

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7049247号
(P7049247)

(45)発行日 令和4年4月6日(2022.4.6)

(24)登録日 令和4年3月29日(2022.3.29)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/113 (2010.01)	F I	C 1 2 N	15/113	Z Z N A
C 1 2 N	15/63 (2006.01)		C 1 2 N	15/63	Z
A 6 1 K	48/00 (2006.01)		A 6 1 K	48/00	
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	

請求項の数 8 (全72頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-529237(P2018-529237)

(86)(22)出願日 平成28年12月14日(2016.12.14)

(65)公表番号 特表2019-500346(P2019-500346)

A)

(43)公表日 平成31年1月10日(2019.1.10)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/066576

(87)国際公開番号 WO2017/106292

(87)国際公開日 平成29年6月22日(2017.6.22)

審査請求日 令和1年12月13日(2019.12.13)

(31)優先権主張番号 62/267,242

(32)優先日 平成27年12月14日(2015.12.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

(73)特許権者 504278156

コールド スプリング ハーバー ラボラ

トリー

アメリカ合衆国 11724 ニューヨー

ク、コールド スプリング ハーバー、ワ

ン バングタウン ロード

(73)特許権者 518195690

ストーク セラピューティクス、インク、

アメリカ合衆国 01730 マサチュー

セツツ州 ベドフォード ウィギンズ・ア

ヴェニュー 45

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腎臓病の処置のための組成物と方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

アンチセンスオリゴマー (ASO) であって、ASOが、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 をコードする保持されたイントロン含有mRNA前駆体 (RIC mRNA前駆体) の標的部分に相補的であり、RIC mRNA前駆体が保持されたイントロンを含み、ASOのRIC mRNA前駆体の標的部分との結合が、RIC mRNA前駆体を発現する細胞内で、保持されたイントロンをRIC mRNA前駆体から構成的にスプライシングさせることにより、細胞内で、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 をコードする成熟mRNAのレベルを増加させ、RIC mRNA前駆体の標的部分は保持されたイントロン内にあり、ASOが、SEQ ID NO: 59~68、240、241、245~248、809~814、816~818、838~840、843、及び846から選択される配列を含む、前記ASO。

【請求項2】

RIC mRNA前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して+6~3'スプライス部位に対して-16までの領域内にある請求項1に記載のASO。

【請求項3】

RIC mRNA前駆体が、SEQ ID NO: 5~9から選択される配列を含む、請求項1又は2に記載のASO。

【請求項4】

RIC mRNA前駆体の標的部分が、SEQ ID NO: 10736、10747、1

0739、10743、10742、10737、10735、又は10744の配列内にある、請求項1～3のいずれかに記載のASO。

【請求項5】

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体が、
i) 同等の野性型タンパク質と比較して、機能が低下した形態、または
ii) 同等の野性型タンパク質と比較して、十分に機能的な形態
で生成される、請求項1～4のいずれかに記載のASO。

【請求項6】

ASOが、ホスホロチオエート結合またはホスホジアミデート結合を含む骨格修飾、または修飾された糖部もしくは糖アナログを含み、該修飾された糖部もしくは糖アナログが、ホスホジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2'-O-メチル、2'-フルオロ、あるいは2'-O-メトキシエチル部分を含んでいてもよい、請求項15のいずれかに記載のASO。

10

【請求項7】

ASOが、18～50の核酸塩基からなる、請求項1～6のいずれかに記載のASO。

【請求項8】

請求項1～7のいずれかに記載のASOを含むポリヌクレオチドをコードする、ウイルスベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本出願は、2015年12月14日に出願された米国仮特許出願第62/267,242号の利益を主張し、該仮出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列リストへの言及

本出願は配列表を包含しており、これは、EFS-Webを介してASCIDIフォーマットで提出され、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。2016年12月12日に作成されたASCIDIのコピーは、47991-715_601_SL.txtのファイル名であり、4,351,059バイトのサイズである。前述のファイルは2016年12月12日に作成され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【背景技術】

【0003】

腎臓病は、腎臓の損傷に関連する疾病の衰弱性かつ潜在的には致命的な群である。腎臓は、限定されないが、廃棄物と過剰な流体を取り除き、血液中の塩分と無機質の平衡を維持し、および血圧を調節することによる血液の浄化を含む身体中の多くの機能に重要である。腎臓病の発生率はしばしば流体や廃棄物の蓄積、嘔吐、脱力、浅眠、および息切れをもたらし、最終的には死に至る危険さえあり得る。腎臓移植はしばしば死亡率を防ぐ一方で、ドナーの腎臓を受け取る見込みは一般に低い。

【0004】

腎臓に関連する多くの疾患や疾病があるが、腎臓病の一部は、遺伝子の発現における欠失と同様に遺伝子産物における欠失によって進行することが分かっている。例えば、CTNS、PAX2、CYP24A1、およびPPARD。

40

【発明の概要】

【0005】

1つの態様において、本明細書では、被験体の細胞により標的タンパク質または機能的RNAの発現を増加させることによって被験体の腎臓病を処置する方法が開示され、ここで、該細胞は、保持されたイントロン含有mRNA前駆体(RIC mRNA前駆体)を有し、該RIC mRNA前駆体は、保持されたイントロン、5'スプライス部位に隣接しているエクソン、および3'スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、ここで、RIC mRNA前駆体は、標的タンパク質または機能的RNAをコードし、該方法は、被験体の

50

細胞を、標的タンパク質または機能的RNAをコードするRIC mRNA前駆体の標的部分に相補的なアンチセンスオリゴマー(ASO)と接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能的RNAをコードするRIC mRNA前駆体から構成的にスプライシングされ、それにより、被験体の細胞内で、標的タンパク質または機能的RNAをコードするmRNAのレベルを増加させ、標的タンパク質または機能的RNAの発現を増加させる。

【0006】

いくつかの実施形態において、腎臓病は、幼児の腎症性シスチン蓄積症、遅発性シスチン蓄積症、巣状分節性糸球体硬化症7、乳頭腎(Papillary renal)症候群、あるいは幼児の高カルシウム血症である。

10

【0007】

1つの態様において、保持されたイントロン含有mRNA前駆体(RIC mRNA前駆体)を有している細胞によって、標的タンパク質の発現を増加させる方法が本明細書で提供され、該RIC mRNA前駆体は、保持されたイントロン、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソン、および保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、ここで、RIC mRNA前駆体は標的タンパク質をコードし、該方法は、細胞を、標的タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体の標的部分に相補的なアンチセンスオリゴマー(ASO)と接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、標的タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体から構成的にスプライシングされ、それにより、標的タンパク質をコードするmRNAのレベルを増加させ、細胞内で標的タンパク質の発現を増加させ、ここで、標的タンパク質は、シスチノシン(cystinosin)、タンパク質ペアードボックス遺伝子2タンパク質、タンパク質シトクロムP450ファミリー24、サブファミリーA、ポリペプチド1、あるいはペルオキシソーム増殖因子活性化受容体である。

20

【0008】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、シスチノシン(cystinosin)、タンパク質ペアードボックス遺伝子2タンパク質、タンパク質シトクロムP450ファミリー24、サブファミリーA、ポリペプチド1、あるいはペルオキシソーム増殖因子活性化受容体である。

30

【0009】

いくつかの実施形態において、標的タンパク質または機能的RNAは、被験体において量あるいは活性が不足している標的タンパク質あるいは機能的RNAを機能的に増大させるか、これに取って代わる、補償タンパク質あるいは補償機能的RNAである。

