ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、二本鎖の長さは、19~25ヌクレオチド長である。s i R N A のRNA二本鎖部分は、ヘアピン構造の一部であり得る。二本鎖部分に加えて、ヘアピン構造は、二本鎖を形成する2つの配列間に配置されたループ部分を含むし得る。ループは、長さが変動し得る。いくつかの実施形態では、ループは、5、6、7、8、9、10、11、12、又は13ヌクレオチド長である。ヘアピン構造はまた、3'又は5'オーバーハング部分を含むことができる。いくつかの実施形態では、オーバーハングは、0、1、2、3、4、又は5ヌクレオチド長の3'又は5'オーバーハングである。

【0057】

s i R N A は、核酸配列によってコードすることができ、核酸配列はまた、プロモーターを含むことができる。核酸配列は、ポリアデニル化シグナルも含むことができる。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、合成最小ポリアデニル化シグナルである。

【0058】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチドオーバーハング」は、dsRNAの一方の鎖の3'末端が他方の鎖の5'末端を超えて延在するか、又は逆もまた同様であるとき、dsRNAの二本鎖構造から突出する不対合ヌクレオチド（複数可）を指す。「平滑」又は「平滑末端」は、dsRNAのその末端に不対合ヌクレオチドがないこと、すなわち、ヌクレオチドオーバーハングがないことを意味する。「平滑末端」dsRNAは、その全長にわたって二本鎖である、すなわち、分子のいずれの末端にもヌクレオチドオーバーハングがないdsRNAである。

【0059】

「アンチセンス鎖」という用語は、標的配列に実質的に相補的である領域を含むdsRNAの鎖を指す。

【0060】

本明細書で使用される場合、「相補性の領域」という用語は、本明細書で定義される、配列、例えば、標的配列に実質的に相補的であるアンチセンス鎖上の領域を指す。

【0061】

本明細書で使用される「センス鎖」という用語は、アンチセンス鎖の領域に実質的に相補的である領域を含むdsRNAの鎖を指す。

【0062】

本明細書で使用される「治療すること」とは、疾患又は状態の少なくとも1つの症状を改善すること、それを治療すること、及び／又はその発症を予防することを指す。

【0063】

本明細書で使用される場合、「によってコードされる」という用語は、遺伝子又は配列番号におけるDNA配列が目的のRNAに転写されることを意味する。

【0064】

「LMNA遺伝子の発現を低減することができる」という用語は、RNA干渉を通した

L M N A 遺伝子の実質的なサイレンシングのプロセスを指す。R N A 干渉は、二本鎖核酸 (d s N A) によるもの又は一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド (A S O) によるものを含む、アンチセンス分子によって誘発することができる。

【0065】

「ラミンA / C」遺伝子は、L M N A 遺伝子としても知られている。L M N A 遺伝子は、ラミンA又はラミンCなどの、異なるラミントタンパク質をコードするいくつかの代替m R N A にスプライシングされるm R N A をコードする。

【0066】

R N A 干渉を通じたL M N A 遺伝子の実質的なサイレンシングの当該プロセスは、好ましくは、L M N A 遺伝子の対立遺伝子の特異的にサイレンシングすることに指向されるが、第2の対立遺伝子の発現は、当該プロセスによって改変されない。好ましい実施形態では、L M N A 遺伝子の1つの対立遺伝子は、サイレンシングされる。その利点は、これが心不全の多くの遺伝性形態の疾患表現型を軽減する変異体対立遺伝子をサイレンシングすることを可能にすることである。現在、450超のL M N A 変異が報告されており、拡張型心筋症を含む広範囲の疾患（ラミノパシー）につながっている。全てのこれらのラミノパシーについて変異ホットスポットを特定することはできなかったが、これらの変異の大部分がドミナントネガティブ効果を有することを共有しており、変異遺伝子産物が野生型産物の存在下で表現型を引き起こすことを示している。

【0067】

本明細書で使用される「変異体L M N A 対立遺伝子」又は「変異体L M N A 遺伝子」という用語は、産物が核構造及び機能に悪影響を及ぼすL M N A 対立遺伝子又は遺伝子のバリエーションを指す。好ましくは、変異体L M N A 対立遺伝子は、ドミナントネガティブ効果を有し、変異体対立遺伝子のヘテロ接合性発現が核構造及び核機能に悪影響を及ぼすことを意味する。

【0068】

「アンチセンスオリゴマー」又は「アンチセンス化合物」又は「アンチセンスオリゴヌクレオチド」又は「オリゴヌクレオチド」という用語は、交換可能に使用され、各々、ワトソン-クリック塩基対合によって核酸（典型的にはR N A）における標的配列にハイブリダイズして、標的配列内に核酸：オリゴマー-ヘテロ二本鎖を形成することを可能にするサブユニット間結合によって連結された、塩基対合部分を有する、環状サブユニット（すなわち、プリン又はピリミジン）の配列を指す。環状サブユニットは、リボース若しくは別のペントース糖、又はある特定の実施形態では、モルホリノ基をベースとし得る。ペプチド核酸（P N A）、ロックド核酸（L N A）、及び2'-O-メチルオリゴヌクレオチド、並びに当該技術分野で知られる他のアンチセンス剤も企図される。

【0069】

そのようなアンチセンスオリゴマーは、m R N A の翻訳をブロック若しくは阻害するか、又は天然p r e -m R N A スプライスプロセッシングを阻害するか、又は標的化されたm R N A の分解を誘導するように設計することができ、ハイブリダイズする標的配列「に指向される」又は「に対して標的化される」と言われ得る。ある特定の実施形態では、標的配列は、m R N A のA U G 開始コドン、予め処理されたm R N A の3'若しくは5'スプライス部位、又は分岐点を囲むか又は含む領域である。標的配列は、エクソン内若しくはイントロン内又は組み合わせであり得る。スプライス部位についての標的配列は、予め処理されたm R N A における正常スプライスアクセプター接合部の1~約25塩基対下流にその5'末端を有するm R N A 配列を含み得る。スプライスについての好ましい標的配列は、スプライス部位を含むか、又はエクソンコード配列内に完全に含まれるか、又はスプライスアクセプター若しくはドナー部位に広がる、予め処理されたm R N A の任意の領域である。遺伝子の標的領域における当該好ましい標的配列は、一塩基多型（S N P）を含み、例えば、変異を担持する、特定の対立遺伝子の分解を可能にする。オリゴマーは、より一般的には、上記の方法で標的の核酸に対して標的化されるとき、本発明において、ラミンAタンパク質をコードするヒトL M N A 遺伝子p r e -m R N A などの生物学的に関連

10

20

30

40

50

する標的「に対して標的化される」と言われる。当該アンチセンスオリゴマーは、好ましくは、シス構成で疾患を引き起こす変異を担持するSNP rs4641 T又はSNP rs4641 C対立遺伝子などの、ヒトLMNA遺伝子の特定の対立遺伝子の分解を誘導するように設計される。本明細書で使用される場合、「アンチセンスオリゴヌクレオチド」(ASO)は、修飾されていないか又は化学的に修飾された一本鎖核酸分子(通常15~30nt長)である薬剤を意味し、これはワトソン-クリック塩基対合を通してmRNA内のそれらの標的相補配列に選択的にハイブリダイズすることができる。ASO-mRNAヘテロ二本鎖の形成は、以下のような効果を誘導する: 1) RNase Hエンドヌクレアーゼを活性化するか、又は細菌エンドリボヌクレアーゼ-RNase III及びRNase E-のように結合したmRNAの分解をもたらす、ASOをインタクトのままにする、2) リボソーム活性の立体障害による翻訳停止を引き起こす、3) mRNAスプライシングを阻害する、4) pre-mRNAを不安定化する。実際、どのような効果が生じるかは、ASO化学組成及びハイブリダイゼーションの位置に依存するが、その後の結果は、標的遺伝子及びタンパク質発現の特異的下方調節である。

10

20

30

40

50

【0070】

本明細書で使用される場合、「rs4641」という用語は、chr1:156137743 (GRCh38.p13)に位置するSNPを指す。2021年4月9日にリリースされたncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4641のワールドワイドウェブを参照されたい。本明細書で使用される場合、それはまた、LMNA遺伝子によってコードされる転写物に存在するときの対応するヌクレオチド多型を指す。

【0071】

本明細書で使用される場合、「LMNA変異」という用語は、好ましくはドミナントネガティブ効果を有し、具体的にはラミノパシー、より具体的には心筋症を引き起こす、LMNA遺伝子における変異を指す。

【0072】

RNA干渉を介して特定の標的化された対立遺伝子の実質的なサイレンシングをもたらす戦略が本明細書に開示される。この戦略の使用は、標的化された遺伝子又は対立遺伝子のインビトロ及びインビボ発現の著しい減少をもたらす。この戦略は、生物学的プロセスをモデル化するか、又はヒト疾患のための療法を提供するために、標的化された遺伝子又は対立遺伝子の発現を低減するのに有用である。

【0073】

本明細書で使用される場合、対立遺伝子をサイレンシングする文脈における「実質的なサイレンシング」という用語は、標的化された対立遺伝子の発現が、本発明のアンチセンス分子が存在しないときに見られる発現のレベルと比較して約10%~100%低減されるように、標的化された対立遺伝子のmRNAが、導入されたアンチセンス分子の存在によって特異的に阻害及び/又は分解されることを意味する。概して、対立遺伝子を実質的にサイレンシングされるとき、それは、単離されたアンチセンス分子が存在しないときと比較して、少なくとも40%、50%、60%、70%、例えば、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、一般的に少なくとも80%、例えば、81%~84%、少なくとも85%、例えば、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は更に100%の低減発現を有するであろう。対照的には、標的化されていない対立遺伝子の発現は、本発明のアンチセンス分子が存在しないときに見られる発現のレベルと比較して実質的に改変されていない。本明細書で使用される場合、遺伝子をサイレンシングする文脈における「実質的なサイレンシング」という用語は、標的化された対立遺伝子の発現が、単離されたアンチセンス分子が存在しないときに見られる発現のレベルと比較して約10%~100%低減されるように、標的化された対立遺伝子のmRNAが、導入された単離されたアンチセンス分子の存在によって阻害及び/又は分解されることを意味する。概して、対立遺伝子を実質的にサイレンシングされるとき、それは、単離されたアンチセンス分子が存在しないときと比較して、少なくとも40%、50%、60%、~70

%、例えば、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、~79%、一般的に少なくとも80%、例えば、81%~84%、少なくとも85%、例えば、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は更に100%の低減発現を有するであろう。本明細書で使用される場合、「実質的に正常な活性」という用語は、単離されたアンチセンス分子が細胞に導入されていないときの対立遺伝子又は遺伝子の発現のレベルを意味する。

【0074】

図1における戦略に概説されるように、本発明者らは、変異体対立遺伝子、すなわち、疾患を引き起こす変異を有する対立遺伝子からのラミンA/Cタンパク質の産生を特異的に排除するsiRNAを開発した。野生型対立遺伝子と変異体対立遺伝子との間の塩基対の差異を利用することによって、本発明者らは、野生型mRNAの発現に干渉することなしに、変異体LMNA mRNAの発現の対立遺伝子特異的なサイレンシングに成功した。ラミンA/Cが必須タンパク質であるため、変異体対立遺伝子のみをサイレンシングする努力をすることが極めて重要である。この対立遺伝子特異的戦略は、LMNA変異、特に拡張型心筋症を含むラミノパシーによって引き起こされる疾患の治療のための明らかな治療潜在性を有する。

【0075】

好ましい実施形態では、当該アンチセンス核酸鎖は、15~30ヌクレオチド長である。好ましくは、当該アンチセンス核酸鎖は、当該標的領域における少なくとも7個、より好ましくは8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、又は21個のヌクレオチドに相補的である。いくつかの実施形態では、アンチセンス核酸鎖と標的領域との間に1つ又は2つのミスマッチがあり得る。好ましくは、2個以下のミスマッチ、より好ましくは1個以下のミスマッチがある。存在する場合、当該ミスマッチは、例えば、SNP rs538089、rs505058、又はrs4641の対立遺伝子特異的標的化と干渉しないであろう。ある特定の好ましい実施形態では、相補性にミスマッチはない。好適には、当業者は、Huang et al. [Nucleic Acids Res 2009, 37, 7560-7569, doi: 10.1093/nar/gkp835] によって記載されるようにヌクレオチド変化のタイプに応じて最も高い識別潜在性を有するミスマッチ位置を設計することができる。好ましくは、当該アンチセンス核酸鎖は、少なくとも7個、より好ましくは8、9、10、11、又は12個の連続したヌクレオチドに相補的である。好ましくは、当該標的領域は、少なくとも15、16、17、18、又は19個のヌクレオチドを含む。

【0076】

好ましい実施形態では、単離されたアンチセンス分子は、

- a. 二本鎖核酸 (dsNA) 若しくはその化学的に修飾されたバージョン、又は
- b. 一本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) から選択される。

【0077】

dsNAの好ましい実施形態は、合成二本鎖小干渉RNA (siRNA) 及びベクター駆動ショートヘアピンRNA (shRNA) である。siRNA及びベクター駆動shRNAの両方は、各々それらのそれぞれの利点を有する、インビトロ及びインビボ適用において有効であることが実証されている。ほとんどのsiRNAは、RISCを含有するAgo2への効率的な組み込みを促進するように構造的に設計されており、Dicer基質設計を含有するRNase IIIは、初期会合及びプレRISCでのプロセッシングによってsiRNAの効率を少なくとも10倍改善する。ベクター駆動shRNAは、非常に効率的であると思われる、宿主microRNA生物発生経路を利用する。siRNAは、より容易に化学修飾されるが、shRNA発現は、特定のプロモーターによって調整及び調節することができる。加えて、shRNAをコードするベクターが細胞のゲノムに組み込まれ得るため、shRNAによる対立遺伝子特異的抑制は長続きし得る。

【0078】

一実施形態では、治療用 *siRNA* の細胞内発現を達成するために、好ましくは、*SNP rs538089*、*rs505058*、又は *rs4641* を含む *LMNA* 遺伝子の一部をコードした標的領域に対して指向される配列を表す2つの相補鎖又はヘアピン配列（21bpヘアピンなど）を含有するRNA分子が構築される。*siRNA*、又は *siRNA* をコードする核酸は、病気の心臓細胞などの、標的細胞に導入される。*siRNA* は、標的化された変異対立遺伝子の標的mRNA及びタンパク質発現を低減する。

【0079】

一実施形態では、本発明の *dsRNA* は、安定性を増強するために化学修飾される。本発明の核酸は、本明細書に参照によって組み込まれる、“*Current protocols in nucleic acid chemistry*”, Beaucage, S. L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA に記載されるものなどの、当該技術分野で十分に構築された方法によって合成及び／又は修飾され得る。化学修飾は、2'修飾、非天然塩基の導入、リガンドへの共有結合、チオホスフェート結合でのリン酸塩結合の置換、及びそれらの組み合わせを含み得るが、これらに限定されない。この実施形態では、二本鎖構造の完全性は、少なくとも1つ、好ましくは2つの化学結合によって強化される。化学結合は、例えば、共有結合、イオン結合、又は水素結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス、又はスタッキング相互作用を導入することによる、金属-イオン配位による、又はプリンアナログの使用、及びそれらの組み合わせを通じた、様々な周知の技法のいずれかによって達成され得る。好ましくは、*dsRNA* を修飾するために使用することができる化学基は、限定なしに、メチレンブルー、二官能基、好ましくはビス-（2-クロロエチル）アミン、*N*-アセチル-*N'*-（*p*-グリオキシルベンゾイル）シスタミン、4-チオウラシル、及びブソラレンを含む。1つの好ましい実施形態では、リンカーは、ヘキサエチレングリコールリンカーである。この場合では、*dsRNA* は、固相合成によって産生され、ヘキサエチレングリコールリンカーは、標準的な方法に従って組み込まれる（例えば、Williams, D. J., and K. B. Hall, *Biochem.* (1996) 35:14665-14670）。特定の実施形態では、アンチセンス鎖の5'末端及びセンス鎖の3'末端は、ヘキサエチレングリコールリンカーを介して化学的に連結される。別の実施形態では、*dsRNA* の少なくとも1つのヌクレオチドは、ホスホロチオエート又はホスホロジチオエート基を含む。*dsRNA* の末端は、好ましくは、三重ヘリックス構造によって形成される。