【0010】

いくつかの実施形態では、細胞は、標的タンパク質の量または活性の不足によって引き起こされた疾病を有する被験体内にあるか、または被験体に由来する。

【0011】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質の量の不足は、標的タンパク質のハプロ不全によって引き起こされ、ここで被験体は、機能的な標的タンパク質をコードする第1の対立遺伝子、標的タンパク質が産生されない第2の対立遺伝子、または非機能的な標的タンパク質をコードする第2の対立遺伝子を有し、アンチセンスオリゴマーは、第1の対立遺伝子から転写されたRIC mRNA前駆体の標的部分に結合する。

40

【0012】

いくつかの実施形態において、被験体は、標的タンパク質の量または機能の不足に起因する障害により引き起こされた疾病を抱えており、ここで、被験体は、標的タンパク質が野生型対立遺伝子からの生成と比較して、減少したレベルで生成され、標的タンパク質が同等の野性型タンパク質と比較して機能が低下した形態で生成され、あるいは、標的タンパク質が生成されない、第1の変異対立遺伝子と、および、標的タンパク質が野生型対立遺伝子からの生成と比較して、減少したレベルで生成され、標的タンパク質が同等の野性型タンパク質と比較して、機能が低下した形態で生成され、あるいは、標的タンパク質が生

50

成されない、第2の変異対立遺伝子とを有し、ここで、被験体が第1の変異対立遺伝子(a)(i i i)を有するとき、第2の変異対立遺伝子は(b)(i)あるいは(b)(i i)であり、ここで、被験体が第2の変異対立遺伝子(b)(i i i)を有するとき、第1の変異対立遺伝子は(a)(i)あるいは(a)(i i)であり、ここで、R I C m R N A前駆体は、(a)(i)あるいは(a)(i i)である第1の変異対立遺伝子、および/または、(b)(i)あるいは(b)(i i)である第2の変異対立遺伝子から転写される。

【0013】

いくつかの実施形態において、標的タンパク質は、同等の野性型タンパク質と比較して、機能が低下した形態で生成される。

10

【0014】

いくつかの実施形態において、標的タンパク質は、同等な野性型タンパク質と比較して、十分に機能的な形態で生成される。

【0015】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して+6~保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して-16までの領域内の保持されたイントロンにある。

【0016】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して+69~保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して-79までの領域内の保持されたイントロンにある。

20

【0017】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質はシスチノシンである。

【0018】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して+500~保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して-500までの領域内の保持されたイントロンにある。

【0019】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A前駆体の標的部分は、SEQ ID NO:8624-10068のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%相補的な配列を含む。

30

【0020】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A前駆体の標的部分は、SEQ ID NO:10748またはSEQ ID NO:10734の少なくとも8つの隣接する核酸を含む領域に少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む。

【0021】

いくつかの実施形態において、ASOは、SEQ ID NO:8624-10068のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む。

40

【0022】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A前駆体は、SEQ ID NO:16またはSEQ ID NO:17のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、R I C m R N A前駆体は、SEQ ID NO:3に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる。

【0024】

50

いくつかの実施形態において、標的タンパク質はペアードボックス遺伝子 2 タンパク質である。

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対して + 5 0 0 ~ 保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対して - 5 0 0 までの領域内の保持されたイントロンにある。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、S E Q I D N O : 6 9 5 3 - 8 6 2 3 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 1 0 0 % 相補的な配列を含む。

10

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、S E Q I D N O : 1 0 7 3 8 または S E Q I D N O : 1 0 7 4 0 の少なくとも 8 つの隣接する核酸を含む領域に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を備えた配列を含む。

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体は、S E Q I D N O : 6 9 5 3 - 8 6 2 3 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を備えた配列を含む。いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体は、S E Q I D N O : 1 0 - 1 5 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を備えた配列を含む。

20

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体は、S E Q I D N O : 2 に対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる。

【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態において、標的タンパク質はタンパク質シトクロム P 4 5 0 ファミリー 2 4 、サブファミリー A 、ポリペプチド 1 である。

30

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対して + 5 0 0 ~ 保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対して - 5 0 0 までの領域内の保持されたイントロンにある。

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、S E Q I D N O : 9 5 2 0 - 1 0 7 3 3 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 1 0 0 % 相補的な配列を含む。

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、S E Q I D N O : 1 0 7 4 8 、S E Q I D N O : 1 0 7 3 4 、S E Q I D N O : 1 0 7 4 6 、S E Q I D N O : 1 0 7 4 5 、あるいは S E Q I D N O : 1 0 7 4 1 の少なくとも 8 つの隣接する核酸を含む領域に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を備えた配列を含む。

40

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態において、A S O は、S E Q I D N O : 9 5 2 0 - 1 0 7 3 3 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を備えた配列を含む。

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体は、S E Q I D N O : 1 6 - 1 9 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7

50

%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む。

【0036】

いくつかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体は、S E Q I D N O : 4 に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる。

【0037】

いくつかの実施形態において、標的タンパク質はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体である。

【0038】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して + 500 ~ 保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して - 500までの領域内の保持されたイントロンにある。 10

【0039】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、S E Q I D N O : 20 - 6952のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%相補的な配列を含む。

【0040】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、S E Q I D N O : 10736、S E Q I D N O : 10747、S E Q I D N O : 10739、S E Q I D N O : 10743、S E Q I D N O : 10742、S E Q I D N O : 10737、S E Q I D N O : 10735、あるいはS E Q I D N O : 10744の少なくとも8つの隣接する核酸を含む領域に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む。 20

【0041】

いくつかの実施形態において、A S O は、S E Q I D N O : 20 - 6952のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む。

【0042】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体は、S E Q I D N O : 5 - 9 のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む。 30

【0043】

いくつかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体は、S E Q I D N O : 1 に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる。

【0044】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、以下の内部の保持されたイントロンにある：保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する、+ 6 から + 100 の領域；あるいは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する - 16 から - 100 の領域。 40

【0045】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、少なくとも1つの保持されたイントロンの5'スプライス部位の約100ヌクレオチド下流から、少なくとも1つの保持されたイントロンの3'スプライス部位の約100ヌクレオチド上流までの領域内にある R I C m R N A 前駆体の一部を標的とする。

【0046】

いくつかの実施形態において、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、以下の内部にある：保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接するエクソン中の + 2 e ~ - 4 e の領域；あるいは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接するエクソン中の + 2 e 50

～～4eの領域。

【0047】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、機能的RNAまたは標的タンパク質をコードする遺伝子から転写されたmRNA前駆体の選択的スプライシングを調節することにより、標的タンパク質または機能的RNAの量を増加させない。

【0048】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能的RNAをコードする遺伝子の突然変異に起因する異常なスプライシングを調節することにより、標的タンパク質または機能的RNAの量を増加させない。

【0049】

いくつかの実施形態において、RIC mRNA前駆体は、全長のmRNA前駆体の部分的なスプライシング、または野生型のmRNA前駆体の部分的なスプライシングによって生成された。

【0050】

いくつかの実施形態において、標的タンパク質または機能的RNAをコードするmRNAは、全長の成熟mRNA、あるいは野生型の成熟mRNAである。

【0051】

いくつかの実施形態において、生成された標的タンパク質は全長のタンパク質あるいは野生型のタンパク質である。

【0052】

いくつかの実施形態において、いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーと接触させた細胞において生成された標的タンパク質または機能的RNAをコードするmRNAの総量は、対照細胞において生成された標的タンパク質または機能的RNAをコードするmRNAの総量と比較して、約1.1～約10倍、約1.5～約10倍、約2～約10倍、約3～約10倍、約4～約10倍、約1.1～約5倍、約1.1～約6倍、約1.1～約7倍、約1.1～約8倍、約1.1～約9倍、約2～約5倍、約2～約6倍、約2～約7倍、約2～約8倍、約2～約9倍、約3～約6倍、約3～約7倍、約3～約8倍、約3～約9倍、約4～約7倍、約4～約8倍、約4～約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、あるいは少なくとも約10倍増加する。

【0053】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーと接触させた細胞によって生成された標的タンパク質の総量は、対照細胞によって生成された標的タンパク質の総量と比較して、約1.1～約10倍、約1.5～約10倍、約2～約10倍、約3～約10倍、約4～約10倍、約1.1～約5倍、約1.1～約6倍、約1.1～約7倍、約1.1～約8倍、約1.1～約9倍、約2～約5倍、約2～約6倍、約2～約7倍、約2～約8倍、約2～約9倍、約3～約6倍、約3～約7倍、約3～約8倍、約3～約9倍、約4～約7倍、約4～約8倍、約4～約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、あるいは少なくとも約10倍増加する。

【0054】

いくつかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホロチオエート結合またはホスホジアミデート結合を含む骨格修飾を含む。

【0055】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーはホスホジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2'-O-メチル、2'-フルオロ、あるいは2'-O-メトキシエチル部分を含む。

【0056】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは少なくとも1つの修飾された糖

10

20

30

40

50

部を含む。

【0057】

いくつかの実施形態において、それぞれの糖部は修飾された糖部である。

【0058】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、8～50の核酸塩基、8～40の核酸塩基、8～35の核酸塩基、8～30の核酸塩基、8～25の核酸塩基、8～20の核酸塩基、8～15の核酸塩基、9～50の核酸塩基、9～40の核酸塩基、9～35の核酸塩基、9～30の核酸塩基、9～25の核酸塩基、9～20の核酸塩基、9～15の核酸塩基、10～50の核酸塩基、10～40の核酸塩基、10～35の核酸塩基、10～30の核酸塩基、10～25の核酸塩基、10～20の核酸塩基、10～15の核酸塩基、11～50の核酸塩基、11～40の核酸塩基、11～35の核酸塩基、11～30の核酸塩基、11～25の核酸塩基、11～20の核酸塩基、11～15の核酸塩基、12～50の核酸塩基、12～40の核酸塩基、12～35の核酸塩基、12～30の核酸塩基、12～25の核酸塩基、12～20の核酸塩基、あるいは12～15の核酸塩基からなる。

10

【0059】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、タンパク質をコードするR I C m R N A前駆体の標的部に少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、あるいは100%相補的である。

20

【0060】

いくつかの実施形態において、細胞は、標的タンパク質または機能的R N Aをコードする遺伝子から転写されたR I C m R N A前駆体の集団を含み、ここで、R I C m R N A前駆体の集団は2つ以上の保持されたイントロンを含み、および、ここで、アンチセンスオリゴマーは、R I C m R N A前駆体の集団で最も豊富な保持されたイントロンに結合する。

【0061】

いくつかの実施形態において、最も豊富な保持されたイントロンに対するアンチセンスオリゴマーの結合は、標的タンパク質または機能的R N Aをコードするm R N Aを生成するためにR I C m R N A前駆体の集団からの2つ以上の保持されたイントロンのスライシングアウトを誘発する。

30

【0062】

いくつかの実施形態において、細胞は、標的タンパク質または機能的R N Aをコードする遺伝子から転写されたR I C m R N A前駆体の集団を含み、ここで、R I C m R N A前駆体の集団は2つ以上の保持されたイントロンを含み、および、ここで、アンチセンスオリゴマーは、R I C m R N A前駆体の集団で2番目に豊富な保持されたイントロンに結合する。

【0063】

いくつかの実施形態において、2番目に豊富な保持されたイントロンに対するアンチセンスオリゴマーの結合は、標的タンパク質または機能的R N Aをコードするm R N Aを生成するためにR I C m R N A前駆体の集団からの2つ以上の保持されたイントロンのスライシングアウトを誘発する。

40

【0064】

いくつかの実施形態では、疾患は、疾患または障害である。

【0065】

いくつかの実施形態において、疾患または障害は腎臓病である。

【0066】

いくつかの実施形態において、腎臓病は、幼児の腎症性シスチン蓄積症、遅発性シスチン蓄積症、巣状分節性糸球体硬化症7、乳頭腎症候群、あるいは幼児の高カルシウム血症である。

50

【0067】

いくつかの実施形態において、標的タンパク質と R I C m R N A 前駆体は、遺伝子によってコードされ、ここで、遺伝子は C T N S 、 P A X 2 、 C Y P 2 4 A 1 、あるいは P P A R D である。

【0068】

いくつかの実施形態において、当該方法はタンパク質発現を評価する工程をさらに含む。

【0069】

いくつかの実施形態では、被験体はヒトである。

【0070】

いくつかの実施形態では、被験体はヒト以外の動物である。

10

【0071】

いくつかの実施形態において、被験体は胎児、胚、あるいは子供である。

【0072】

いくつかの実施形態では、細胞はエクスピボである。

【0073】

いくつかの実施形態において、アンチセンスオリゴマーは、被験体の腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、あるいは静脈内注射によって投与される。

【0074】

いくつかの実施形態において、5'スプライス部位に隣接するエクソンの - 3 e ~ - 1 e と、保持されたイントロンの + 1 ~ + 6 にある 9 つのヌクレオチドは、対応する野性型配列と同一である。

20

【0075】

いくつかの実施形態において、保持されたイントロンの - 1 5 ~ - 1 と 3'スプライス部位に隣接するエクソンの + 1 e にある 1 6 のヌクレオチドは、対応する野性型配列と同一である。

【0076】

1つの態様では、本明細書に記載された方法で使用されるようなアンチセンスオリゴマーが本明細書で提供される。

【0077】

1つの態様では、SEQ ID NO : 2 0 - 1 0 7 3 3 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を備えた配列を含むアンチセンスオリゴマーが本明細書で提供される。

30

【0078】

1つの態様では、本明細書に記載されたアンチセンスオリゴマーと賦形剤を含む医薬組成物が本明細書で提供される。

【0079】

1つの態様では、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、あるいは静脈内注射によって本明細書に記載された医薬組成物を投与することにより、被験体を処置する方法が本明細書で提供される。

【0080】

1つの態様において、不足しているタンパク質または不足している機能的 R N A に関連している被験体の腎臓病を処置するために、細胞によって標的タンパク質あるいは機能的 R N A の発現を増加させる方法で使用されるアンチセンスオリゴマーを含む組成物が本明細書で提供され、ここで、不足しているタンパク質または機能的 R N A は、被験体において量あるいは活性が不足しており、ここで、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能的 R N A をコードする、保持されたイントロン含有 m R N A 前駆体 (R I C m R N A 前駆体) の構成的のスプライシングを増強し、ここで、標的タンパク質は：不足しているタンパク質；あるいは、被験体において不足しているタンパク質を機能的に増大させるか、これに取って代わる、補償タンパク質であり、ここで、機能的 R N A は：不足している R N A ；あるいは、被験体の不足している機能的 R N A を機能的に増大させるか、