【0080】

治療用 *siRNA* をコードする構築物は、*siRNA* の1つ以上の鎖が、プロモーターに直接隣接し、当該プロモーターの制御下にある核酸によってコードされるように構成され、当該プロモーターが標的細胞への導入後に当該核酸の発現を駆動するであろうことを意味する。構築物は、例えば、注射によって、標的細胞に導入され、細胞における標的対立遺伝子の低下した発現を可能にする。

【0081】

本発明は、少なくとも当該アンチセンス核酸鎖をコードする核酸を含む発現カセットを提供する。いくつかの実施形態では、当該発現カセットは、本発明による完全に単離されたアンチセンス分子をコードする核酸を含む。

【0082】

一実施形態では、本発明の *siRNA* は、二本鎖構造及びループ構造を含有するヘアピン構造を形成し得る。ループ構造は、4~13個、より好ましくは4~10個のヌクレオチド、例えば、4、5、又は6個のヌクレオチドを含有し得る。好ましくは、当該ループは、配列 *UCAAGAC* を含有する。二本鎖は、19~25個のヌクレオチドなどの、30個未満のヌクレオチドの長さである。*siRNA* は、オーバーハング領域を更に含有し得る。そのようなオーバーハングは、3'オーバーハング領域又は5'オーバーハング領域であり得る。オーバーハング領域は、例えば、1~6ヌクレオチド長であり得る。

【0083】

10

20

30

40

50

本発明はまた、第1のセグメント、第1のセグメントのすぐ3'に位置する第2のセグメント、及び第2のセグメントのすぐ3'に位置する第3のセグメントをコードする単離された核酸配列を含有する発現カセットを提供し、第1及び第3のセグメントは、各々30塩基対未満の長さであり、各々10塩基対超の長さであり、第3のセグメントの配列は、第1のセグメントの配列の補体であり、単離された核酸配列は、目的の遺伝子に対して標的化された小干渉RNA分子(s iRNA)として機能する。発現カセットは、ウイルスベクターなどの、ベクターに含有され得る。

【0084】

発現カセットは、本明細書に記載されるように、p o l I Iプロモーターを更に含有し得る。p o l I Iプロモーターの例としては、調節可能なプロモーター及び構成的プロモーターが挙げられる。例えば、プロモーターは、CMV又はRSVプロモーターであり得る。発現カセットは、合成最小ポリアデニル化シグナルなどの、ポリアデニル化シグナルを更に含有し得る。核酸配列は、マーカー遺伝子を更に含有し得る。発現カセットは、ウイルスベクターに含有され得る。本発明における使用のための適切なウイルスベクターは、アデノウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、ポリオウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)、又はマウスマロニーベースのウイルスベクターであり得る。

【0085】

本発明は、細胞を以上に記載される発現カセットと接触させることによって、細胞における特定の遺伝子産物の発現を低減する方法を提供する。上記の発現カセットの組成物を患者に投与することによって患者を治療する方法も提供する。

【0086】

本発明は、細胞を以上に記載されるような発現カセットと接触させることによって、細胞における特定の遺伝子産物の発現を低減する方法を更に提供する。

【0087】

本発明はまた、患者に本発明による発現カセットを含有する組成物を投与することによって、患者を治療する方法を提供する。当該発現カセットは、好ましくは、実施例2に記載されるように、shC17、shC17mm5、shC17mm7、shC13mm17、shT14、shT17、shT17mm5、及びshT17mm7を包含する。

【0088】

II. 本発明の核酸分子

本核酸分子を得ることができるヌクレオチド配列の源は、任意の脊椎動物、好ましくは哺乳動物、細胞源を含む。

【0089】

s iRNAをコードするDNA配列に加えて、本発明の核酸分子は、標的対立遺伝子の発現を低減するのににも有用な、一本鎖及び二本鎖干渉RNA分子を含む。

【0090】

オリゴヌクレオチド媒介変異誘発は、置換バリエーションを調製するための方法である。この技法は、当該技術分野で既知である。簡潔には、s iRNAをコードする核酸は、所望の変異をコードするオリゴヌクレオチドをDNAテンプレートにハイブリダイズすることによって改変することができ、テンプレートは、未改変又は天然遺伝子配列を含有するプラスミド又はバクテリオファージの一本鎖形態である。ハイブリダイゼーション後、DNAポリメラーゼは、よってオリゴヌクレオチドプライマーを組み込むテンプレートの第2の相補鎖全体を合成するために使用され、s iRNAをコードする核酸において選択された改変についてコードする。概して、少なくとも25ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドが使用される。最適なオリゴヌクレオチドは、選択された改変についてコードするヌクレオチドのいずれかの側に、テンプレートに完全に相補的な12~15個のヌクレオチドを有する。これは、オリゴヌクレオチドが一本鎖DNAテンプレート分子に適切にハイブリダイズすることを確実にする。オリゴヌクレオチドは、当該技術分野で既知の技法を使用して容易に合成される。

【0091】

DNAテンプレートは、バクテリオファージM13ベクター（市販のM13 mp 18及びM13 mp 19ベクターが好適である）に由来するベクター、又は一本鎖ファージ複製起点を含有するベクターによって生成することができる。よって、改変されるDNAは、一本鎖テンプレートを生成するために、これらのベクターのうちの1つに挿入され得る。

【0092】

代替的に、一本鎖DNAテンプレートは、標準的な技法を使用して二本鎖プラスミド（又は他の）DNAを変性させることによって生成され得る。

【0093】

天然DNA配列の改変のために、オリゴヌクレオチドは、好適なハイブリダイゼーション条件下で一本鎖テンプレートにハイブリダイズされる。次いで、DNA重合酵素、通常はDNAポリメラーゼIのクレノウ断片は、オリゴヌクレオチドを合成のためのプライマーとして使用してテンプレートの相補鎖を合成するために添加される。よって、ヘテロ二本鎖分子は、DNAの一方の鎖がDNAの改変形態をコードし、他方の鎖（元のテンプレート）がDNAの天然の未改変配列をコードするように形成される。次いで、このヘテロ二本鎖分子は、好適な宿主細胞、通常はE. coli JM101などの原核細胞に形質転換される。細胞が増殖された後、それらは、アガロースプレート上に播種され、改変DNAを含有する細菌コロニーを特定するために、32-リン酸で放射標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用してスクリーニングされる。次いで、改変領域は、除去され、適切なベクター、概して、適切な宿主の形質転換に典型的に用いられるタイプの発現ベクターに配置される。

【0094】

直前に記載された方法は、プラスミドの両方の鎖が改変を含有するホモ二本鎖分子が作製されるように修飾され得る。修飾は、以下の通りである：一本鎖オリゴヌクレオチドは、上記のように一本鎖テンプレートにアニールされる。3つのデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボアデノシン（dATP）、デオキシリボグアノシン（dGTP）、及びデオキシリボチミジン（dTTP）の混合物は、（Amersham Corporationから得ることができる）dCTP-（*S）と呼ばれる修飾チオデオキシリボシトシンと組み合わせられる。この混合物は、テンプレート-オリゴヌクレオチド複合体に添加される。この混合物へのDNAポリメラーゼの添加時、改変塩基を除いて、テンプレートと同一のDNA鎖が生成される。加えて、この新しいDNA鎖は、dCTPの代わりにdCTP-（*S）を含有し、これは制限エンドヌクレアーゼ消化から保護するように機能する。

【0095】

二本鎖ヘテロ二本鎖のテンプレート鎖が適切な制限酵素でニックされた後、テンプレート鎖は、改変される部位を含有する領域を越えて、ExoIIIヌクレアーゼ又は別の適切なヌクレアーゼで消化することができる。次いで、反応が停止されて、部分的に一本鎖のみである分子を残す。次いで、完全な二本鎖DNAホモ二本鎖は、全ての4つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸塩、ATP、及びDNAリガーゼの存在下でDNAポリメラーゼを使用して形成される。次いで、このホモ二本鎖分子は、E. coli JM101などの好適な宿主細胞に形質転換することができる。

【0096】

III. 本発明の発現カセット

発現カセットを調製するために、組換えDNA配列又はセグメントは、環状又は線状、二本鎖又は一本鎖であり得る。概して、DNA配列又はセグメントは、プラスミドDNAなどの、キメラDNAの形態にあるか、又は得られた形質転換細胞に存在する組換えDNAの発現を促進する制御配列に隣接するコード領域も含有することができるベクターである。

【0097】

「キメラ」ベクター又は発現カセットは、本明細書で使用される場合、少なくとも２つの異なる種からの核酸配列を含むベクター若しくはカセットを意味するか、又は種の「天然」若しくは野生型では発生しない方法で連結若しくは会合している同じ種からの核酸配列を有する。

【００９８】

ＲＮＡ転写物の転写単位、又はその部分として機能する組換えＤＮＡ配列とは別に、組換えＤＮＡの一部は、非転写であり得、調節又は構造機能を果たす。例えば、組換えＤＮＡは、哺乳動物細胞において活性であるプロモーターを有し得る。

【００９９】

イントロン、エンハンサー、ポリアデニル化配列などの、宿主細胞において機能的な他の要素もまた、組換えＤＮＡの一部であり得る。そのような要素は、ＤＮＡの機能に必要な場合又はそうでない場合があるが、転写、*s i R N A*の安定性などに影響を与えることによって、ＤＮＡの改善された発現を提供し得る。そのような要素は、細胞における*s i R N A*の最適な性能を得るために所望に応じてＤＮＡに含まれ得る。

【０１００】

制御配列は、特定の宿主生物における作動可能に連結されたコード配列の発現に必要なＤＮＡ配列である。原核細胞に好適な制御配列は、例えば、プロモーター、任意選択でオペレーター配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーを利用することが知られている。

【０１０１】

作動可能に連結された核酸は、別の核酸配列との機能的関係に配置された核酸である。例えば、プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列に作動可能に連結しているか、又はリボソーム結合部位は、翻訳を容易にするように配置される場合、コード配列に作動可能に連結している。概して、作動可能に連結されたＤＮＡ配列は、連結したＤＮＡ配列であり、連続している。しかしながら、エンハンサーは、隣接している必要はない。連結は、好都合な制限部位でのライゲーションによって達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーは、従来の慣行に従って使用される。

【０１０２】

細胞に導入される組換えＤＮＡは、ウイルスベクターを通してトランスフェクト又は感染されることが求められる細胞集団からの発現細胞の特定及び選択を容易にするために、選択可能なマーカー遺伝子若しくはレポーター遺伝子のいずれか、又は両方を含有し得る。他の実施形態では、選択可能なマーカーは、別個のＤＮＡ片に担持され、共トランスフェクション手順において使用され得る。選択可能なマーカー及びレポーター遺伝子の両方に、宿主細胞における発現を可能にするための適切な調節配列が隣接し得る。有用な選択可能なマーカーは、当該技術分野で既知であり、例えば、*n e o*などのような、抗生物質耐性遺伝子を含む。

【０１０３】

レポーター遺伝子は、潜在的にトランスフェクトされた細胞を特定し、調節配列の機能性を評価するために使用される。容易にアッセイ可能なタンパク質をコードするレポーター遺伝子は、当該技術分野で周知である。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエント生物若しくは組織に存在しないか、又はそれによって発現されない遺伝子であり、その発現がいくつかの容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性によって明示されるタンパク質をコードする遺伝子である。例えば、レポーター遺伝子は、*E . c o l i*の*T n 9*からのクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（*c a t*）及びホタル*P h o t i n u s p y r a l i s*からのルシフェラーゼ遺伝子を含む。レポーター遺伝子の発現は、ＤＮＡがレシピエント細胞に導入された後の好適な時間でアッセイされる。

【０１０４】

標的細胞をトランスフェクトすることができる組換えＤＮＡを構築するための一般的な方法は、当業者に周知であり、本明細書で有用なＤＮＡを産生するために、同じ組成物及

10

20

30

40

50

び構築の方法が利用され得る。例えば、S a m b r o o k a n d R u s s e l l、下記は、好適な構築の方法を提供する。

【0105】

組換えDNAは、特定の細胞への導入に有用な任意の手順、例えば、物理的又は生物学的方法によって、s i R N AをコードするDNAで構成される発現ベクターでのトランスフェクションによって、宿主細胞、例えば、哺乳動物、細菌、酵母、又は昆虫細胞に容易に導入して、本発明のDNA分子又は配列が宿主細胞によって発現されるように、そのゲノムに安定に組み込まれているか、又はエピソーム要素として存在する組換えDNAを有する細胞を産生することができる。好ましくは、DNAは、ベクターを介して宿主細胞に導入される。宿主細胞は、好ましくは、真核起源、例えば、植物、哺乳動物、昆虫、酵母、又は真菌源であるが、非真核起源の宿主細胞も用いられ得る。

10

【0106】

予め選択されたDNAを宿主細胞に導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子爆撃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどを含む。目的のDNAを宿主細胞に導入するための生物学的方法は、DNA及びRNAウイルスベクターの使用を含む。哺乳動物遺伝子療法について、本明細書において以下に記載されるように、コピー遺伝子を宿主ゲノムに挿入する効率的な手段を使用することが望ましい。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、遺伝子を哺乳動物、例えば、ヒト細胞に挿入するための最も広く使用される方法となっている。他のウイルスベクターは、ボックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルスなどに由来し得る。

20

【0107】

上述のように、「トランスフェクトされた」又は「形質導入された」宿主細胞又は細胞株は、ゲノムが少なくとも1つの異種又は組換え核酸配列の存在によって改変又は増強されたものである。本発明の宿主細胞は、典型的には、アンチセンス分子、プラスミド発現ベクターにおけるDNA配列、ウイルス発現ベクターでの、又は単離された線状DNA配列としてのトランスフェクションによって産生される。トランスフェクトされたDNAは、s i R N Aをコードする配列で構成される、染色体的に組み込まれた組換えDNA配列となることができる。

【0108】

宿主細胞における組換えDNA配列の存在を確認するために、様々なアッセイが行われ得る。そのようなアッセイは、例えば、サザン及びノーザンブロットティング、RT-PCR、及びPCRなどの、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、例えば、免疫学的手段（ELISA及びウエスタンブロット）によって、又は本発明の範囲に該当する薬剤を特定するための本明細書に記載されるアッセイによって、特定のペプチドの存在又は不在を検出することなどの、「生化学的」アッセイを含む。

30

【0109】

導入された組換えDNAセグメントから産生されたRNAを検出及び定量するために、RT-PCRが用いられ得る。このPCRの適用では、逆転写酵素などの酵素を使用して、まずRNAをDNAに逆転写し、次いで従来のPCR技法の使用を通してDNAを増幅する必要がある。ほとんどの事例では、PCR技法は、有用であるが、RNA産物の完全性を実証しないであろう。RNA産物の性質に関する更なる情報は、ノーザンブロットティングによって得られ得る。この技法は、RNA種の存在を実証し、そのRNAの完全性に関する情報を与える。RNA種の存在又は不在は、ドット又はスロットブロットノーザンハイブリダイゼーションを使用して決定することもできる。これらの技法は、ノーザンブロットティングの修飾であり、RNA種の存在又は不在のみを実証する。

40

【0110】

サザンブロットティング及びPCRは、問題の組換えDNAセグメントを検出するために使用され得るが、予め選択されたDNAセグメントが発現されているかに関する情報を提供しない。発現は、導入された組換えDNA配列のペプチド産物を特異的に特定すること

50

によって、又は宿主細胞における導入された組換えDNAセグメントの発現によってもたらされる表現型変化を評価することによって評価され得る。

【0111】

本発明は、哺乳動物レシピエントにおいて外因性核酸材料を発現するための細胞発現系を提供する。「遺伝子修飾細胞」とも称される発現系は、外因性核酸材料を発現するための細胞及び発現ベクターを含む。遺伝子修飾細胞は、哺乳動物レシピエントへの投与に適しており、それらはレシピエントの内因性細胞を置き換える。よって、好ましい遺伝子修飾細胞は、非不死化であり、非腫瘍原性である。

【0112】

一実施形態によれば、細胞は、トランスフェクトされるか、又はそうでなければエキソビボで遺伝子修飾される。細胞は、哺乳動物（好ましくはヒト）から単離され、核酸は、アンチセンス分子を発現する治療剤をコードする異種（例えば、組換え）遺伝子を発現するためのベクターで導入（すなわち、インビトロで形質導入又はトランスフェクト）され、次いでインサイチュでの治療剤の送達のために哺乳動物レシピエントに投与される。哺乳動物レシピエントは、ヒトであり得、修飾される細胞は、自己細胞である、すなわち、細胞は、哺乳動物レシピエントから単離される。