40

50

これに取って代わる、補償機能的 RNA であり、ここで R I C m RNA 前駆体は、保持されたイントロン、5' スプライス部位に隣接しているエクソン、および 3' スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能的 RNA をコードする R I C m RNA 前駆体からスプライシングされ、それによって、被験体において標的タンパク質または機能的 RNA の產生または活性を増加させる。

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態において、腎臓病は、幼児の腎症性シスチン蓄積症、遅発性シスチン蓄積症、巣状分節性糸球体硬化症 7、乳頭腎症候群、あるいは幼児の高カルシウム血症である。

【 0 0 8 2 】

1つの態様において、被験体において標的タンパク質に関する疾病を処置する方法に使用するためのアンチセンスオリゴマーを含む組成物が本明細書で提供され、該方法は、被験体の細胞によって標的タンパク質の発現を増加させる工程を含み、ここで、細胞は、保持されたイントロン、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に隣接しているエクソン、および保持されたイントロンの 3' スプライス部位に隣接しているエクソンを含む、保持されたイントロン含有 m RNA 前駆体 (R I C m RNA 前駆体) を有し、R I C m RNA 前駆体は、標的タンパク質をコードし、該方法は、細胞をアンチセンスオリゴマーと接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、標的タンパク質をコードする R I C m RNA 前駆体の転写産物から構成的にスプライシングされ、それにより、被験体の細胞内で、標的タンパク質または機能的 RNA をコードする m RNA のレベルを増加させ、標的タンパク質の発現を増加させる。

10

【 0 0 8 3 】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、シスチノシン (cystinosin)、タンパク質ペアードボックス遺伝子 2 タンパク質、タンパク質シトクロム P 450 ファミリー 24、サブファミリー A、ポリペプチド 1、あるいはペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 である。

【 0 0 8 4 】

幾つかの実施形態では、疾患は、疾患または障害である。

【 0 0 8 5 】

幾つかの実施形態では、疾患または障害は腎臓病である。

30

【 0 0 8 6 】

幾つかの実施形態では、腎臓病は、幼児の腎症性シスチン蓄積症、遅発性シスチン蓄積症、巣状分節性糸球体硬化症 7、乳頭腎症候群、または幼児の高カルシウム血症である。

【 0 0 8 7 】

幾つかの実施形態では、標的タンパク質および R I C m RNA 前駆体は、遺伝子によってコードされ、ここで遺伝子は、CTNS、PAX2、CYP24A1 または PPARD である。

【 0 0 8 8 】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する + 6 から、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対する - 16 の領域内にある、R I C m RNA 前駆体の一部を標的とする。

40

【 0 0 8 9 】

幾つかの実施形態では、R I C m RNA 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する + 6 から、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対する - 7 9 の領域内にある。

【 0 0 9 0 】

幾つかの実施形態では、標的タンパク質はシスチノシンである。

【 0 0 9 1 】

幾つかの実施形態では、R I C m RNA 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンにお

50

いて、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する + 500 から、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対する - 500 の領域内にある。

【 0 0 9 2 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO : 862 4 - 10068 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または 100% 相補的である配列を含む。

【 0 0 9 3 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO : 107 48 または 10734 の少なくとも 8 つの隣接する核酸を含む領域に対して、少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する配列を含む。 10

【 0 0 9 4 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO : 8624 - 10068 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する配列を含む。

【 0 0 9 5 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO : 16 または 17 に対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する配列を含む。

【 0 0 9 6 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO : 3 に対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる。 20

【 0 0 9 7 】

幾つかの実施形態では、標的タンパク質は、ペアードボックス遺伝子 2 タンパク質である。

【 0 0 9 8 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する + 500 から、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対する - 500 の領域内にある。

【 0 0 9 9 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO : 695 3 - 8623 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 相補的である配列を含む。 30

【 0 1 0 0 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO : 107 38 または 10740 の少なくとも 8 つの隣接する核酸を含む領域に対して、少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する配列を含む。

【 0 1 0 1 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO : 6953 - 8623 に対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する配列を含む。 40

【 0 1 0 2 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO : 10 - 15 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する配列を含む。

【 0 1 0 3 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO : 2 に対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる。 50

【0104】

幾つかの実施形態では、標的タンパク質は、タンパク質シトクロムP450のファミリー24、サブファミリーA、ポリペプチド1である。

【0105】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+500から、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-500の領域内にある。

【0106】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体の標的部分は、SEQ ID NO: 9520-10733のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%相補的である配列を含む。

10

【0107】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体の標的部分は、SEQ ID NO: 10748、10734、10746、10745または10741の少なくとも8つの隣接する核酸を含む領域に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列を含む。

【0108】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体は、SEQ ID NO: 9520-10733に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0109】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体は、SEQ ID NO: 16-19のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列を含む。

【0110】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体は、SEQ ID NO: 4に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる。

【0111】

幾つかの実施形態では、標的タンパク質は、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体である。

30

【0112】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+500から、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-500の領域内にある。

【0113】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体の標的部分は、SEQ ID NO: 20-6952のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%相補的である配列を含む。

40

【0114】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体の標的部分は、SEQ ID NO: 10736、10747、10739、10743、10742、10737、10735、または10744の少なくとも8つの隣接する核酸を含む領域に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列を含む。

【0115】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A前駆体は、SEQ ID NO: 20-6952に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列を含む。

【0116】

50

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体は、S E Q I D N O : 5 - 9 のいずれか 1つに対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する配列を含む。

【 0 1 1 7 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体は、S E Q I D N O : 1 に対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる。

【 0 1 1 8 】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する + 6 から + 100 の領域；または保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対する - 16 から - 100 の領域内にある、R I C m R N A 前駆体の一部を標的とする。 10

【 0 1 1 9 】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、少なくとも 1 つの保持されたイントロンの 5' スプライス部位の約 100 のヌクレオチド下流から、少なくとも 1 つの保持されたイントロンの 3' スプライス部位の約 100 のヌクレオチド上流までの領域内にある、R I C m R N A 前駆体の一部を標的とする。

【 0 1 2 0 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体の標的部位は、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に隣接しているエクソンにおける + 2 e から - 4 e の領域；または保持されたイントロンの 3' スプライス部位に隣接しているエクソンにおける + 2 e から - 4 e の領域内にある。 20

【 0 1 2 1 】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能 R N A をコードする遺伝子から転写された m R N A 前駆体の選択的スプライシングを調節することにより標的タンパク質または機能 R N A の量を増加させない。

【 0 1 2 2 】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能 R N A をコードする遺伝子の突然変異から結果として生じる異常スプライシングを調節することにより標的タンパク質または機能 R N A の量を増加させない。 30

【 0 1 2 3 】

幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体は、全長 m R N A 前駆体または野生型 m R N A 前駆体から部分的スプライシングによって産生された。

【 0 1 2 4 】

幾つかの実施形態では、標的タンパク質または機能 R N A をコードする m R N A は、全長成熟 m R N A または野生型成熟 m R N A である。

【 0 1 2 5 】

幾つかの実施形態では、産生される標的タンパク質は、全長タンパク質または野生型タンパク質である。

【 0 1 2 6 】

幾つかの実施形態では、保持されたイントロンは、律速の (r a t e - l i m i t i n g) イントロンである。 40

【 0 1 2 7 】

幾つかの実施形態では、前記保持されたイントロンは、前記 R I C m R N A 前駆体で最も豊富な保持されたイントロンである。

【 0 1 2 8 】

幾つかの実施形態では、保持されたイントロンは、前記 R I C m R N A 前駆体で 2 番目に豊富な保持されたイントロンである。

【 0 1 2 9 】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホロチオエート結合またはホス

10

20

30

40

50

ホロジアミデート結合を含む骨格修飾を含む。

【0130】

幾つかの実施形態では、前記アンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0131】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホロジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2'-O-メチル、2'-フルオロ、または2'-O-メトキシエチル部分を含む。