【0113】

別の実施形態によれば、細胞は、トランスフェクト若しくは形質導入されるか、又はそうでなければインビボで遺伝子修飾される。哺乳動物レシピエントからの細胞は、アンチセンス分子を発現する治療剤をコードする異種（例えば、組換え）遺伝子を発現するための外因性核酸材料を含有するベクターでインビボで形質導入又はトランスフェクトされ、治療剤は、インサイチュで送達される。

【0114】

VI. 本発明の発現カセットのための送達ビヒクル

細胞における特定の siRNA を発現するための特定の発現ベクターの選択及び最適化は、場合により1つ以上の適切な対照領域（例えば、プロモーター、挿入配列）を有する、siRNA の核酸配列を得ること、siRNA をコードする核酸配列が挿入されるベクターを含むベクター構築物を調製すること、培養細胞をインビトロでベクター構築物でトランスフェクト又は形質導入すること、及び siRNA が培養細胞に存在するかを決定することによって達成することができる。

【0115】

細胞遺伝子療法のためのベクターは、複製欠損性ウイルスなどの、ウイルスを含む。例示的なウイルスベクターは、ハーベイ肉腫ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、(MPSV)、モロニーマウス白血病ウイルス、及びDNAウイルス（例えば、アデノウイルス）に由来する。

【0116】

複製欠損性レトロウイルスは、全てのビリオンタンパク質の合成を指向することができるが、感染性粒子を作製することはできない。したがって、これらの遺伝子改変レトロウイルス発現ベクターは、培養細胞における核酸配列の高効率形質導入のための一般的な有用性、及び本発明の方法における使用のための特定の有用性を有する。そのようなレトロウイルスは、インビボでの細胞への核酸配列の効率的な形質導入のための有用性を更に有する。レトロウイルスは、核酸材料を細胞に移入するために広く使用されている。

【0117】

遺伝子療法にレトロウイルスを使用する利点は、ウイルスが siRNA をコードする核酸配列を宿主細胞ゲノムに挿入し、それによって siRNA をコードする核酸配列が分裂するときに細胞の子孫に継承されることを可能にすることである。LTR領域におけるプロモーター配列は、様々な細胞型における挿入されたコード配列の発現を増強することが報告されている。レトロウイルス発現ベクターを使用するいくつかの欠点は、（1）例えば、無調節細胞増殖につながる、挿入性変異誘発、すなわち、siRNA をコードする核酸配列の、標的細胞ゲノムにおける望ましくない位置への挿入、及び（2）ベクターによ

って運ばれる s i R N A をコードする核酸配列が標的ゲノムに組み込まれるための標的細胞増殖の必要性である。

【0118】

細胞の形質転換のための発現ベクターとして有用な別のウイルス候補は、二本鎖 D N A ウイルスであるアデノウイルスである。アデノウイルスは、例えば、筋肉細胞及び内皮細胞を含む、広範囲の細胞型において感染性である。アデノウイルスはまた、インビボで筋肉細胞における発現ベクターとして使用されている。

【0119】

アデノウイルス (A d) は、36 kb ゲノムを有する二本鎖線状 D N A ウイルスである。アデノウイルスのいくつかの特徴は、それらを、インビボ遺伝子送達を促進するなどの、治療用途のための導入遺伝子送達ビヒクルとして有用にしている。組換えアデノウイルスベクターは、肺、脳、脾臓、胆嚢、及び肝臓を含む、様々な器官の実質細胞への効率的なインサイチュ遺伝子移入が可能であることが示されている。これは、ベクターが標的器官に送達され得る、嚢胞性線維症などの、遺伝性遺伝子疾患を治療するための方法におけるこれらのベクターの使用を可能にした。加えて、インサイチュ腫瘍形質導入を達成するアデノウイルスベクターの能力は、非播種性疾患のための様々な抗がん遺伝子療法方法の開発を可能にした。これらの方法では、ベクター格納は、腫瘍細胞特異的形質導入を好む。

10

【0120】

レトロウイルスと同様に、アデノウイルスゲノムは、遺伝子療法のための発現ベクターとしての、すなわち、ウイルス自体の産生を制御する遺伝情報を除去することによる使用に適応可能である。アデノウイルスは染色体外様式で機能するため、組換えアデノウイルスは、挿入性変異誘発の理論的な問題を有さない。

20

【0121】

組換えアデノウイルスを生成するためにいくつかのアプローチが従来使用されている。1つのアプローチは、アデノウイルスゲノムの部分に対する目的の核酸配列を含有する制限エンドヌクレアーゼ断片の直接ライゲーションを伴う。代替的に、目的の核酸配列は、相同組換え結果によって欠損アデノウイルスに挿入され得る。所望の組換え体は、相補細胞のローンにおいて生成された個々のプラークをスクリーニングすることによって特定される。

30

【0122】

ほとんどのアデノウイルスベクターは、早期領域 1 (E 1) 又は早期領域 3 (E 3) の代わりに目的の核酸配列を含有する発現カセットが導入されているアデノウイルス 5 型 (A d 5) 骨格に基づく。E 1 が欠失しているウイルスは、複製に欠陥があり、欠失遺伝子 E 1 及び p I X をトランスで供給する、ヒト相補細胞 (例えば、293 又は 911 細胞) において増殖される。

【0123】

よって、当業者には明らかであるように、外因性核酸材料を細胞に移入するために、様々な好適なウイルス発現ベクターが利用可能である。遺伝子サイレンシング療法に適している特定の状態のための治療剤を発現するための適切な発現ベクターの選択、及び選択された発現ベクターの細胞への挿入のための条件の最適化は、過度の実験の必要性なしに、当業者の範囲内である。

40

【0124】

別の実施形態では、発現ベクターは、プラスミドの形態にあり、これは、様々な方法のうちの 1 つによって標的細胞に移入される：物理的、エレクトロポレーション、スクレープローディング、微粒子爆撃、又は化学複合体としての細胞取り込み (例えば、カルシウム若しくはストロンチウム共沈殿、脂質との複合体形成、リガンドとの複合体形成)。L i p o f e c t i n (商標) (G i b c o - B R L、G a i t h e r s b u r g、M d .) 及び T r a n s f e c t a m (商標) (P r o M e g a、M a d i s o n、W i s .) を含む、カチオン性リポソーム複合体形成のためのいくつかの市販製品が入手可能であ

50

る。しかしながら、これらの方法によるトランスフェクションの効率は、標的細胞の性質に大きく依存しており、したがって、上記の手順を使用する細胞への核酸の最適トランスフェクションのための条件を最適化しなければならない。そのような最適化は、過度の実験の必要性なしに、当業者の範囲内である。

【0125】

VII. アンチセンス分子を選択するための方法

常染色体優性変異によって引き起こされる疾患において、遺伝子の対立遺伝子のうちの1つは、ドミナントネガティブ効果を有する変異を含有する。したがって、当該遺伝子の罹患していない対立遺伝子が発現されることを可能にしながら、罹患した対立遺伝子に存在するそのような変異を阻害することが望ましい。罹患した対立遺伝子を選択的に阻害する、すなわち、低減することができる好適なアンチセンス分子を選択するために、常染色体優性変異によって引き起こされる疾患に罹患している患者からの核酸試料が提供される。多くのそのような疾患が知られている。そのような疾患の例の非限定的なリストは、結節性硬化症、乳がん、神経線維腫症Ⅰ型、ハンチントン病、肥大型心筋症、多発性嚢胞腎、骨形成不全症、軟骨異形成症、中心核ミオパシー、及びマルファン症候群を含む。原則として、任意のそのような疾患は、本発明に従って選択されるアンチセンス分子によって治療され得る。本発明の方法は、核酸、好ましくは患者のDNA試料を必要とする。血液試料、唾液、頬粘膜などが挙げられるが、これらに限定されない、DNAを含有する患者からの任意の生体試料が使用され得る。ある特定の実施形態では、RNAが使用され得る。DNAは、当該技術分野で知られる方法に従って当該試料から単離され得る。続いて、常染色体優性変異の存在は、存在する両方の対立遺伝子の当該遺伝子の核酸配列を決定することによって決定される。続いて、対立遺伝子は、当該遺伝子の対立遺伝子中のヘテロ接合性SNPの存在についてスクリーニングされる。好ましい実施形態では、同義SNPは、最も高いマイナー対立遺伝子頻度(MAF)を有することが予想されるため、ヘテロ接合性SNPは、同義SNPを選択することによって決定される。次いで、当該遺伝子の当該SNPのセンス鎖の核酸配列は、当該技術分野で既知の方法を使用して決定される。続いて、当該遺伝子によってコードされる転写物の標的領域に実質的に相補的であるアンチセンス核酸鎖を含む単離されたアンチセンス分子が選択され、当該アンチセンス核酸鎖は、当該標的領域における当該SNPに少なくとも相補的である。

【0126】

好ましい実施形態では、本発明のアンチセンス分子を選択する当該方法は、選択されたアンチセンス分子が、細胞において試験されて、当該遺伝子の発現の低減に対する効果を決定するステップを更に含む。好ましくは、当該方法は、当該遺伝子の変異体及び／又は非変異対立遺伝子の発現の低減の効果を決定することを含む。好ましくは、当該方法は、当該遺伝子の対立遺伝子不均衡の変化を決定するステップを含む。好ましくは、当該ステップは、患者からの細胞上で行われる。

【0127】

好ましい実施形態では、単離されたアンチセンス分子は、

- a. 二本鎖核酸(dsNA)若しくはその化学的に修飾されたバージョン、又は
- b. アンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)から選択される。

【0128】

好ましくは、当該dsNAは、RNA、より好ましくは、ショートヘアピン(shRNA)又は小干渉RNA(siRNA)である。好ましくは、当該dsNAは、dsRNAである。

【0129】

本明細書で使用される場合、siRNAという用語は、15～31塩基対(bp)、好ましくは20～25bpで構成され、2つのRNA分子を含む二本鎖RNA分子を指す。本明細書で使用される場合、shRNAという用語は、15～31bp、好ましくは20～25bpで構成される部分的二本鎖RNA分子、及び一本鎖ループを含むヘアピン構造を形成する単一のRNA分子を指す。

【0130】

好ましい実施形態、本発明による単離されたアンチセンス分子では、当該アンチセンス核酸鎖は、15～30ヌクレオチド長である。好ましくは、当該アンチセンス核酸鎖は、当該標的領域における少なくとも7個、より好ましくは8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、又は21個のヌクレオチドに相補的である。いくつかの実施形態では、アンチセンス核酸鎖と標的領域との間に1つ又は2つのミスマッチがあり得る。好ましくは、当該アンチセンス核酸鎖は、少なくとも7個、より好ましくは8、9、10、11、又は12個の連続したヌクレオチドに相補的である。好ましくは、当該標的領域は、当該標的領域に少なくとも15、16、17、18、又は19個のヌクレオチドを含む。

10

【0131】

本発明による単離された二本鎖核酸（dsNA）の好ましい実施形態では、dsNAは、15～30ヌクレオチド長のセンス核酸鎖を含み、センス核酸鎖は、当該アンチセンス核酸鎖に相補的であり、センス及びアンチセンス核酸鎖は、二本鎖領域を形成する。好ましくは、当該dsNAは、5'末端及び3'末端を有する15～30ヌクレオチド、好ましくは19ヌクレオチド長のRNAのアンチセンス核酸鎖であって、アンチセンス核酸鎖が、好ましくは当該標的領域の少なくとも15個のヌクレオチドに相補的であり、好ましくは、RNAのセンス鎖の5'末端が、Gヌクレオチドに作動可能に連結されて、RNAの第1のセグメントを形成する、アンチセンス核酸鎖、並びに5'末端及び3'末端を有する15～30ヌクレオチド長のRNAのセンス鎖であって、好ましくはアンチセンス及びセンス鎖の少なくとも12個のヌクレオチドが、互いに相補的であり、好ましくは、生理学的条件下で、小干渉RNA（siRNA）二本鎖を形成する、センス核酸鎖を含有するshRNAである。

20

【0132】

好ましくは、アンチセンス鎖及びセンス鎖は、RNAループ鎖によって作動可能に連結されて、二本鎖構造及びループ構造を含むヘアピン構造を形成する。

【0133】

好ましくは、ループ構造は、好ましくは4～13個、より好ましくは4～10個のヌクレオチドを含有する。一実施形態では、当該ループ構造は、4、5、又は6個のヌクレオチドを含有する。好ましくは、当該ループは、配列UCAAGACを含有する。

30

【0134】

RNAの2つの鎖によって形成される二本鎖は、15～25塩基対長、好ましくは19塩基対長であり得る。アンチセンス鎖は、好ましくは、19ヌクレオチド長である。センス鎖は、好ましくは、19ヌクレオチド長である。shRNAは、オーバーハング領域を更に含有し得る。そのようなオーバーハングは、3'オーバーハング領域又は5'オーバーハング領域であり得る。オーバーハング領域は、例えば、1～6ヌクレオチド長であり得る。

【0135】

本発明は、本発明の単離されたアンチセンス分子をコードする核酸を更に提供する。好ましい実施形態では、本発明の当該shRNAは、以下の構造を有するオリゴヌクレオチドによってコードされる：フォワード5'-CCGGA A-19bpセンス鎖-TCAAGAC-19bpアンチセンス鎖-TTTTTTTTG-3'、及び／又はリバース5'-AATTC A A A A A A A-19bpセンス鎖-GTC TTGA-19bpアンチセンス鎖-TT-3'。本明細書において、センス鎖は、mRNAにおける標的化された配列と同じ配列を有し、アンチセンス鎖は、最終的にmRNAに結合し、その分解及び／又は阻害を誘導するその逆相補配列を有する。

40

【0136】

好ましくは、当該遺伝子は、LMNA、カリウム電圧ゲートドチャネルサブファミリーQメンバー1（KCNQ1）、ニューロフィブロミン1（NF1）、フィブリリン1（FBN1）、乳がん遺伝子1（BRCA1）、BRCA2、結節性硬化症複合体1（TS

50

C1)、及びTSC2遺伝子から選択される。好ましくは、当該SNPは、rs1057128、rs8234、及びrs17215465から選択される。好ましくは、当該疾患は、心不全、結節性硬化症、乳がん、神経線維腫症I型、ハンチントン病、肥大性心筋症、多発性嚢胞腎、骨形成不全症、軟骨異形成症、中心核ミオパシー、及びマルファン症候群である。好ましくは、当該心不全は、ラミノパシー、好ましくは拡張型心筋症である。

【0137】

ここで、本発明は、以下の非限定的な実施例によって例示される。

【0138】

実施例

実施例1

材料及び方法

ヒトiPSC培養

LMNA H222P変異を担持する男性患者に由来するLMNA H222P SV1122 hiPSC株は、ドイツのハンブルクにおいて生成した。UN1-22株は、健常男性に由来し、完全特徴分析は、以前に公開された(Shinnawi, 2015 Stem Cell Reports 2015; 5: 582-596.)。両株は、LMNAに位置するSNP rs4641についてヘテロ接合性である。1:500希釈成長因子低減マトリゲル(Corning, FAL356231)でコーティングされたプレート上でmTeSR-1(StemCell Technologies, 85850)における両方のhiPSC株のコロニーを培養した。細胞を、0.5mMのEDTA(Invitrogen, 15575-038)での解離を介して4~6日毎に継代し、それらを2µMのチアゾピビン(Selleck Chemicals, S1459)で補足されたmTeSR-1において再播種した。継代間で、継代後の最初の日を除き、毎日mTeSR-1培地を交換した。

【0139】

hiPSCの心臓分化

心臓分化を、わずかな適応を伴う以前に公開されたプロトコルに従って実施した(Burridge, 2014 Nat Methods 2014; 11: 855-860)。6µMのCHIR99021(Stemgent, 04-0004-10)で補足されたCDM3培地(RPMI 1640, Gibco 21875, 500µg/mlのヒト血清アルブミン, Sigma A9731, 213µg/mlのL-アスコルビン酸2リン酸塩, Sigma A8960, 1%ペニシリン/ストレプトマイシン)に2日間、続いて2µMのWnt-C59(Selleck Chemicals, S7037)を含むCDM3に2日間交換することによって、継代の3~5日後に分化を誘導した。4日目から10日目まで、培地を隔日でRPMI/B27培地(RPMI-1640, 2%B27サブプリメントマイナスインスリン(Gibco, A1895601), 1%ペニシリン/ストレプトマイシン)に交換した。自然収縮は、8日目以降に特定することができた。10日目以降、培地をhiPSC-CMについて毎週1回、1MのHEPES溶液に溶解された20mMの乳酸ナトリウム(Sigma-Aldrich, L7022)で補足された、グルコースを含まないCDM3培地(グルコースを含まないRPMI-1640, Gibco, 11879)で少なくとも2週間にわたって交換し、心筋細胞を代謝的に選択した。選択後、グルコースを含むCDM3培地で週に1回培地を交換した。

【0140】

15分間のTrypLE Express(Gibco, 12604)インキュベーションによって精製された心筋細胞の集団を解離し、それらを、更なる実験のために2µMのチアゾピビンを有するRPMI/B27におけるマトリゲルコーティングされたプレート上に播種した。分化の開始の40~60日後にhiPSC-CM上で全ての実験を行い、異なる分化からのhiPSC-CMで2~4つの独立した実験における各観察を複製した。

10

20

30

40

50

【0141】

プラスミド生成

s h R N A 発現のために、選択マーカーとしてピューロマイシンを有する p L K O . 1 骨格を使用した (p L K O . 1 p u r o 、 A d d g e n e 、 8 4 5 3) 。 s h R N A 配列のクローニングのために、以下のオリゴヌクレオチドを設計した：フォワード 5' - C C G G A A - 1 9 b p センス鎖 - T C A A G A C - 1 9 b p アンチセンス鎖 - T T T T T T T G - 3' 、及びリバー 5' - A A T T C A A A A A A A - 1 9 b p センス鎖 - G T C T T G A - 1 9 b p アンチセンス鎖 - T T - 3' 。センス鎖は、まさに m R N A 標的化配列であり、アンチセンス鎖は、最終的に m R N A に結合するその逆相補配列である。H u a n g e t a l . (2 0 1 4) に従って s h R N A 配列を設計した。1 n m o l のこれらのオリゴヌクレオチドをアニールし、それらを p L K O . 1 - p u r o プラスミドにおける A g e I 及び E c o R I 制限部位にクローニングした。s h R N A 配列は、表 1 に詳述される。全てのプラスミド配列をサンガー配列決定によって検証し、変異を含有するプラスミドを除外した。

10

【0142】

ウイルス産生

p L K O . 1 - p u r o ベースの構築物の第 3 世代レンチウイルスを産生するために、Gene jammer (A g i l e n t 、 2 0 4 1 3 0) を製造業者のプロトコルに従って使用して、 4×10^6 H E K 2 9 3 T 細胞を、4 μ g の発現プラスミド、2 . 7 μ g の p M D L g / p R R E 、1 μ g の p R S V - R e v 、1 . 4 μ g の p V S V G と共トランスフェクトした。翌日、H E K 2 9 3 T 培地を C D M 3 培地に交換した。以前の交換の 2 4 時間後に産生されたレンチウイルスを含有するこの培地を収集し、h i P S C - C M 形質導入にそのまま使用した。

20

【0143】

H i P S C - C M 感染

条件間で均質な細胞集団を確実にするために、レンチウイルス形質導入の 2 ~ 4 日前に h i P S C - C M を解離した。ウイルスを含む培地の 6 ウェルプレートにおいて 2 m l / ウェルを h i P S C - C M に新たに添加した。2 4 時間後、ウイルスを含有する培地を除去し、新鮮な C D M 3 培地で置き換えた。5 日後、培地を交換し、ピューロマイシン選択を 4 8 時間にわたって C D M 3 培地において 8 μ g / m l のピューロマイシンで開始した。ピューロマイシン選択後に細胞を採取した。

30

【0144】

RNA 単離

1 m l の T r i R e a g e n t (S i g m a A l d r i c h 、 T 9 4 2 4) を使用して、全ての試料から総 RNA を単離した。T r i R e a g e n t をディッシュ上で増殖する生細胞にそのまま添加した。製造業者のプロトコルに従って総 RNA 単離を行った。

【0145】

m R N A についての対立遺伝子特異的 q R T - P C R

各 L M N A 対立遺伝子の m R N A 発現を検出するために、2 5 0 n g ~ 1 μ g の RNA を D N A s e I 増幅グレード (I n v i t r o g e n 、 1 8 0 6 8 0 1 5) で D N A s e 処理し、製造業者のプロトコルに従ってオリゴ-d T 及びランダムヘキサマープライマーで S u p e r s c r i p t I I 逆転写酵素 (I n v i t r o g e n 、 1 8 0 6 4 0 1 4) を使用して逆転写した。c D N A を 5 回希釈し、2 μ l を q P C R の入力として使用した。

40

【0146】

q P C R を、以下のサイクリングプログラムを使用して、L i g h t C y c l e r 4 8 0 s y s t e m I I (R o c h e) で 1 μ M のプライマー (表 2) 及び L i g h t C y c l e r 4 8 0 S Y B R G r e e n m a s t e r 1 (R o c h e 、 0 4 8 8 7 3 5 2 0 0 1) を使用して行った：9 5 ° C で 5 分のプレインキュベーション、4 0 サイクルの 9 5 ° C で 1 0 秒の変性、2 0 秒のアニーリング (表 2 の温度)、及び 7 2 ° C で 2 0

50

秒の伸長。データを、LinRegPCR定量PCR分析ソフトウェア（Ruijter、2009）を使用して分析し、このソフトウェアによって推定された転写物の開始濃度を、3つの参照遺伝子GAPDH、HPRT、及びTBPの推定される開始濃度の幾何平均について補正した。

【表 1 - 1】

表 1. shRNA標的化配列

標的	shRNA 数	位置ミスマッチ	センス鎖(5' -3')	アンチセンス鎖(5' -3')
陰性 対照	175	-	GAAATGTACTGCGTGGAGA 配列番号 9	TCTCCACGCAGTACATTTC 配列番号 10
C 対立遺伝子 LMNC	209	C10	TCACCACCACGTGAGTGGT 配列番号 11	ACCACTCACGTGGTGGTGA 配列番号 12
	210	C11	CACCACCACGTGAGTGGTA 配列番号 13	TACCACTCACGTGGTGGTG 配列番号 14
	211	C12	ACCACCACGTGAGTGGTAG 配列番号 15	CTACCACTCACGTGGTGGT 配列番号 16
	212	C13	CCACCACGTGAGTGGTAGC 配列番号 17	GCTACCACTCACGTGGTGG 配列番号 18
T 対立遺伝子 LMNC	213	T9	ATCACCACCATGTGAGTGG 配列番号 19	CCACTCACATGGTGGTGAT 配列番号 20
	214	T10	TCACCACCATGTGAGTGGT 配列番号 21	ACCACTCACATGGTGGTGA 配列番号 22
	215	T11	CACCACCATGTGAGTGGTA 配列番号 23	TACCACTCACATGGTGGTG 配列番号 24
	216	T12	ACCACCATGTGAGTGGTAG 配列番号 25	CTACCACTCACATGGTGGT 配列番号 26
	217	T14	CACCATGTGAGTGGTAGCC 配列番号 27	GGCTACCACTCACATGGTG 配列番号 28
C 対立遺伝子 LMNA	230	C10	TCACCACCACGGCTCCAC 配列番号 29	GTGGGAGCCGTGGTGGTGA 配列番号 30
	231	C11	CACCACCACGGCTCCCACT 配列番号 31	AGTGGGAGCCGTGGTGGTG 配列番号 32
	232	C12	ACCACCACGGCTCCCACTG 配列番号 33	CAGTGGGAGCCGTGGTGGT 配列番号 34
	233	C13	CCACCACGGCTCCCACTGC 配列番号 35	GCAGTGGGAGCCGTGGTGG 配列番号 36

10

20

【表 1 - 2】

	234	C14	CACCACGGCTCCCACTGCA 配列番号 37	TGCAGTGGGAGCCGTGGTG 配列番号 38
	235	C17	CACGGCTCCCACTGCAGCA 配列番号 39	TGCTGCAGTGGGAGCCGTG 配列番号 40
T 対立遺伝子 LMNA	236	T9	ATCACCACCATGGCTCCCA 配列番号 41	TGGGAGCCATGGTGGTGAT 配列番号 42
	237	T10	TCACCACCATGGCTCCAC 配列番号 43	GTGGGAGCCATGGTGGTGA 配列番号 44
	238	T11	CACCACCATGGCTCCCACT 配列番号 45	AGTGGGAGCCATGGTGGTG 配列番号 46
	239	T12	ACCACCATGGCTCCCACTG 配列番号 47	CAGTGGGAGCCATGGTGGT 配列番号 48
	240	T14	CACCATGGCTCCCACTGCA 配列番号 49	TGCAGTGGGAGCCATGGTG 配列番号 50
	241	T17	CATGGCTCCCACTGCAGCA 配列番号 51	TGCTGCAGTGGGAGCCATG 配列番号 52

30

40

50

【表 2】

表 2. qRT-PCRに使用されるプライマー配列

標的(mRNA)	フォワードプライマー(5' -3')	リバースプライマー(5' -3')	アニーリング温度
C 対立遺伝子 LMNA	ACCTGCTCCATCACCACCAC 配列番号 53	AGCCGCTGGCAGATGCCTTG 配列番号 54	66
T 対立遺伝子 LMNA	ACCTGCTCCATCACCACCAT 配列番号 55	AGCCGCTGGCAGATGCCTTG 配列番号 56	66
総 LMNA	ACCTGCTCCATCACCACC 配列番号 57	AGCCGCTGGCAGATGCCTTG 配列番号 58	66
C 対立遺伝子 LMNC	ACCTGCTCCATCACCACCAC 配列番号 59	TGGCCCCAGTGCAGGCTC 配列番号 60	66
T 対立遺伝子 LMNC	ACCTGCTCCATCACCACCAT 配列番号 61	TGGCCCCAGTGCAGGCTC 配列番号 62	66
総 LMNC	ACCTGCTCCATCACCACC 配列番号 63	TGGCCCCAGTGCAGGCTC 配列番号 64	66
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC 配列番号 65	ACCCTGTTGCTGTAGCCAAATT 配列番号 66	60
HPRT	TGACACTGGCAAAACAATGCA 配列番号 67	GGTCTTTTCACCAGCAAGCT 配列番号 68	60
TBP	GCTCACCCACCAACAATTAG 配列番号 69	TCTGCTCTGACTTTAGCACCTG 配列番号 70	60

10

【0147】

結果

原因変異とは無関係に共通バリエーションを標的とする対立遺伝子特異的 siRNA によって変異体対立遺伝子をサイレンシングするという我々の仮説を試験するために、我々の 2 つのヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) 株における LMNA における共通バリエーションについて探索した。LMNA には、3 つの既知の共通一塩基多型 (SNP)、すなわち、それぞれ、21.8%、20.4%、及び 32.8% のヘテロ接合性を有する rs538089、rs505058、及び rs4641 が存在する。我々の hiPSC 株に由来するゲノム DNA を使用することによって、これら 3 つの SNP を含有する 3 つの PCR アンプリコンを配列決定し、両方の hiPSC 株が SNP rs4641 (C/T) のヘテロ接合性キャリアであり、他のバリエーションを担持しないことを見出した。この理由で、LMNA における標的化可能なバリエーションとして SNP rs4641 を選択する。

20

【0148】

SNP rs4641 は、LMNA に由来する 2 つの mRNA アイソフォーム、すなわち、ラミン A 及びラミン C の最後の共有ヌクレオチドである。両方のアイソフォームは、最初の 566 個のアミノ酸を共有するが、選択的スプライシングのために、エクソン 10 後で異なり、ラミン A はエクソン 11 及び 12 に続き、ラミン C はエクソン 10B に続く。SNP rs4641 は、両方のアイソフォームの最後の共有ヌクレオチドであるため、アイソフォーム特異的 siRNA を設計する必要があった。更に、LMNA 変異は、SNP の両方の対立遺伝子 (C 又は T 対立遺伝子) 上に位置することができ、両方のラミン A 及びラミン C アイソフォーム上の両方の SNP 対立遺伝子について siRNA が必要であることを意味する。siRNA の設計に関する文献及び獲得された知識に基づいて、各アイソフォームの各対立遺伝子について構築物を設計した (図 1 を参照されたい)。ショートヘアピン RNA (shRNA) を使用する遺伝子療法を介して我々の構築物を送達することを想定しているので、我々の実験では shRNA を使用して、ヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞 (hiPSC-CM) における shRNA の効果を即座に試験した。

30

40

【0149】

ラミン C を下方調節するための shRNA の対立遺伝子特異的効果は観察されなかった

まず、LMNA H222P hiPSC-CM におけるラミン C の C 対立遺伝子を標的とする我々の shRNA の試験を開始した。予想通り、ラミン A アイソフォームの C 又は T 対立遺伝子のいずれかの下方調節を観察せず、ラミン C の C 対立遺伝子に向けて我々の設計した shRNA がアイソフォーム特異的であることを示した (図 2、パネル A)。shRNA C11 によるラミン C の C 対立遺伝子の下方調節を観察した (図 2、パネル B)。しかしながら、この shRNA によるラミン C の T 対立遺伝子の下方調節も観察し、この shRNA が対立遺伝子特異的ではないことを示した。全ての他の試験された sh

50

RNAは、いずれの下方調節も示さなかった（図2、パネルB）。

【0150】

次に、LMNA H222P hiPSC-CMにおけるラミンCのT対立遺伝子を標的とする我々のshRNAの試験に進んだ。また、これらのshRNAは、ラミンAアイソフォームの下方調節が観察されないため、アイソフォーム特異的である（図2、パネルC）。shRNA T14によるラミンCのT対立遺伝子の下方調節を観察した（図2、パネルD）。しかしながら、この効果は、ラミンCのC対立遺伝子に同じ量の下方調節が観察されるため、対立遺伝子特異的ではない。全ての他の試験されたshRNAは、いずれの下方調節も示さなかった（図2、パネルD）。

【0151】

結論として、C対立遺伝子又はT対立遺伝子のいずれかを標的とする我々の設計したshRNAはいずれも、ラミンCの対立遺伝子特異的下方調節を示さなかった。

【0152】

shRNA C17及びT17は、ラミンAのアイソフォーム及び対立遺伝子特異的下方調節をもたらす

次に、ラミンAのC対立遺伝子を標的とすることで開始して、ラミンAアイソフォームの対立遺伝子を標的とするshRNAを試験した。LMNA H222P hiPSC-CMにおけるラミンAの標的化されたC対立遺伝子の40%のshRNA C17による下方調節を観察した（図3、パネルA）。更に、この効果は、ラミンAのT対立遺伝子の下方調節を観察しなかったため、対立遺伝子特異的である。また、shRNA C17は、いずれのラミンC対立遺伝子の下方調節も示さなかったため、対立遺伝子特異的効果は、アイソフォーム特異的でもある（図3、パネルB）。全ての他の試験されたshRNAは、ラミンA又はラミンC下方調節も示さなかった。その後、健常hiPSC-CMにおいて同じshRNAを試験した。ラミンAの標的化されたC対立遺伝子の50%のここで更により高い下方調節を伴うshRNA C17の同じ効果を観察した（図3、パネルC及びD）。しかしながら、ここでラミンAのT対立遺伝子に対するわずかな効果も観察した。

【0153】

最後に、ラミンAのT対立遺伝子を標的とするshRNAを試験した。LMNA H222P hiPSC-CMにおいてshRNA T17によって得られた53%の下方調節を観察した（図4、パネルA）。より重要なことに、この観察された効果は、対立遺伝子特異的であり、アイソフォーム特異的である（図4、パネルB）。他の試験されたshRNAは、下方調節を示さなかった。以前と同様に、健常hiPSC-CMにおいて同じshRNAを試験した。同様に、shRNA T17は、55%のアイソフォーム及び対立遺伝子特異的下方調節を示した（図4、パネルC及びD）。

【0154】

結論として、2つの異なるhiPSC-CM株において約50%の効率でラミンAのSNP rs4641のC又はT対立遺伝子のいずれかをアイソフォーム及び対立遺伝子特異的に下方調節する2つのshRNAを見出した。