【0132】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、少なくとも1つの修飾された糖部を含む。 10

【0133】

幾つかの実施形態では、各糖部は、修飾された糖部である。

【0134】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、8～50の核酸塩基、8～40の核酸塩基、8～35の核酸塩基、8～30の核酸塩基、8～25の核酸塩基、8～20の核酸塩基、8～15の核酸塩基、9～50の核酸塩基、9～40の核酸塩基、9～35の核酸塩基、9～30の核酸塩基、9～25の核酸塩基、9～20の核酸塩基、9～15の核酸塩基、10～50の核酸塩基、10～40の核酸塩基、10～35の核酸塩基、10～30の核酸塩基、10～25の核酸塩基、10～20の核酸塩基、10～15の核酸塩基、11～50の核酸塩基、11～40の核酸塩基、11～35の核酸塩基、11～30の核酸塩基、11～25の核酸塩基、11～20の核酸塩基、11～15の核酸塩基、12～50の核酸塩基、12～40核酸塩基、12～35核酸塩基、12～30の核酸塩基、12～25の核酸塩基、12～20の核酸塩基、または12から15の核酸塩基から成る。 20

【0135】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体の標的部分に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相補的である。

【0136】

一態様では、本明細書には、本明細書に記載されるアンチセンスオリゴマー、および賦形剤を含む、医薬組成物が提供される。 30

【0137】

一態様において、本明細書には、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または静脈内注射により本明細書に記載される医薬組成物を投与することによって、必要としている被験体を処置する方法が提供される。

【0138】

一態様において、本明細書には医薬組成物が提供され、該医薬組成物は、不足したCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物の標的配列にハイブリダイズするアンチセンスオリゴマーであって、ここで不足したCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物が、保持されたイントロンを含み、アンチセンスオリゴマーが、不足したCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物からの保持されたイントロンのスライシングアウトを誘発する、アンチセンスオリゴマー；および薬学的に許容可能な賦形剤を含む。 40

【0139】

幾つかの実施形態では、不足したCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物は、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのRIC mRNA前駆体の転写産物である。

【0140】

幾つかの実施形態では、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRN 50

A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する + 500 から、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対する - 500 の領域内にある。

【 0141 】

幾つかの実施形態では、CTNS、PAX2、CYP24A1 または PPARD の RIC mRNA 前駆体の転写産物は、SEQ ID NO: 1 - 4 のいずれか 1 つに対して、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる。

【 0142 】

幾つかの実施形態では、CTNS、PAX2、CYP24A1 または PPARD の RIC mRNA 前駆体の転写産物は、SEQ ID NO: 5 - 19 のいずれか 1 つに対して、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する配列を含む。

【 0143 】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホロチオエート結合またはホスホロジアミデート結合を含む骨格修飾を含む。

【 0144 】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【 0145 】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホロジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2' - O - メチル、2' - フルオロ、または 2' - O - メトキシエチル部分を含む。

【 0146 】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、少なくとも 1 つの修飾された糖部を含む。

【 0147 】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、8 ~ 50 の核酸塩基、8 ~ 40 の核酸塩基、8 ~ 35 の核酸塩基、8 ~ 30 の核酸塩基、8 ~ 25 の核酸塩基、8 ~ 20 の核酸塩基、8 ~ 15 の核酸塩基、9 ~ 50 の核酸塩基、9 ~ 40 の核酸塩基、9 ~ 35 の核酸塩基、9 ~ 30 の核酸塩基、9 ~ 25 の核酸塩基、9 ~ 20 の核酸塩基、9 ~ 15 の核酸塩基、10 ~ 50 の核酸塩基、10 ~ 40 の核酸塩基、10 ~ 35 の核酸塩基、10 ~ 30 の核酸塩基、10 ~ 25 の核酸塩基、10 ~ 20 の核酸塩基、10 ~ 15 の核酸塩基、11 ~ 50 の核酸塩基、11 ~ 40 の核酸塩基、11 ~ 35 の核酸塩基、11 ~ 30 の核酸塩基、11 ~ 25 の核酸塩基、11 ~ 20 の核酸塩基、11 ~ 15 の核酸塩基、12 ~ 50 の核酸塩基、12 ~ 40 の核酸塩基、12 ~ 35 核酸塩基、12 ~ 30 核酸塩基、12 ~ 25 の核酸塩基、12 ~ 20 の核酸塩基、または 12 ~ 15 の核酸塩基を含む。

【 0148 】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、CTNS、PAX2、CYP24A1 または PPARD の RIC mRNA 前駆体の転写産物の標的部分に対して、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 相補的である。

【 0149 】

幾つかの実施形態では、CTNS、PAX2、CYP24A1 または PPARD の RIC mRNA 前駆体の転写産物の標的部分は、SEQ ID NO: 10034 - 10748 から選択される配列内にある。

【 0150 】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、SEQ ID NO: 20 - 10733 のいずれか 1 つに対して、少なくとも約 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 配列同一性であるヌクレ

10

20

30

40

50

オチド配列を含む。

【0151】

幾つかの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、SEQ ID NO: 20-1073 3から選択されるスクレオチド配列を含む。

【0152】

幾つかの実施形態では、医薬組成物は、髄腔内注射、脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または静脈内注射のために製剤される。

【0153】

一態様において、本明細書には、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのタンパク質（次のものを含む方法）の機能形態をコードする、十分に処理されたCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物を產生するために、不足したCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物の処理を誘発し、保持されたイントロンの除去を促進する方法が提供され、該方法は、アンチセンスオリゴマーを被験体の標的細胞に接触させる工程；アンチセンスオリゴマーを、不足したCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物にハイブリダイズする工程であって、不足したCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物が、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのタンパク質の機能形態をコードすることができ、少なくとも1つの保持されたイントロンを含む、工程；CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのタンパク質の機能形態をコードする、十分に処理されたCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物を產生するために、少なくとも1つの保持されたイントロンを不足したCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物から除去する工程；および十分に処理されたCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物から、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのタンパク質の機能形態を翻訳する工程を含む。

10

【0154】

幾つかの実施形態では、保持されたイントロンは、保持されたイントロン全体である。

【0155】

幾つかの実施形態では、不足したCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物は、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのRIC mRNA前駆体の転写産物である。

30

【0156】

一態様において、本明細書には、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのタンパク質の量または活性の不足によって引き起こされた疾病を有する被験体を処置する方法が提供され、該方法は、SEQ ID NO: 20-10733のいずれか1つに対して、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するスクレオチド配列含むアンチセンスオリゴマーを被験体に投与する工程を含む。

【0157】

引用による組み込み

40

本明細書で言及されるすべての公報、特許、および特許出願は、個々の公報、特許、特許出願が引用によって組み込まれるように具体的且つ個々に示される程度まで、引用によって本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0158】

本発明の新規な特徴は、特に添付の請求項に明記されている。本発明の原則が利用される例示の実施形態について説明する以下の詳細な記載と、添付の図面を参照することで、本発明の特徴および利点についてのよりよい理解が得られるであろう。