【0155】

shRNA T17での変異体H222P対立遺伝子の下方調節は、核円形度を改善する核表現型に対するshRNA C17及びT17によるC対立遺伝子又はT対立遺伝子のいずれかの下方調節の効果を評価するために、H222P hiPSC-CMを、陰性対照shRNA、shRNA C17（C対立遺伝子の下方調節）、及びshRNA T17（T対立遺伝子の下方調節）で処理した。H222P株のcDNA上のSNP及び変異の両方を囲むLMNA PCR産物のプラスミドクローニング並びに細菌クローンのサンガー配列決定は、ヘテロ接合性H222P変異がrs4641のT対立遺伝子と同じ対立遺伝子上に位置することを明らかにした。したがって、H222P hiPSC-CMにおけるrs4641C対立遺伝子の下方調節は、表現型を悪化させると予想される野生型対立遺伝子の下方調節をもたらすが、rs4641 T対立遺伝子の下方調節は、変異

10

20

30

40

50

体対立遺伝子を下方調節し、表現型を軽減すると予想される。

【0156】

LMNAは、核膜を支持する核ラミナをコードするため、LMNAは、核構造にとって重要である。したがって、核形状は、細胞がある特定の変異によってどれほど深刻に影響されるかの尺度である。細胞の核円形度に対する野生型又は変異体対立遺伝子のいずれかのshRNAベースの下方調節の効果を評価した。陰性対照と比較して2つの異なる条件での処理後の核円形度を測定した。野生型対立遺伝子の下方調節後の核円形度の減少を観察しなかった。しかしながら、rs4641 T対立遺伝子及びそれによる変異体対立遺伝子の治療的にはるかに興味深い下方調節は、核円形度を有意に改善した ($p < 0.001$)。図5を参照されたい。よって、T対立遺伝子の下方調節、及びそれによってshRNA T17によってH222P変異体対立遺伝子を下方調節することは、LMNA H222P hiPSC-CMにおける核円形度の改善をもたらし、これは、これらのLMNA H222P hiPSC-CMが、SNP rs4641のshRNA標的化による変異体対立遺伝子の下方調節後の変異によってより軽度の影響を受けることを示す。

10

【0157】

実施例2

材料及び方法

以下の付加とともに実施例1を参照されたい。

hiPSCの心臓分化を、記載されるように、又は0日目の3mL CDM3培地中の6マイクロM CHIR99021、1日目の2mL CDM3培地の添加、2日目の別の1mL CDM3培地の添加、及び3日目のCDM3中の2マイクロM WNT-C59からなる、CHIR希釈プロトコルに従って行った。4日目又は5日目（希釈なし対希釈プロトコル）から10日目まで、培地を隔日でRPMI/B27培地（RPMI-1640、2% B27サプリメントマイナスインスリン（Gibco、A1895601）、1% ペニシリン／ストレプトマイシン）に交換した。

20

【0158】

心筋細胞を、15～45分間のTrypLE Express（Gibco、12604）インキュベーションによって解離し、その後それらを、更なる実験のために2μMのチアゾピピンを有するRPMI/B27中のマトリゲルコーティングされたプレート上に播種した。

30

【0159】

プラスミド生成のために、Huang et al. (2014)に従ってshRNA配列を設計し、miRNAのそれらの標的との既知の相互作用領域及び元のshRNA選択の結果に基づいてミスマッチを付加した。qRT-PCRに使用される追加のshRNA標的化配列及びプライマー配列は、それぞれ、表3及び4に含まれる。

【0160】

結果

対立遺伝子特異的標的化のためのSNP特定

共通SNPを標的とすることによってLMNAの対立遺伝子特異的下方調節を可能にするために、これらが最も高いマイナー対立遺伝子頻度(MAF)を有すると予想されるため、LMNAのコード領域を同義SNPについて検索した。その結果、最高数の患者は、これらのSNPについてヘテロ接合性であり、これは、対立遺伝子特異的標的化を可能にする。この検索は、LMNAにおける3つの同義SNP (rs538089、rs505058、及びrs4641)を明らかにし、Genome Aggregation Database (gnomAD) 集団におけるMAFは、それぞれ、18%、24%、及び21%であった。これらのMAFは、ハーディー-ワインベルグ平衡によれば、患者の29%が、SNP rs538089についてヘテロ接合性、rs505058について36%ヘテロ接合性、SNP rs4641について33%であるべきであることを示す。これは、これらのそれぞれのSNPを標的とすることが、疾患を引き起こす変異とは無関係に、同様の量のLMNA患者を治療することを可能にするであろうことを意味する。

40

50

アムステルダムUMC外来クリニックからの8人のLMNA変異キャリア、及びLMNAにおけるH222P変異を有するhiPSC株を、これらのSNPのヘテロ接合性についてスクリーニングし、これは、5人の患者及びhiPSC株がrs4641についてヘテロ接合性であり、rs538089又はrs505058についてヘテロ接合性がないことを明らかにした。したがって、対立遺伝子特異的shRNAアプローチをSNP rs4641に集中させた。

【0161】

LMNA及びLMNCにおけるrs4641の両方の対立遺伝子に対する対立遺伝子特異的shRNAの設計

LMNA遺伝子は、最初の566個のアミノ酸をコードする配列を共有する、2つのmRNAスプライスアイソフォーム、LMNA及びLMNCについてコードする。エクソン10における選択的スプライシングは、それらのC末端における2つのアイソフォーム間の差異をもたらし、LMNCアイソフォームは、スプライシングされず、エクソン10の末端で終了するが、LMNAアイソフォームは、エクソン10の中央のスプライス部位を使用して、エクソン11及び12に向かってスプライシングする（図1及び6）。SNP rs4641は、2つのアイソフォーム間で共有される最後のヌクレオチドに位置する。これは、両方の対立遺伝子を区別するヌクレオチドがsiRNAの中央に位置するときに最も高い対立遺伝子特異性が得られることを示した、Huang et al. (Huang et al., 2009. Nucleic Acids Res 37:7560-7569) のデータと組み合わせて、LMNA及びLMNCの両方を別々に標的とする対立遺伝子特異的siRNAを設計する必要があることを示す。更に、SNPのT対立遺伝子及びC対立遺伝子の両方が異なる患者における変異体対立遺伝子上に存在し得るため、SNP rs4641の両方の対立遺伝子を標的とするsiRNAを設計する必要がある。Huang et al. のデータに基づいて、10、11、12、13、14、及び17位で標的化されていないT対立遺伝子にミスマッチを有するLMNAのC対立遺伝子を標的すると予測される6つのsiRNA、並びに9、10、11、12、14、及び17位で標的化されていないC対立遺伝子にミスマッチを有するLMNAのT対立遺伝子を標的すると予測される6つのsiRNAを選択した（図6）。同様のアプローチを使用して、10、11、12、13、及び17位で標的化されていないT対立遺伝子にミスマッチを有するLMNCのC対立遺伝子を標的すると予測される5つのsiRNA、並びに9、10、11、12、14、16、及び17位で標的化されていないC対立遺伝子にミスマッチを有するLMNCのT対立遺伝子を標的すると予測される7つのsiRNAを選択した（図6）。ウイルス媒介shRNA発現を介したこれらのsiRNAの治療的送達を想定するため、図7に示される設計に従って、これらのsiRNAをウイルスshRNA構築物としてもインビトロで発現した。

【0162】

LMNAアイソフォームにおけるrs4641の対立遺伝子特異的標的化

shRNAを試験するために、H222P hiPSC株に由来する心筋細胞をレンチウイルス形質導入した。この株は、骨格筋及び心筋の両方に影響を及ぼす、エメリードレイフスー筋ジストロフィー表現型を有する男性患者に由来する（Bonne et al., 2000. Ann Neurol 48:170-80）。レンチウイルスshRNA形質導入後、変異体及び野生型LMNA対立遺伝子の対立遺伝子特異的qRT-PCR発現レベルによって、スクランブル陰性対照shRNA (Scr) で形質導入された細胞における発現レベルと比較した。野生型LMNA対立遺伝子上のこのH222P hiPSC株に存在する、LMNAスプライスアイソフォームにおけるrs4641のC対立遺伝子を標的とすることは、1つのshRNA、shC17を明らかにし、これは野生型LMNA対立遺伝子をほぼ50%、標的化されていない変異体対立遺伝子をわずか10%下方調節した（図8A）。H222P変異を含む、LMNAにおけるほとんどの変異は、ドミナントネガティブ作用様式を有し、これは、変異対立遺伝子が野生型対立遺伝子の機能に干渉することを意味するため、野生型とそのような変異対立遺伝子との間の対立遺伝

子均衡は、疾患重症度を決定する。したがって、rs4641のC対立遺伝子の標的化が、両方のLMNA対立遺伝子間の対立遺伝子均衡にどの程度影響したかも調査した（図8B）。これは、SCR陰性対照細胞におけるこの実験において、両方の対立遺伝子のほぼ等しい発現（52：48%）を明らかにし、これはshC17によって形質導入された細胞において、標的化された野生型LMNA対立遺伝子の相対的な過小発現（40：60%）にシフトした。驚いたことに、他のshRNAは、いずれのLMNA対立遺伝子も下方調節しなかったが、代わりに、野生型及び変異体LMNA対立遺伝子の両方の上方調節をもたらした。これらのshRNAによってLMNAスプライスアイソフォームのみを標的としているが、LMNC上で対立遺伝子特異的qRT-PCRも行い、これは、いずれのLMNC対立遺伝子の下方調節もなく、よって変異体及び野生型LMNCアイソフォーム間の均衡に対する強い効果もないことを明らかにした（図8C/D）。

10

【0163】

以前の研究は、shRNAのシード領域又はアルゴノート認識領域における追加のミスマッチの導入が、標的化された及び標的化されていない対立遺伝子間の区別を改善することができることを示唆した。LMNAについてshC17によるLMNAスプライスアイソフォームのrs4641の標的化されていないT対立遺伝子の10%ノックダウンを有したため、この標的化を更に低減する試みにおいて、このshC17配列に余分なミスマッチを加えた。シード領域の5、6、及び7位、並びにアルゴノート認識領域の10、及び11位にミスマッチを加えた（図9）。GC含有量が安定であるような方法でshRNAにおけるヌクレオチドを変化させたが、他の変化が同様の効果を有すると予想する。元のshC17配列及び追加のミスマッチを有するshRNAの形質導入後の対立遺伝子特異的qRT-PCRは、shC17mm5が、LMNAアイソフォームにおけるrs4641の標的化されたC対立遺伝子の下方調節をより強く誘導したが、標的化されていないT対立遺伝子のより強い下方調節も誘導したことを明らかにした（図10A）。これは、元のC17配列と比較した対立遺伝子均衡におけるわずかに強いシフトをもたらした（36：63% shC17mm5及び39：61% shC17、図10B）。興味深いことに、shC17mm7は、標的化された対立遺伝子よりも強い標的化されていない対立遺伝子の上方調節によって誘導された、LMNAの同等の対立遺伝子不均衡（40：60%）をもたらした。LMNAスプライスアイソフォームを標的とするこれらのshRNAが、LMNCスプライスアイソフォームレベルに影響を及ぼさなかったことを再度示した。変異体対立遺伝子の絶対レベル又は対立遺伝子不均衡が、患者における疾患重症度及び我々のhiPSC-CMにおける表現型を決定する最も重要な因子であることを更に研究するために、shC17、shC17mm5、及びshC17mm7を更に研究し、hiPSC-CMにおける疾患表現型に対するそれらの効果を比較することを決定した。

20

30

【0164】

SNPの両方の対立遺伝子は、異なる患者における変異体LMNA対立遺伝子上に存在し得るため、我々のH222P hiPSC-CMにおいて変異体対立遺伝子上に存在する、LMNAにおけるrs4641のT対立遺伝子も標的とした。これは、標的化されたT対立遺伝子を53%、標的化されていない対立遺伝子を8%下方調節する、shT17という1つのshRNAを明らかにし（図11A）、一方で同様に全ての他のshRNAは、両方のLMNA対立遺伝子の上方調節を誘導した。標的化された対立遺伝子のこの53%下方調節はまた、SCR陰性対照形質導入細胞における45：55%からshT17形質導入細胞における61：39%比への対立遺伝子均衡のシフトをもたらし、これらの細胞において、比が、変異体対立遺伝子の小さな相対的過剰発現から、shT17による変異体対立遺伝子の相対的過小発現へとシフトしたことを意味する（図11B）。また、LMNAスプライスアイソフォームのT対立遺伝子を標的とするshRNAは、LMNCスプライスアイソフォームの対立遺伝子不均衡に影響を及ぼさなかった。また、同様にシード領域の5、6、及び7位、並びにアルゴノート認識領域の10、及び11位で、shT17配列に余分なミスマッチを加えた。興味深いことに、shC17配列へのこれらのミスマッチの付加と同様の効果を観察した（図9）。同様に5位のミスマッチは、標的化

40

50

されたT対立遺伝子の下方調節をより強く、最大83%までも誘導したが、44%まで標的化されていないC対立遺伝子の下方調節もより強く誘導した。7位のミスマッチは、この実験における元のT17配列と同様の下方調節(20%)をもたらしたが、同様に標的化されていないC対立遺伝子の強い上方調節をもたらした(図12A)。結果として、5位及び7位にミスマッチを有する両方のshRNA(76:24%及び74:26%)は、元のT17配列(70:30%、図12B)と比較して、対立遺伝子不均衡に対するより強い効果をもたらした。同様にこれらのshRNAは、LMNCの対立遺伝子不均衡に影響を及ぼさなかった(図12C/D)。変異体対立遺伝子の絶対レベル又は対立遺伝子不均衡が、患者における疾患重症度及び我々のhiPSC-CMにおける表現型を決定する最も重要な因子であるかという同じ質問のために、shT17、shT17mm5、及びshT17mm7を更に研究し、hiPSC-CMにおける疾患表現型に対するそれらの効果を比較することを決定した。

10

【0165】

LMNCアイソフォームにおけるrs4641の対立遺伝子特異的標的化

LMNCを標的とするshRNAを試験するために、H222P hiPSC株に由来する心筋細胞をこれらのshRNAでレンチウイルス形質導入され、変異体及び野生型LMNC対立遺伝子の対立遺伝子特異的qRT-PCR発現レベルによって、スクランブル陰性対照shRNA(Scr)で形質導入された細胞における発現レベルと比較した。野生型LMNC対立遺伝子上のこのH222P hiPSC株に存在する、LMNCスプライスアイソフォームにおけるrs4641のC対立遺伝子を標的とすることは、それぞれC対立遺伝子の31%、6%、及び16%ノックダウンを有する3つのshRNA、shC11、shC13、及びshC17を明らかにした(図13)。しかしながら、shC11はまた、標的化されていないT対立遺伝子の30%ノックダウン、shC17は、6%を有した。これは、スクランブル形質導入細胞における48:51%から、shC11では59:41%、shC13では57:43%、及びshC17では36:64%まで対立遺伝子均衡における小さなシフトをもたらした。また、LMNA発現レベルに対するこれらのshRNAの効果を決定し、shC11も非対立遺伝子特異的にLMNAアイソフォームを25%阻害し、shC17はC及びT対立遺伝子の両方のレベルを増加させたが、T対立遺伝子をより大きな程度増加させ、これはしたがってLMNAの対立遺伝子均衡におけるわずかなシフト(SCRにおける48:52%からshC17における43:57%)をもたらしたことに気づいた。これは、shC17が、両方のスプライスアイソフォームに影響を及ぼし得る良好な候補であり得ることを意味する。上述のLMNCアイソフォームを標的とするshC17に付加されたミスマッチの結果を考慮すると、LMNCアイソフォームを標的とするshC17にミスマッチ5及び7を付加することは、LMNCの対立遺伝子特異的標的化又は対立遺伝子不均衡誘導を更に改善することもでき、それが即座にLMNAにも影響を及ぼす可能性を有し、これは両方のスプライスアイソフォームを別々に標的とする必要性を低減し得ると推測する。

20

30

【0166】

LMNCアイソフォームのC対立遺伝子を標的とするshC11及びshC13による対立遺伝子特異的標的化を更に改善するために、これらのshRNA配列にミスマッチを付加した(図14)。shC11に付加されたミスマッチは、加えて、標的化された又は標的化されていないLMNC対立遺伝子の下方調節をもたらさず(図15)、shC11mm5は、標的化されていない対立遺伝子においてより強かった小さな上方調節をもたらし、これは、わずかにより強い対立遺伝子不均衡をもたらした(40:60% scr、36:64% shC11、及び30:70% shC11mm5)。C13 shRNA配列へのミスマッチの付加は、shC13mm17についての標的化されたC対立遺伝子のより強い下方調節をもたらした(図16)。しかしながら、標的化されていない対立遺伝子の下方調節は、ほぼ同等に強く、これは、元のC13 shRNAとshC13mm17との間に同等の対立遺伝子均衡をもたらした(66:34%対65:35%)。しかしながら、shRNAを標的とするLMNA上で行われたフェノタイピング結果に応じ

40

50

て、変異体対立遺伝子の絶対レベルの喪失が対立遺伝子均衡に対する効果よりも重要であることが判明する場合、この s h C 1 3 m m 1 7 は、更なるフェノタイピングのための興味深い候補であり得る。

【 0 1 6 7 】

同様に r s 4 6 4 1 の両方の対立遺伝子が異なる患者における変異体対立遺伝子上に存在し得るため、L M N C アイソフォームにおける r s 4 6 4 1 の T 対立遺伝子を標的とする s h R N A も試験した。これは、標的化された T 対立遺伝子を s h T 1 4 について 3 3 % 及び s h T 1 7 について 2 2 % 下方調節することができる 2 つの s h R N A を明らかにし、それらはまた、標的化されていない C 対立遺伝子をそれぞれ 2 0 % 及び 1 5 % 下方調節した。驚くべきことに、s h T 1 7 の対立遺伝子不均衡は、より強く下方調節された標的化された T 対立遺伝子の相対過剰発現 (s c r の 4 0 : 6 0 % 対 4 3 : 5 7 %) に向かってシフトした。s h T 1 4 は、対立遺伝子不均衡を、予想される方向で、標的化された T 対立遺伝子の相対的過小発現へシフトさせた (5 1 : 4 9 % 、図 1 7) 。両方の s h R N A は、L M N A スプライスアイソフォームの対立遺伝子不均衡に影響を及ぼさなかった。L M N C アイソフォームを標的とする s h T 1 7 に追加のミスマッチを付加しなかったが、L M N A スプライスアイソフォームを標的とする s h T 1 7 にミスマッチの付加後に観察された効果に基づいて、ミスマッチ 5 及び 7 はまた、s h T 1 7 による標的化を改善することができると想像することができる。s h T 1 4 (図 1 8) に追加のミスマッチを付加し、これは、標的化された T 対立遺伝子をより強く阻害するか、又は対立遺伝子不均衡に更に影響を及ぼすことができた s h R N A はないことを明らかにした。

【 表 3 - 1 】

表 3. 追加の s h R N A 標的化配列

標的	shRNA 番号	位置ミスマッチ	センス鎖(5' -3')	アンチセンス鎖(5' -3')
C 対立遺伝子 LMNC	324	C17	CACGTGAGTGGTAGCCGCC 配列番号 179	GGCGGCTACCACTCACGTG 配列番号 180
	327	C11mm5	CACCACCACGTGAGaGGTA 配列番号 181	TACCTCTCACGTGGTGGTG 配列番号 182
	328	C11mm6	CACCACCACGTGAcTGGTA 配列番号 183	TACCAgTCACGTGGTGGTG 配列番号 184
	329	C11mm7	CACCACCACGTGtGTGGTA 配列番号 185	TACCACaCACGTGGTGGTG 配列番号 186
	330	C11mm13	CACCACgACGTGAGTGGTA 配列番号 187	TACCACTCACGTgGTGGTG 配列番号 188
	331	C11mm17	CAGCACCACGTGAGTGGTA 配列番号 189	TACCACTCACGTGGTGeTG 配列番号 190
	332	C13mm5	CCACCACGTGAGTGeTAGC 配列番号 191	GCTAgCACTCACGTGGTGG 配列番号 192
	333	C13mm6	CCACCACGTGAGTcTAGC 配列番号 193	GCTACgACTCACGTGGTGG 配列番号 194
	334	C13mm7	CCACCACGTGAGaGGTAGC 配列番号 195	GCTACCTCACGTGGTGG 配列番号 196
T 対立遺伝子 LMNC	325	T16	CCATGTGAGTGGTAGCCGC 配列番号 197	GCGGCTACCACTCACATGG 配列番号 198
	326	T17	CATGTGAGTGGTAGCCGCC 配列番号 199	GGCGGCTACCACTCACATG 配列番号 200
	342	T14mm5	CACCATGTGAGTGGaAGCC 配列番号 201	GGCTtCCACTCACATGGTG 配列番号 202
	343	T14mm6	CACCATGTGAGTGeTAGCC 配列番号 203	GGCTAgCACTCACATGGTG 配列番号 204
	344	T14mm7	CACCATGTGAGTcTAGCC 配列番号 205	GGCTACgACTCACATGGTG 配列番号 206
	345	T14mm10	CACCATGTGtGTGGTAGCC 配列番号 207	GGCTACCACaCACATGGTG 配列番号 208

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

	346	T14mm11	配列番号 207 CACCATGTcAGTGGTAGCC 配列番号 209 配列番号 200	配列番号 208 GGCTACCACTgACATGGTG 配列番号 210
	347	T14mm17	CAGCATGTGAGTGGTAGCC 配列番号 211	GGCTACCACTCACATGcTG 配列番号 212
	325	T16	CCATGTGAGTGGTAGCCGC 配列番号 213	GCGGCTACCACTCACATGG 配列番号 214
C 対立遺伝子 LMNA	314	C17mm5	CACGGCTCCCAGTGGAGCA 配列番号 215	TGCTCCAGTGGGAGCCGTG 配列番号 216
	315	C17mm6	CACGGCTCCCAGTCCAGCA 配列番号 217	TGCTGGAGTGGGAGCCGTG 配列番号 218
	316	C17mm7	CACGGCTCCCAGCAGCA 配列番号 219	TGCTGCTGTGGGAGCCGTG 配列番号 220
	317	C17mm10	CACGGCTCCGACTGCAGCA 配列番号 221	TGCTGCAGTCGGAGCCGTG 配列番号 222
	318	C17mm11	CACGGCTCGCACTGCAGCA 配列番号 223	TGCTGCAGTCGAGCCGTG 配列番号 224
T 対立遺伝子 LMNA	319	T17mm5	CATGGCTCCCAGTGGAGCA 配列番号 225	TGCTCCAGTGGGAGCCATG 配列番号 226
	320	T17mm6	CATGGCTCCCAGTCCAGCA 配列番号 227	TGCTGGAGTGGGAGCCATG 配列番号 228
	321	T17mm7	CATGGCTCCCAGCAGCA 配列番号 229	TGCTGCTGTGGGAGCCATG 配列番号 230
	322	T17mm10	CATGGCTCCGACTGCAGCA 配列番号 231	TGCTGCAGTCGGAGCCATG 配列番号 232
	323	T17mm11	CATGGCTCGCACTGCAGCA 配列番号 233	TGCTGCAGTCGAGCCATG 配列番号 234

10

【表 4 - 1】

表 4. O l i g o は、p L K O - p u r o プラスミドにおけるそれぞれの s h R N A をクローニングするために使用される。フォワードプライマーは、クローニングのために添加されたオーバーハングを有する完全な s h R N A 配列を含有する。s h R N A は、5 / 6 位の小文字 a a で始まり、小文字 t ストレッチで終わる。参照：参照番号。F w : フォワード。R v : リバース。

参照	標的遺伝子	名称	方向	配列番号	配列
314	LMNA	C17m5	fw rv	235 236	ecggaaCACGGCTCCCAGTGGAGCAAtcaagacTGCTCCAGTGGGAGCCGTGtttttttg aattcaaaaaaaaaCACGGCTCCCAGTGGAGCAgctettgaTGCTCCAGTGGGAGCCGTGtt
315	LMNA	C17m6	fw rv	237 238	ecggaaCACGGCTCCCAGTCCAGCAAtcaagacTGCTGGAGTGGGAGCCGTGtttttttg aattcaaaaaaaaaCACGGCTCCCAGTCCAGCAgctettgaTGCTGGAGTGGGAGCCGTGtt
316	LMNA	C17m7	fw rv	239 240	ecggaaCACGGCTCCCAGCAGCAGCAAtcaagacTGCTGCTGTGGGAGCCGTGtttttttg aattcaaaaaaaaaCACGGCTCCCAGCAGCAGCAgctettgaTGCTGCTGTGGGAGCCGTGtt
317	LMNA	C17m10	fw rv	241 242	ecggaaCACGGCTCCGACTGCAGCAAtcaagacTGCTGCAGTCGGAGCCGTGtttttttg aattcaaaaaaaaaCACGGCTCCGACTGCAGCAgctettgaTGCTGCAGTCGGAGCCGTGtt
318	LMNA	C17m11	fw rv	243 244	ecggaaCACGGCTCGCACTGCAGCAAtcaagacTGCTGCAGTCGAGCCGTGtttttttg aattcaaaaaaaaaCACGGCTCGCACTGCAGCAgctettgaTGCTGCAGTCGAGCCGTGtt
319	LMNA	T17m5	fw rv	245 246	ecggaaCATGGCTCCCAGTGGAGCAAtcaagacTGCTCCAGTGGGAGCCATGtttttttg aattcaaaaaaaaaCATGGCTCCCAGTGGAGCAgctettgaTGCTCCAGTGGGAGCCATGtt
320	LMNA	T17m6	fw rv	247 248	ecggaaCATGGCTCCCAGTCCAGCAAtcaagacTGCTGGAGTGGGAGCCATGtttttttg aattcaaaaaaaaaCATGGCTCCCAGTCCAGCAgctettgaTGCTGGAGTGGGAGCCATGtt
321	LMNA	T17m7	fw rv	249 250	ecggaaCATGGCTCCCAGCAGCAGCAAtcaagacTGCTGCTGTGGGAGCCATGtttttttg aattcaaaaaaaaaCATGGCTCCCAGCAGCAGCAgctettgaTGCTGCTGTGGGAGCCATGtt
322	LMNA	T17m10	fw rv	251 252	ecggaaCATGGCTCCGACTGCAGCAAtcaagacTGCTGCAGTCGGAGCCATGtttttttg aattcaaaaaaaaaCATGGCTCCGACTGCAGCAgctettgaTGCTGCAGTCGGAGCCATGtt
323	LMNA	T17m11	fw rv	253 254	ecggaaCATGGCTCGCACTGCAGCAAtcaagacTGCTGCAGTCGAGCCATGtttttttg aattcaaaaaaaaaCATGGCTCGCACTGCAGCAgctettgaTGCTGCAGTCGAGCCATGtt
324	LMNC	C17	fw rv	255 256	ecggaaCACGTGAGTGGTAGCCGCCAtcaagacGGCGGCTACCACTCACGTGtttttttg aattcaaaaaaaaaCACGTGAGTGGTAGCCGCCgctttgaGGCGGCTACCACTCACGTGtt

30

40

50

【表 4 - 2】

325	LMNC	T16	fw	257	ccggaaCCATGTGAGTGGTAGCCGCTcaagacGCGGCTACCACTCACATGGTTTTTg
			rv	258	aattcaaaaaaaCCATGTGAGTGGTAGCCGCgtcttgaGCGGCTACCACTCACATGGTt
326	LMNC	T17	fw	259	ccggaaCATGTGAGTGGTAGCCGCTcaagacGGCGGCTACCACTCACATGGTTTTTg
			rv	260	aattcaaaaaaaCATGTGAGTGGTAGCCGCCgtcttgaGGCGGCTACCACTCACATGt
327	LMNC	C11mm5	fw	261	ccggaaCACCACCACGTGAGaGGTAtcaagacTACCtCTACGTGGTGGTGGTTTTTg
			rv	262	aattcaaaaaaaCACCACCACGTGAGaGGTAgctttgaTACCtCTACGTGGTGGTGGTt
328	LMNC	C11mm6	fw	263	ccggaaCACCACCACGTGAcTGGTAtcaagacTACCAGTCACGTGGTGGTGGTTTTTg
			rv	264	aattcaaaaaaaCACCACCACGTGAcTGGTAgctttgaTACCAGTCACGTGGTGGTGGTt
329	LMNC	C11mm7	fw	265	ccggaaCACCACCACGTGtGTGGTAtcaagacTACCACaCACGTGGTGGTGGTTTTTg
			rv	266	aattcaaaaaaaCACCACCACGTGtGTGGTAgctttgaTACCACaCACGTGGTGGTGGTt
330	LMNC	C11mm13	fw	267	ccggaaCACCACgACGTGAGTGGTAtcaagacTACCACtCACGTGGTGGTGGTTTTTg
			rv	268	aattcaaaaaaaCACCACgACGTGAGTGGTAgctttgaTACCACtCACGTGGTGGTGGTt
331	LMNC	C11mm17	fw	269	ccggaaCAgCACCACGTGAGTGGTAtcaagacTACCACtCACGTGGTGGTGGTTTTTg
			rv	270	aattcaaaaaaaCAgCACCACGTGAGTGGTAgctttgaTACCACtCACGTGGTGGTGGTt
332	LMNC	C13mm5	fw	271	ccggaaCCACCACGTGAGTgGTAGCtcaagacGCTAgCACTCACGTGGTGGTGGTTTTTg
			rv	272	aattcaaaaaaaCCACCACGTGAGTgGTAGCgtcttgaGCTAgCACTCACGTGGTGGTGGTt
333	LMNC	C13mm6	fw	273	ccggaaCCACCACGTGAGTGTAGCtcaagacGCTACgACTCACGTGGTGGTGGTTTTTg
			rv	274	aattcaaaaaaaCCACCACGTGAGTGTAGCgtcttgaGCTACgACTCACGTGGTGGTGGTt
334	LMNC	C13mm7	fw	275	ccggaaCCACCACGTGAGaGGTAGCtcaagacGCTACCtCTCACGTGGTGGTGGTTTTTg
			rv	276	aattcaaaaaaaCCACCACGTGAGaGGTAGCgtcttgaGCTACCtCTCACGTGGTGGTGGTt
335	LMNC	C13mm11	fw	277	ccggaaCCACCACGaGAGTGGTAGCtcaagacGCTACCACtCTCGTGGTGGTGGTTTTTg
			rv	278	aattcaaaaaaaCCACCACGaGAGTGGTAGCgtcttgaGCTACCACtCTCGTGGTGGTGGTt
336	LMNC	C13mm17	fw	279	ccggaaCCtCCACGTGAGTGGTAGCtcaagacGCTACCACtCACGTGGaGGTTTTTg
			rv	280	aattcaaaaaaaCCtCCACGTGAGTGGTAGCgtcttgaGCTACCACtCACGTGGaGGTt
342	LMNC	T14mm5	fw	281	ccggaaCACCATGTGAGTGaAGCCtcaagacGGCTtCCACTCACATGGTGGTTTTTg
			rv	282	aattcaaaaaaaCACCATGTGAGTGaAGCCgtcttgaGGCTtCCACTCACATGGTGGTt
343	LMNC	T14mm6	fw	283	ccggaaCACCATGTGAGTGtTAGCCtcaagacGGCTAgCACTCACATGGTGGTTTTTg

10

20

【表 4 - 3】

			rv	284	aattcaaaaaaaCACCATGTGAGTGtTAGCCgtcttgaGGCTAgCACTCACATGGTGGTt
344	LMNC	T14mm7	fw	285	ccggaaCACCATGTGAGTGTAGCCtcaagacGGCTACgACTCACATGGTGGTGGTTTTTg
			rv	286	aattcaaaaaaaCACCATGTGAGTGTAGCCgtcttgaGGCTACgACTCACATGGTGGTGGTt
345	LMNC	T14mm10	fw	287	ccggaaCACCATGTGtGTGGTAGCCtcaagacGGCTACCACaCACATGGTGGTGGTTTTTg
			rv	288	aattcaaaaaaaCACCATGTGtGTGGTAGCCgtcttgaGGCTACCACaCACATGGTGGTt
346	LMNC	T14mm11	fw	289	ccggaaCACCATGTGTAGTGGTAGCCtcaagacGGCTACCACtGACATGGTGGTGGTTTTTg
			rv	290	aattcaaaaaaaCACCATGTGTAGTGGTAGCCgtcttgaGGCTACCACtGACATGGTGGTt
347	LMNC	T14mm17	fw	291	ccggaaCAgCATGTGAGTGGTAGCCtcaagacGGCTACCACtCACATGtGGTTTTTg
			rv	292	aattcaaaaaaaCAgCATGTGAGTGGTAGCCgtcttgaGGCTACCACtCACATGtGGTt