【0159】

【図1】図1は、典型的な保持されたイントロン含有（RIC）mRNA前駆体の転写産

50

物の概略図を示す。5'スプライス部位コンセンサス配列は、-3eから-1eおよび+1から+6（「e」と標識された数字はエクソンであり、標識されていない数字はイントロンである）まで下線を引かれた文字（文字はヌクレオチドである；大文字：エクソン部分、および小文字：イントロン部分）で示されている。3'スプライス部位コンセンサス配列は、-15から-1および+1e（「e」と標識された数字はエクソンであり、標識されていない数字はイントロンである）まで下線を引かれた文字（文字はヌクレオチドである；大文字：エクソン部分、および小文字：イントロン部分）で示されている。ASOスクリーニングのためのイントロン標的領域は、保持されたイントロンの5'スプライス部位（左の矢印）に対するヌクレオチド+6から、保持されたイントロンの3'スプライス部位（右の矢印）に対するヌクレオチド-16までを含む。実施形態では、ASOスクリーニングのためのイントロン標的領域は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対するヌクレオチド+6から+100、および保持されたイントロンの3'スプライス部位に対するヌクレオチド-16から-100を含む。エクソン標的部位は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける+2eから-4e、および保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける+2eから-4eのヌクレオチドを含む。「n」または「N」はヌクレオチドを表し、「y」はピリミジンを表す。図示された配列は、哺乳動物のスプライス部位に対するコンセンサス配列を表わし、個々のイントロンおよびエクソンは、すべての位置でコンセンサス配列に一致する必要はない。

【図2A】図2Aは、核内遺伝子出力の標的とされた増強（TANGO）の典型的な概略図を示す。図2Aは、核と細胞質の区画に分割された細胞を示す。核内では、エクソン（長方形）およびイントロン（接続線）から成る標的遺伝子のmRNA前駆体の転写産物が、mRNAを生成するためにスプライシングを受け、このmRNAは、細胞質に輸送され、標的タンパク質に翻訳される。この標的遺伝子に関して、イントロン1のスプライシングは非効率的であり、保持されたイントロン含有（RIC）mRNA前駆体は、主として核内に蓄積し、細胞質に輸送された場合は劣化し、標的タンパク質の産生にはつながらない。

【図2B】図2Bは、核内遺伝子出力の標的とされた増強（TANGO）の典型的な概略図を示す。図2Bは、核と細胞質の区画に分割された図2Aと同じ細胞の一例を示す。アンチセンスオリゴマー（ASO）での処置は、イントロン1のスプライシングを促進し、結果としてmRNAの増加をもたらし、これは順に、高レベルの標的タンパク質に翻訳される。

【図3A】図3Aは、NM_004937およびNM_001031681に対応するCTNSのためのReSeq遺伝子の概略を示す。円で囲んだイントロンのイントロン保持率（PIR）が示される。

【図3B】図3Bは、NM_004937およびNM_001031681に対応するCTNSのためのReSeq遺伝子の概略を示す。円で囲んだイントロンのPIRが示される。

【図3C】図3Cは、偽処理した細胞と比較した、80nMの示されたASOで24時間処置されたARPE-19細胞におけるイントロン10なしでのCTNS mRNAの発現レベルの平均（n=3）倍率変化を示す典型的なグラフを示す。データはRPL32発現に正規化される。

【図4A】図4Aは、NM_000782およびNM_001128915に対応するCYPA1のためのReSeq遺伝子の概略を示す。円で囲んだイントロンのPIRが示される。

【図4B】図4Bは、NM_000782およびNM_001128915に対応するCYPA1のためのReSeq遺伝子の概略を示す。円で囲んだイントロンのPIRが示される。

【図4C】図4Cは、偽処理した細胞と比較した、80nMの示されたASOで24時間処置されたARPE-19細胞におけるイントロン10なしでのCYPA1 mRNA

10

20

30

40

50

の発現レベルの平均 (n = 3) 倍率変化を示す典型的なグラフを示す。データはRPL32発現に正規化される。

【図5】図5は、NM_001304569、NM_000278、NM_003990、NM_003988、NM_003987およびNM_003989に対応するPAX2のためのRefSeq遺伝子の概略を示す。

【図6A】図6Aは、PPARD:NM_006238、NM_177435、NM_001171818、NM_001171819およびNM_001171820に対応するPPARDのためのRefSeq遺伝子の概略を示す。円で囲んだイントロンのイントロン保持率 (PIR) が示される (PPARDイントロン3、NM_006238)。

【図6B】図6Bは、偽処理した細胞と比較した、80nMの示されたASOで24時間処置されたARPE-19細胞におけるイントロン3なしでのPPARD mRNAの発現レベルの平均 (n = 3) 倍率変化を示す典型的なグラフを示す。データはRPL32発現に正規化される。

【図6C】図6Cは、PPARD:NM_006238、NM_177435、NM_001171818、NM_001171819およびNM_001171820に対応するPPARDのためのRefSeq遺伝子の概略を示す。円で囲んだイントロンのイントロン保持率 (PIR) が示される (PPARDイントロン4、NM_006238)。

【図6D】図6Dは、PPARD:NM_006238、NM_177435、NM_001171818、NM_001171819およびNM_001171820に対応するPPARDのためのRefSeq遺伝子の概略を示す。円で囲んだイントロンのイントロン保持率 (PIR) が示される (PPARDイントロン5、NM_006238)。

【図6E】図6Eは、PPARD:NM_006238、NM_177435、NM_001171818、NM_001171819およびNM_001171820に対応するPPARDのためのRefSeq遺伝子の概略を示す。円で囲んだイントロンのイントロン保持率 (PIR) が示される (PPARDイントロン6、NM_006238)。

【図6F】図6Fは、偽処理した細胞と比較した、80nMの示されたASOで24時間処置されたARPE-19細胞におけるイントロン6なしでのPPARD mRNAの発現レベルの平均 (n = 3) 倍率変化を示す典型的なグラフを示す。データはRPL32発現に正規化される。

【図6G】図6Gは、PPARD:NM_006238、NM_177435、NM_001171818、NM_001171819およびNM_001171820に対応するPPARDのためのRefSeq遺伝子の概略を示す。円で囲んだイントロンのイントロン保持率 (PIR) が示される (PPARDイントロン7、NM_006238)。

【発明を実施するための形態】

【0160】

腎不全は、米国だけで600,000を超える人に影響を与えると推測される衰弱した状態である。多くの場合、透析は寿命を延ばすことができ、2009年の試験によると、概算で400,000人の患者が腎透析を受けている。さらに、腎不全に苦しむ多数の患者にとっての唯一の望みは腎臓移植であるが、ドナーブールは、それを必要とする患者のわずか少数の処置に十分であるだけである。それ故、移植を受ける確率は低く、移植を受けることができない人の状態を改善することができる処置はほとんどない。それ故、腎臓病を処置する組成物および方法が必要とされている。

【0161】

1つを超えるイントロンを有するタンパク質コード遺伝子の一次転写産物における個々のイントロンは、異なる効率性を有する一次転写産物からスプライシングされる。ほとんどの場合、完全にスプライシングされたmRNAだけが、続く細胞質での翻訳のために核膜孔を通って輸送される。スプライシングされていない又は部分的にスプライシングされた転写産物は、核内で検出可能である。完全にスプライシングされていない転写産物の核内蓄積が、タンパク質に翻訳され得る細胞質中の有害である可能性のあるmRNAの蓄積を防ぐメカニズムであると一般的に考えられる。幾つかの遺伝子に関して、最も効率性の低