30

40

【0168】

(付記)

(付記 1)

哺乳動物細胞における LMNA 遺伝子の対立遺伝子特異的発現を阻害低減することができる単離されたアンチセンス分子であって、前記アンチセンス分子が、前記 LMNA 遺伝子によってコードされる転写物の標的領域に実質的に相補的であるアンチセンス核酸鎖を含み、前記アンチセンス核酸鎖が、前記標的領域における SNP rs538089、rs505058、又は rs4641 に少なくとも相補的である、単離されたアンチセンス分子。

【0169】

(付記 2)

二本鎖核酸 (dsNA) 若しくはその化学的に修飾されたバージョン、又はアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) から選択される、付記 1 に記載の単離されたアンチセンス分子。

【0170】

(付記 3)

前記標的領域が、
GAUGACCUGCUCCAUCACCACCACGUGAGUGGUAGCCGC
CGCUGA (配列番号 1)、

50

GAUGACCUGCUCCAUCACCACCAUGUGAGUGGUAGCCGC
CGCUGA（配列番号２）、

GAUGACCUGCUCCAUCACCACCAACGGCUC C CACUGCAGC
AGCUC（配列番号３）、及び

GAUGACCUGCUCCAUCACCACCAUGGCUC C CACUGCAGC
AGCUC（配列番号４）

又はそれと少なくとも８０％相同である配列からなる群から選択される核酸配列を含む、付記１又は２に記載の単離されたアンチセンス分子。

【０１７１】

（付記４）

前記アンチセンス核酸鎖が、配列番号１５１、配列番号１５２、配列番号１５３、又は配列番号１５４に記載の核酸配列から選択される少なくとも１２個のヌクレオチドの連続した鎖を有する核酸配列を含む、付記１～３のいずれか一つに記載の単離されたアンチセンス分子。

【０１７２】

（付記５）

前記アンチセンス核酸が、配列番号７１、配列番号７２、配列番号７３、及び配列番号７４からなる群から選択される核酸配列を含む、付記１～４のいずれか一つに記載の単離されたアンチセンス分子。

【０１７３】

（付記６）

配列番号７３及び配列番号７４に記載のアンチセンス核酸を含む、付記１～５のいずれか一つに記載の単離されたアンチセンス分子。

【０１７４】

（付記７）

前記アンチセンス分子が、１５～３０ヌクレオチド長のセンス核酸鎖を含み、前記センス核酸鎖が、前記アンチセンス領域に相補的であり、前記センス核酸鎖及び前記アンチセンス核酸鎖が、二本鎖領域を形成する、付記１～６のいずれか一つに記載の単離されたアンチセンス分子。

【０１７５】

（付記８）

アンチセンス鎖及びセンス鎖が、RNAループ鎖によって作動可能に連結されて、二本鎖構造及びループ構造を含むヘアピン構造を形成する、付記１～７のいずれか一つに記載の単離されたアンチセンス分子。

【０１７６】

（付記９）

付記１～８のいずれか一つに記載の単離されたアンチセンス分子をコードする、核酸。

【０１７７】

（付記１０）

付記１～９のいずれか一つに記載のアンチセンス分子をコードする核酸を含む、発現カセット。

【０１７８】

（付記１１）

付記１０に記載の発現カセットを含む、発現ベクター。

【０１７９】

（付記１２）

付記１～８のいずれか一つに記載の単離されたアンチセンス分子、付記９に記載の核酸、付記１０に記載の発現カセット、又は付記１１に記載の発現ベクター、及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【０１８０】

10

20

30

40

50

(付記 1 3)

医学的治療における使用のための、付記 1 ～ 8 のいずれか一つに記載の単離されたアンチセンス分子、付記 9 に記載の核酸、付記 1 0 に記載の発現カセット、付記 1 1 に記載の発現ベクター、又は付記 1 2 に記載の薬学的組成物。

【 0 1 8 1 】

(付記 1 4)

心不全の治療における使用のための、付記 1 ～ 8 のいずれか一つに記載の単離されたアンチセンス分子、付記 9 に記載の核酸、付記 1 0 に記載の発現カセット、付記 1 1 に記載の発現ベクター、又は付記 1 2 に記載の薬学的組成物。

【 0 1 8 2 】

(付記 1 5)

遺伝子の変異体対立遺伝子に存在する常染色体優性変異によって引き起こされる疾患の医学的治療に適しているアンチセンス分子を選択するための方法であって、

遺伝子の変異体対立遺伝子に存在する常染色体優性変異によって引き起こされる疾患に罹患している対象の核酸試料を提供することと、

前記疾患に関連する前記遺伝子の前記変異体対立遺伝子のヘテロ接合性を決定することと、

前記遺伝子中のヘテロ接合性 S N P の存在を決定することと、

前記遺伝子の前記変異体対立遺伝子の転写物にヘテロ接合性 S N P を含む標的領域の核酸配列を決定することと、

前記標的領域に相補的である単離されたアンチセンス分子を選択することと、を含む、方法。

【 0 1 8 3 】

(付記 1 6)

細胞における変異体 L M N A 対立遺伝子の発現を阻害低減するためのインビトロ方法であって、

前記細胞に、L M N A 変異体対立遺伝子を発現する細胞での接触導入時に、前記 L M N A 変異体対立遺伝子の発現を阻害低減する、本発明のアンチセンス分子を導入するステップと、

ステップ (a) において産生される細胞を、前記 L M N A 変異体対立遺伝子の m R N A 転写物の分解を得るのに十分な時間にわたって維持し、それによって前記細胞における前記 L M N A 変異体対立遺伝子の発現を阻害低減するステップと、を含む、インビトロ方法。