10

20

30

40

50

いイントロンのスプライシングは、細胞質中での翻訳に先立つ、遺伝子発現における転写後の律速の工程である。

【0162】

腎臓病のサブセットにおいて不足しているタンパク質をコードする、かなりのレベルの遺伝子の部分的にスプライシングされた転写産物が、ヒト細胞の核内で発見されてきた。これらのmRNA前駆体の種は、少なくとも1つの保持されたイントロンを含む。本発明は、完全にスプライシングされた成熟mRNAの安定した状態の産生を増加させる、およびそれ故、翻訳されたタンパク質レベルを増加させるために、遺伝子発現の核ステージに対して律速的である1つ以上の保持されたイントロンのスプライシングをアップレギュレートするための組成物および方法を提供する。これらの組成物および方法は、核内に蓄積する保持されたイントロン含有mRNA前駆体のイントロンスプライス部位で構成的スプライシングを促進するアンチセンスオリゴマー(ASO)を活用する。したがって、実施形態では、タンパク質不足によって引き起こされた疾病を処置するために本発明の方法を使用して、タンパク質が増加される。

10

【0163】

本明細書に記載される本発明によって処置することができる腎臓病は、被験体において遺伝子産物が不足している疾患であり、ここで遺伝子産物の不足は腎臓病を引き起こす。

【0164】

これらのCTNS、PAX2、CYP24A1およびPPARDのmRNA前駆体の種は、少なくとも1つの保持されたイントロンを含む。本発明は、完全にスプライシングされた成熟mRNAの安定した状態の産生を増加させる、およびそれ故、翻訳されたCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのタンパク質レベルを増加させるために、遺伝子発現の核ステージに対して律速的である1つ以上の保持されたCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのイントロンのスプライシングをアップレギュレートするための組成物および方法を提供する。これらの組成物および方法は、核内に蓄積する保持されたイントロン含有CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA前駆体(RIC mRNA前駆体)のイントロンスプライス部位で構成的スプライシングを促進するアンチセンスオリゴマー(ASO)を活用することができる。したがって、実施形態では、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDの不足によって引き起こされた疾病を処置するために本発明の方法を使用して、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのタンパク質が増加される。

20

【0165】

他の実施形態では、本発明の方法は、必要としている被験体の症状を処置するために、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDの産生を増加させるために使用され得る。実施形態では、被験体は、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDが野生型と比較して必ずしも不足していない疾患有し、その場合、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDの増加は、それにもかかわらず疾病を軽減する。実施形態では、疾病は、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのハプロ不全によって引き起こされ得る。

30

【0166】

腎障害シスチン蓄積症 / 遅発性シスチン蓄積症

40

いくつかの実施形態では、本明細書において記載された本発明は、常染色体劣性腎障害の幼児腎障害シスチン蓄積症を処置するために使用されうる。幼児腎障害シスチン蓄積症は、リソソーム中のシスチンの蓄積によって特徴づけられる。幼児腎障害シスチン蓄積症の臨床症状は、低血糖および電解質、尿中のタンパク質の過剰排泄、遅い身体発育、弱い骨、甲状腺機能低下症、失明、筋力低下、肺機能障害および腎不全を含む。典型的には幼児腎障害性シスチン蓄積症は幼児期に診断される。

【0167】

いくつかの実施形態では、本明細書において記載された本発明は、常染色体劣性腎障害の遅発性シスチン蓄積症を処置するために使用されうる。遅発性シスチン蓄積症は幼児型と

50

して類似の臨床症状を有するが、遅発型は、典型的には青年期後期または成人早期のいずれかにおいて現われる。

【 0 1 6 8 】

タンパク質シスチノシン (C T N S) の不足は、幼児腎障害シスチン蓄積症および遅発性シスチン蓄積症の両方において見られる臨床症状を結果としてもたらす。 1 7 q 1 3 . 2 に位置し、 1 2 エクソンに及ぶ C T N S 遺伝子は、 C T N S タンパク質をコードする。不十分な量の C T N S タンパク質を結果としてもたらす C T N S 遺伝子の突然変異が、幼児腎障害シスチン蓄積症および遅発性シスチン蓄積症の両方の進行の原因であることが示されてきた。ある研究では、 G 1 6 9 D ミスセンス変異が、幼児腎障害シスチン蓄積症の患者において発見された。このミスセンス変異は結果として C T N S のレベルを減少させ、 C T N S の不足と、幼児腎障害シスチン蓄積症の進行との間の明確な関係を提供した。

10

【 0 1 6 9 】

巢状分節性糸球体硬化症 7 / 乳頭腎症候群

いくつかの実施形態では、本明細書において記載された本発明は、常染色体優性腎障害巢状分節性糸球体硬化症 7 (F S G S 7) を処置するために使用することができる。 F S G S 7 は成人における腎不全の主要原因のうち 1 つである。 F S G S 7 は浮腫、低アルブミン血症、高脂血症および高血圧症を特徴づけ、最終的に腎不全を結果としてもたらす。

【 0 1 7 0 】

いくつかの実施形態では、本明細書において記載された本発明は、常染色体優性腎障害の乳頭腎症候群 (P A P R S) を処置するために使用することができる。 P A P R S は、低形成腎、低異形成、多囊胞性異形性腎、寡巨大糸球体症、腎不全、および膀胱尿管逆流によって特徴づけられる。

20

【 0 1 7 1 】

タンパク質ペアードボックス遺伝子 2 (P A X 2) の欠失は、 F S G S 7 および P A P R S の両方において見られる臨床症状を結果としてもたらす。 1 0 q 2 4 . 3 1 に位置し、 1 2 エクソンに及ぶ P A X 2 遺伝子は、 P A X 2 タンパク質をコードする。不十分な量の P A X 2 タンパク質を結果としてもたらす P A X 2 遺伝子の突然変異が、 F S G S 7 および P A P R S の両方の進行の原因であることが示されてきた。ある研究では、 G 7 6 S のミスセンス変異が P A P R S で苦しむ家族の 5 世代において発見された。このミスセンス変異は結果として P A X 2 タンパク質のレベルを減少させ、 P A X 2 タンパク質の不足と、 P A P R S の進行との間の明確な関係を提供した。

30

【 0 1 7 2 】

幼児高カルシウム血症

いくつかの実施形態では、本明細書において記載された本発明は、常染色体劣性腎疾患の幼児高カルシウム血症を処置するために使用されうる。幼児高カルシウム血症は、腎結石、骨痛、腹痛症、吐き気、嘔吐、多尿症、ならびにうつ病、不安症、認知機能障害、不眠症、および昏睡などの精神状態を結果としてもたらしうる、血液中の上昇したカルシウムのレベルによって特徴づけられる。

【 0 1 7 3 】

タンパク質シトクロム P 4 5 0 ファミリー 2 4 、サブファミリー A 、ポリペプチド 1 (C Y P 2 4 A 1) の不足は、幼児高カルシウム血症において見られる臨床症状を結果としてもたらす。 2 0 q 1 3 . 2 に位置し、 2 エクソンに及ぶ C Y P 2 4 A 1 遺伝子は、 C Y P 2 4 A 1 タンパク質をコードする。不十分な量の C Y P 2 4 A 1 タンパク質を結果としてもたらす C Y P 2 4 A 1 遺伝子の突然変異が、幼児高カルシウム血症の進行の原因であることが示されてきた。ある研究では、幼児高カルシウム血症と診断された多数の子供たちが調査された。 R 3 9 6 W または E 3 2 2 K のミスセンス変異を示す子供たちは、 C Y P 2 4 A 1 活性の完全な破壊 (c o m p l e t e a b l a t i o n) を受けることが示され、 L 4 0 9 S の突然変異を示す子供たちは、少ないが測定可能なレベルを保持した。この発見により、減少した C Y P 2 4 A 1 タンパク質と、幼児高カルシウム血症の臨床症状との間の明確な関係が提供される。