10

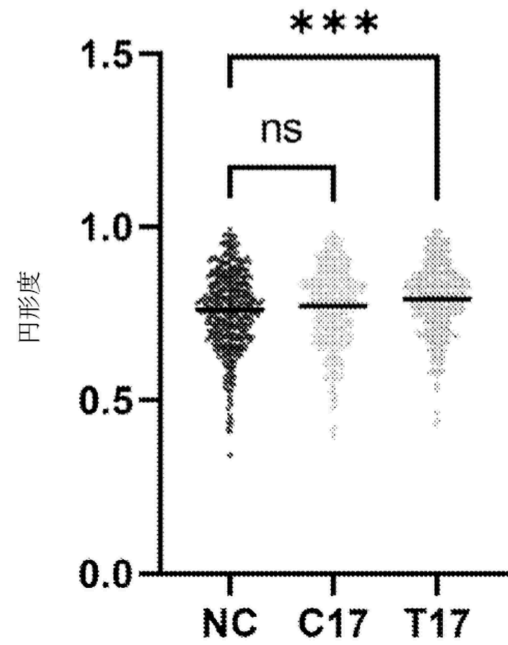
20

30

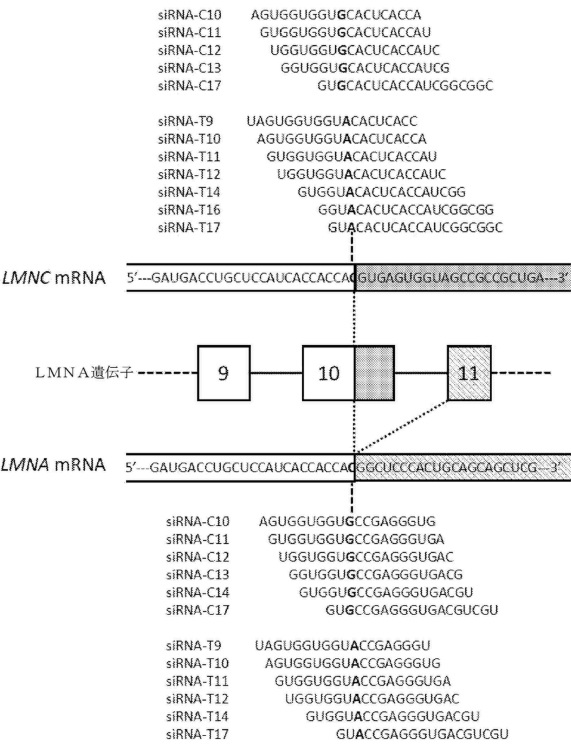
40

50

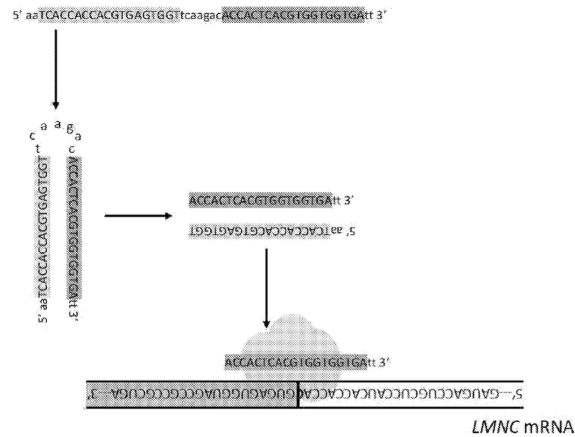
【図 5】



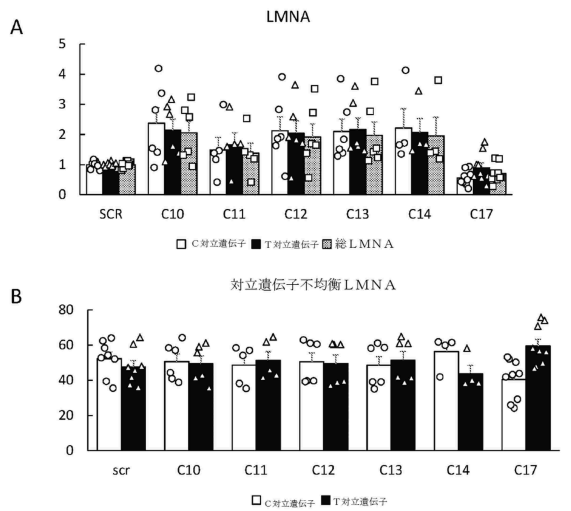
【図 6】



【図 7】



【図 8 - 1】



10

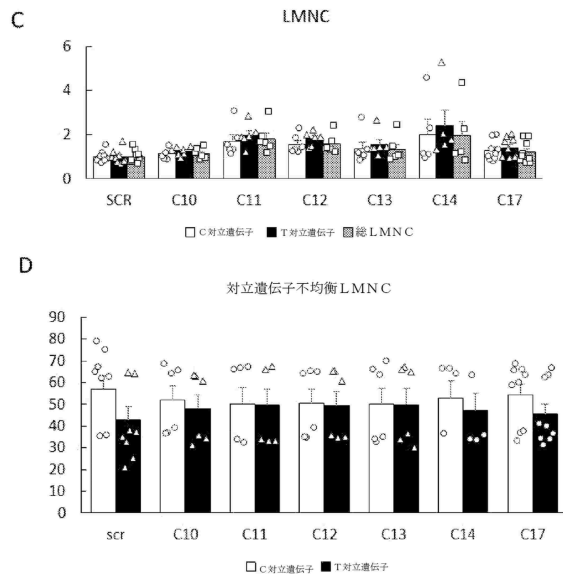
20

30

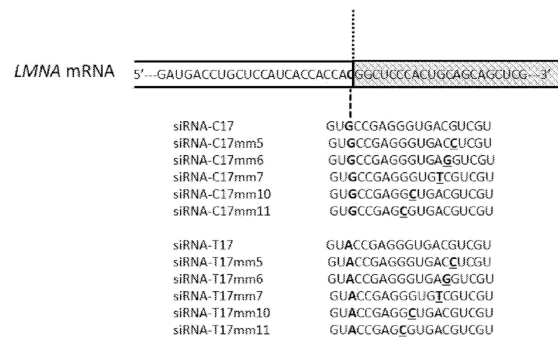
40

50

【図 8 - 2】

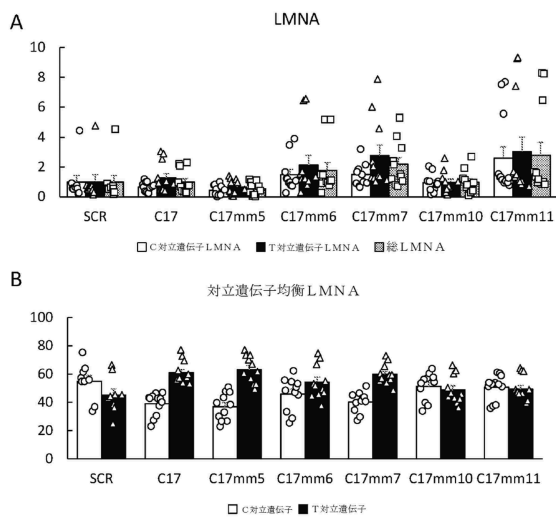


【図 9】

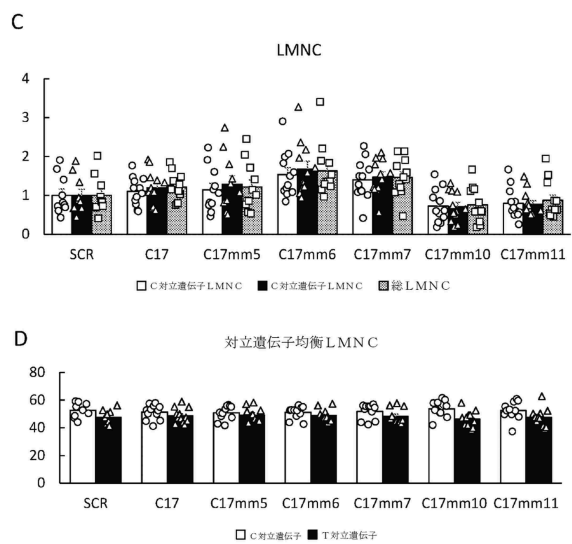


10

【図 10 - 1】



【図 10 - 2】

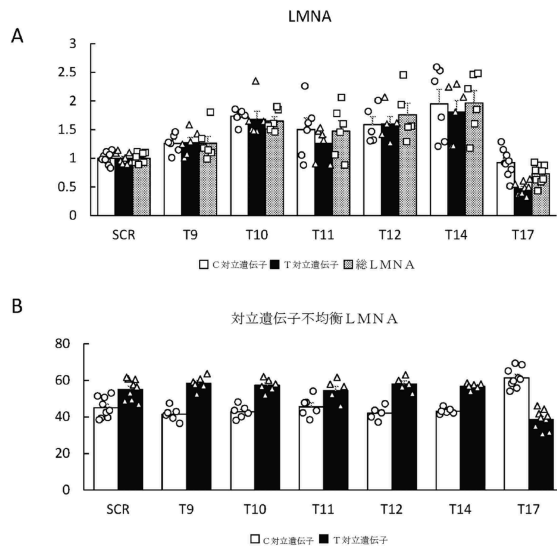


30

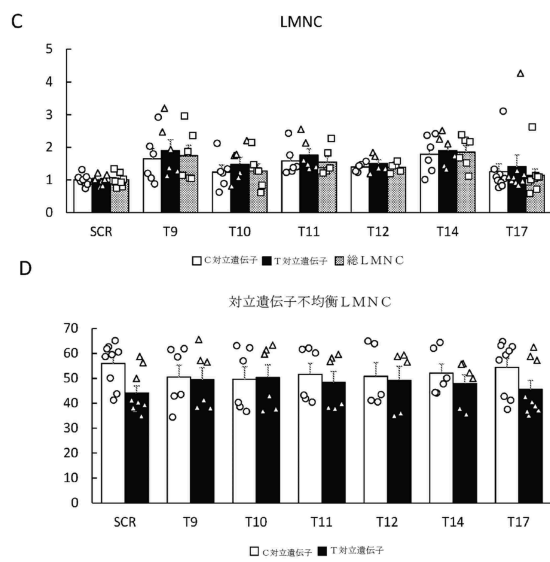
40

50

【図 1 1 - 1】

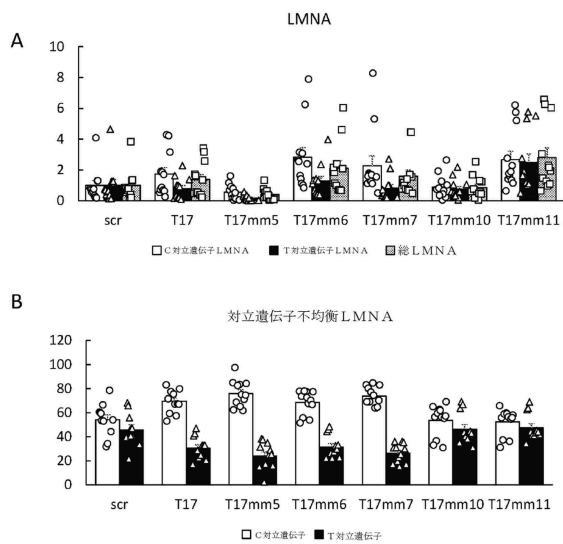


【図 1 1 - 2】

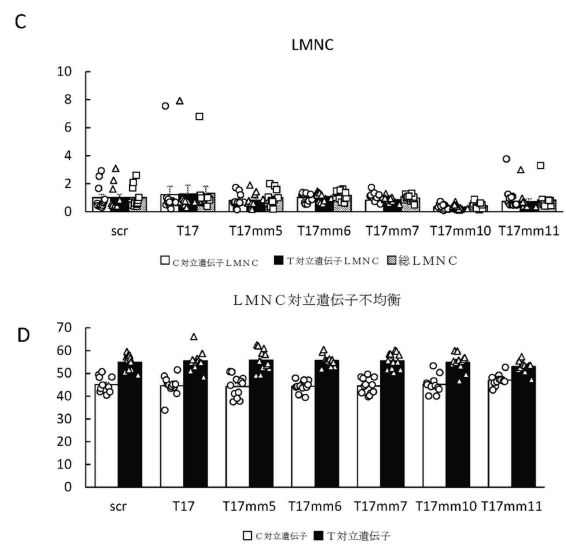


10

【図 1 2 - 1】



【図 1 2 - 2】



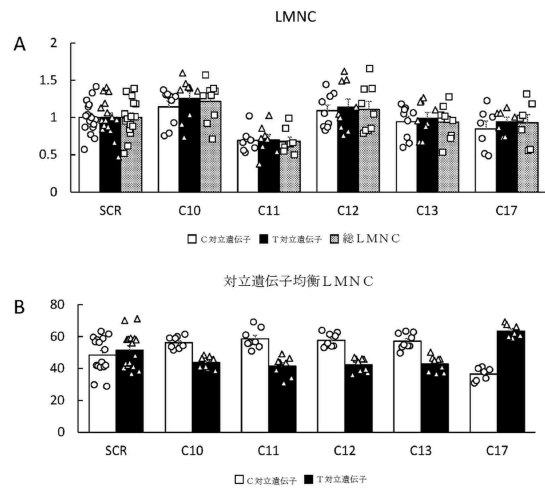
20

30

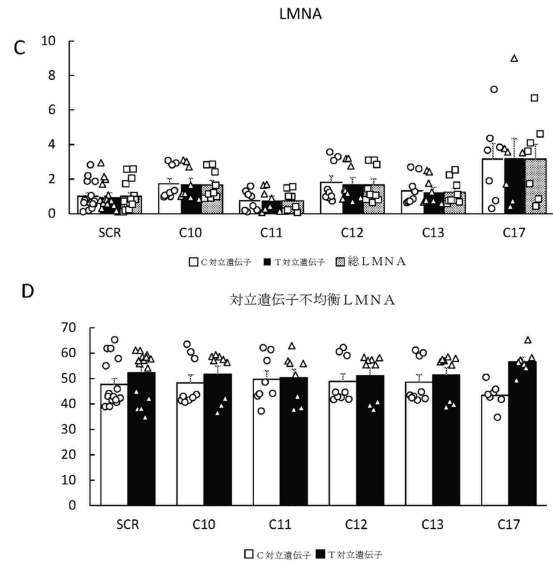
40

50

【図 13-1】

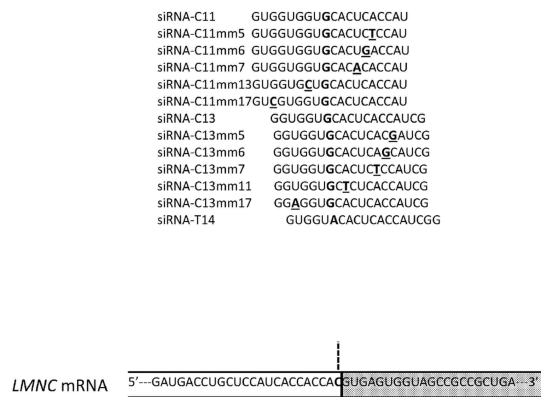


【図 13-2】

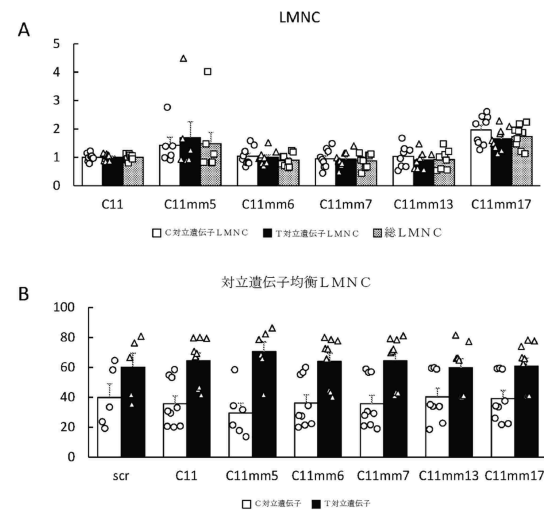


10

【図 14】



【図 15-1】

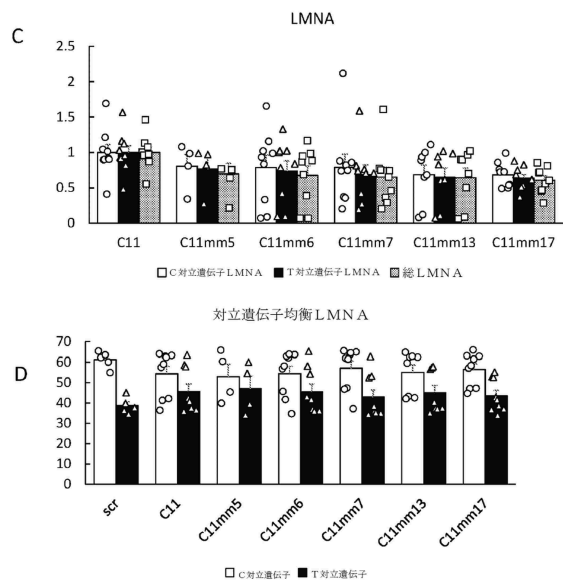


30

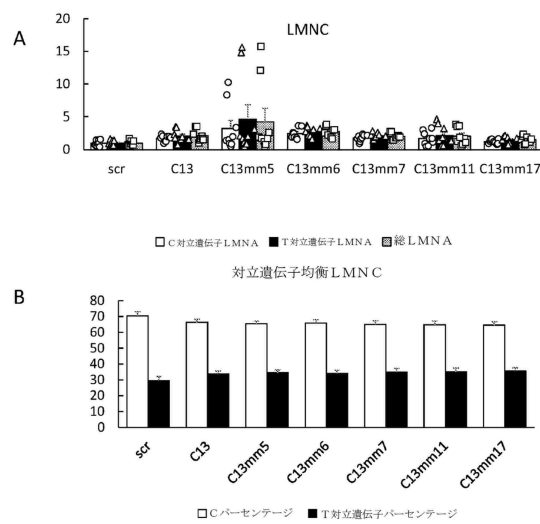
40

50

【図 15 - 2】

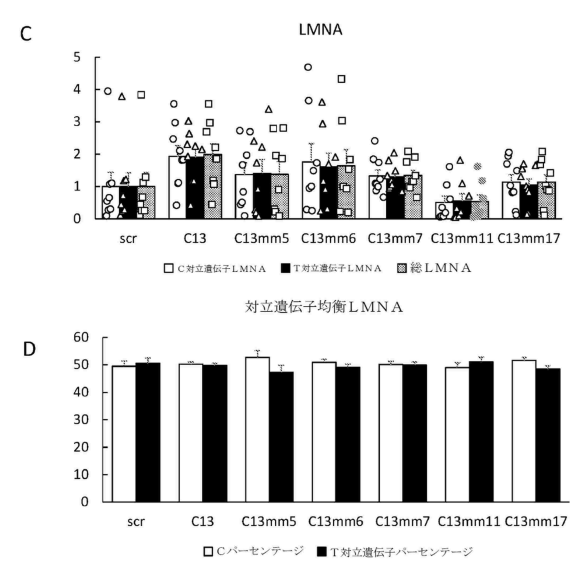


【図 16 - 1】

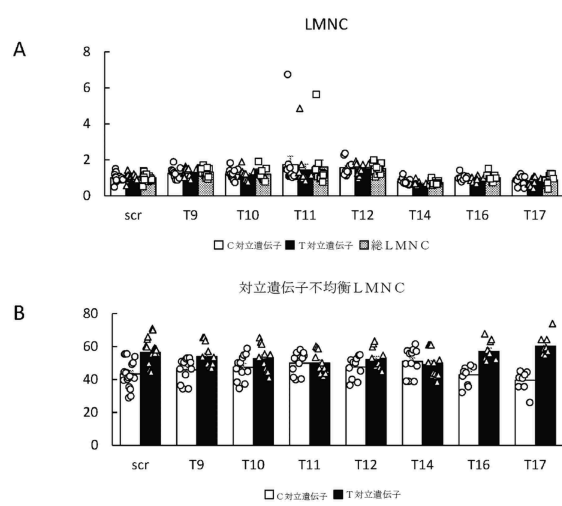


10

【図 16 - 2】



【図 17 - 1】

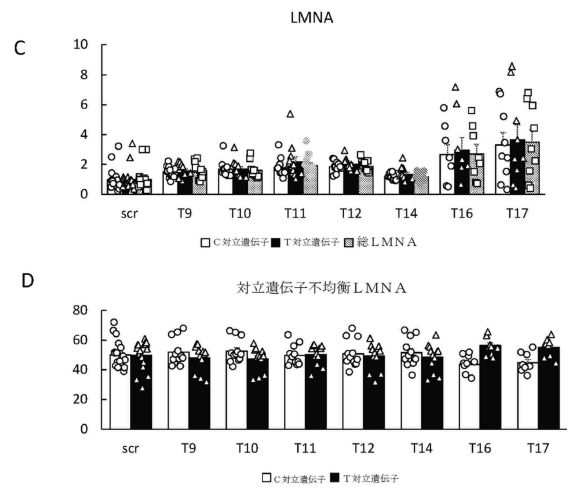


30

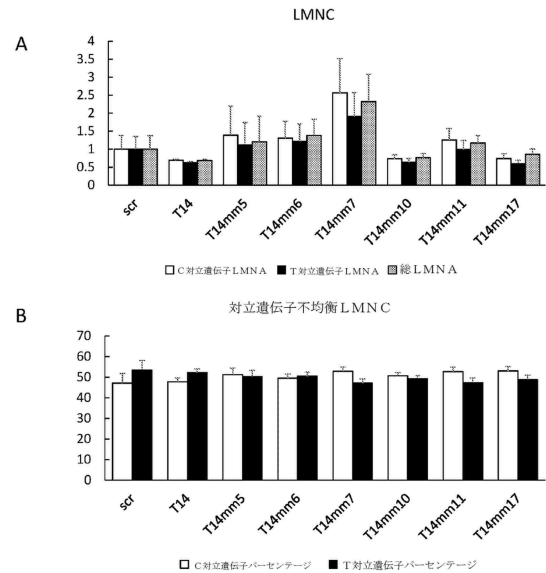
40

50

【図 17 - 2】

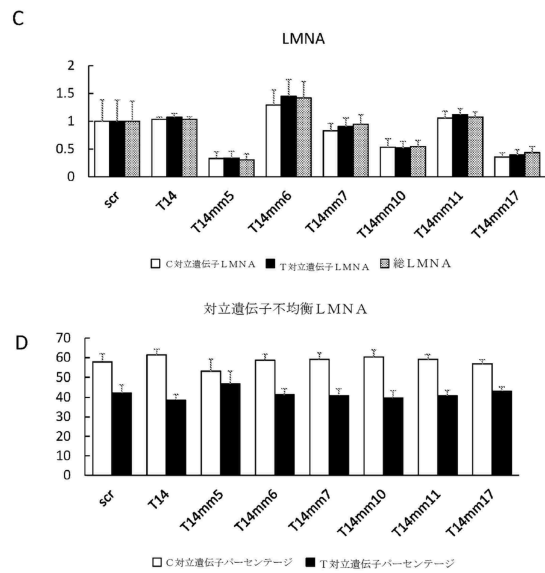


【図 18 - 1】



10

【図 18 - 2】



20

30

【配列表】

2025513932000001.xml

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2023/050168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 A61K31/713
ADD.

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)
C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KARIM HARHOURI ET AL: "Antisense-Based Progerin Downregulation in HGPS-Like Patients's Cells", CELLS, vol. 5, no. 3, 11 July 2016 (2016-07-11), page 31, XP055403717, DOI: 10.3390/cells5030031	1-5, 9-16
Y	figures 1B,1C,2; table 1 -----	1-8
X	WO 2007/047913 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC; BENNETT C FRANK [US] ET AL.) 26 April 2007 (2007-04-26) example 7; tables 10,11; compound ISIS 386359; sequence 153 ----- -/--	1-6, 9

☒ 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

15 June 2023

Date of mailing of the international search report

23/06/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Romano, Alper

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2023/050168

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANDREAS PERROT ET AL: "Identification of mutational hot spots in LMNA encoding lamin A/C in patients with familial dilated cardiomyopathy", BASIC RESEARCH IN CARDIOLOGY, STEINKOPFF-VERLAG, DA, vol. 104, no. 1, 15 September 2008 (2008-09-15), pages 90-99, XP019712671, ISSN: 1435-1803 table 2	1-8
Y	SHURONG HUANG ET AL: "Correction of cellular phenotypes of Hutchinson-Gilford Progeria cells by RNA interference", HUMAN GENETICS, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 118, no. 3-4, 6 October 2005 (2005-10-06), pages 444-450, XP019428072, ISSN: 1432-1203, DOI: 10.1007/s00439-005-0051-7 the whole document	1-8
A	ZARAGOZA MICHAEL ET AL: "Dupuytren's and Ledderhose Diseases in a Family with LMNA-Related Cardiomyopathy and a Novel Variant in the ASTE1 Gene", CELLS, vol. 6, no. 4, 1 November 2017 (2017-11-01), page 40, XP093005970, DOI: 10.3390/cells6040040 the whole document	1-15
A	WO 2020/061497 A1 (IONIS PHARMACEUTICALS INC [US]; US HEALTH [US]) 26 March 2020 (2020-03-26) the whole document	1-5, 9, 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/NL2023/050168
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. b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments: 10 20	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2023/050168

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007047913 A2	26-04-2007	US 2009156526 A1	18-06-2009
		US 2013035370 A1	07-02-2013
		US 2014309282 A1	16-10-2014
		WO 2007047913 A2	26-04-2007

WO 2020061497 A1	26-03-2020	US 2022031731 A1	03-02-2022
		WO 2020061497 A1	26-03-2020

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	9/04 (2006.01)	A 6 1 P	9/04	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT, JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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

ダム マイベルグドレーフ 9

(72)発明者 テイセン、アンケ ヨハンナ マリーナ

オランダ王国 1 1 0 5 A Z アムステルダム マイベルグドレーフ 9

(72)発明者 デ フリース、ディラン クリスタント

オランダ王国 1 1 0 5 A Z アムステルダム マイベルグドレーフ 9

F ターム (参考) 4B063 QA08 QA18 QA19 QQ08 QQ28 QQ42 QQ62 QR08 QR32 QR42
QR62 QR66 QR77 QS03 QS25 QS34 QS36 QX02
4B065 AA93X AB01 AC14 AC20 BA02 CA23 CA44 CA46
4C084 AA13 NA05 NA13 NA14 ZA361 ZB211
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA05 NA13 NA14 ZA36
ZB21
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA05 NA13 NA14 ZA36 ZB21