40

50

【 0 1 7 4 】

脂質代謝機能障害および慢性腎疾患

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される本発明は、タンパク質ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体（P P A R D）の不足により引き起こされた、脂質代謝不全、慢性腎臓病（C K D）、末期腎不全（E S R D）、または心血管疾患（C V D）を治療するために使用される。染色体 6 に位置し、8 エクソンに及ぶ P P A R D 遺伝子によりコードされる P P A R D タンパク質の量の欠失は、増大した脂質代謝の機能障害に関連づけられることが示されてきた。

【 0 1 7 5 】

保持されたイントロン含有mRNA前駆体 (RIC mRNA前駆体)

実施形態では、本発明の方法は、遺伝子から転写され、かつ本明細書において記載される疾患において不足していることが分かるタンパク質をコードする保持されたイントロン含有mRNA前駆体（RIC mRNA前駆体）の存在を、細胞核中で活用する。成熟し、完全にスプライシングされたmRNAを産出するための、特定のRIC mRNA前駆体の種のスプライシングは、保持されたイントロンのスプライシングアウトを刺激するASOを用いて誘導される。結果としてもたらされる成熟mRNAは、細胞質に輸送され翻訳され、それによって被験体の細胞中のタンパク質量を増加させ、本明細書で記載される疾患または疾病的症状を緩和する。実施形態では、本発明の方法は、CTNS、PAX2、CYP24A1、またはPPARD遺伝子から転写され、かつCTNS、PAX2、CYP24A1、またはPPARDのmRNAを産出するための、CTNS、PAX2、CYP24A1、またはPPARDのRIC mRNA前駆体の種のスプライシングは、保持されたイントロンのスプライシングアウトを刺激するASOを用いて誘導されうる。結果としてもたらされる成熟したCTNS、PAX2、CYP24A1、またはPPARDのmRNAは、細胞質に輸送されて翻訳され、それによって、患者の細胞内でCTNS、PAX2、CYP24A1、またはPPARDのタンパク質の量を増大させ、かつCTNS、PAX2、CYP24A1、またはPPARDの不足により引き起こされるCNSの疾患または疾病的症状の緩和させることができる。この方法は以下でさらに詳述されるが、核内遺伝子出力の標的化増大（TANGO）として知られる。

〔 0 1 7 6 〕

実施形態では、保持されたイントロンは、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 35 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %あるいは少なくとも約 50 %の保有の保持率に基づき、保持されたイントロンとして特定されたイントロンである。実施形態では、保持されたイントロンはすなわち、約 5 % から約 100 %、約 5 % から約 95 %、約 5 % から約 90 %、約 5 % から約 85 %、約 5 % から約 80 %、約 5 % から約 75 %、約 5 % から約 70 %、約 5 % から約 65 %、約 5 % から約 60 %、約 5 % から約 55 %、約 5 % から約 60 %、約 5 % から約 55 %、約 5 % から約 50 %、約 5 % から約 45 %、約 5 % から約 40 %、約 5 % から約 35 %、約 5 % から約 30 %、約 5 % から約 25 %、約 5 % から約 20 %、約 5 % から約 15 %、約 10 % から約 100 %、約 10 % から約 95 %、約 10 % から約 90 %、約 10 % から約 85 %、約 10 % から約 80 %、約 10 % から約 75 %、約 10 % から約 70 %、約 10 % から約 65 %、約 10 % から約 60 %、約 10 % から約 55 %、約 10 % から約 50 %、約 10 % から約 45 %、約 10 % から約 40 %、約 10 % から約 35 %、約 10 % から約 30 %、約 10 % から約 25 %、約 10 % から約 20 %、約 10 % から約 15 %、約 15 % から約 95 %、約 15 % から約 90 %、約 15 % から約 85 %、約 15 % から約 80 %、約 15 % から約 75 %、約 15 % から約 70 %、約 15 % から約 65 %、約 15 % から約 60 %、約 15 % から約 55 %、約 15 % から約 50 %、約 15 % から約 45 %、約 15 % から約 40 %、約 15 % から約 35 %、約 15 % から約 30 %、約 15 % から約 25 %、約 15 % から約 20 %、約 15 % から約 15 %、約 15 % から約 10 %、約 15 % から約 5 %、約 15 % から約 0 %。

ら約 5 5 %、約 1 5 %から約 5 0 %、約 1 5 %から約 4 5 %、約 1 5 %から約 4 0 %、約 1 5 %から約 3 5 %、約 1 5 %から約 3 0 %、約 1 5 %から約 2 5 %、約 2 0 %から約 1 0 0 %、約 2 0 %から約 9 5 %、約 2 0 %から約 9 0 %、約 2 0 %から約 8 5 %、約 2 0 %から約 8 0 %、約 2 0 %から約 7 5 %、約 2 0 %から約 7 0 %、約 2 0 %から約 6 5 %、約 2 0 %から約 6 0 %、約 2 0 %から約 6 5 %、約 2 0 %から約 6 0 %、約 2 0 %から約 5 5 %、約 2 0 %から約 5 0 %、約 2 0 %から約 4 5 %、約 2 0 %から約 4 0 %、約 2 0 %から約 3 5 %、約 2 0 %から約 3 0 %、約 2 5 %から約 1 0 0 %、約 2 5 %から約 9 5 %、約 2 5 %から約 9 0 %、約 2 5 %から約 8 5 %、約 2 5 %から約 8 0 %、約 2 5 %から約 7 5 %、約 2 5 %から約 7 0 %、約 2 5 %から約 6 5 %、約 2 5 %から約 6 0 %、約 2 5 %から約 5 5 %、約 2 5 %から約 5 0 %、約 2 5 %から約 4 5 %、約 2 5 %から約 4 0 %、あるいは約 2 5 %から約 3 5 %の保定期に基づき、保持されたイントロンとして特定されたイントロンである。複数の実施形態では、この目的に有用な他の A S O は、例えば、本明細書に記載の方法を用いて特定される。

【 0 1 7 7 】

実施形態では、 C T N S イントロンの番号付けは、 N M _ 0 0 1 0 3 1 6 8 1 または N M _ 0 0 1 0 3 1 6 8 1 における m R N A 配列に相当する。実施形態では、 C T N S R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 9 および / または 1 0 内にある。実施形態では、 C T N S R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 1 0 内にある。実施形態では、保持されたイントロンのパーセントは 1 8 % でありうる。実施形態では、 C T N S R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 9 内にある。実施形態では、保持されたイントロンのパーセントは 1 0 % でありうる。実施形態では、 R I C m R N A 前駆体の標的部位への A S O のハイブリダイゼーションは、結果として、保持されたイントロン 9 および / または 1 0 のスプライス部位 (5 ' スプライス部位あるいは 3 ' スプライス部位) におけるスプライシングの増強と、その後の C T N S タンパク質産生の増大をもたらした。異なる C T N S アイソフォーム配列を参照することで、イントロンの番号付けは変化しうると解される。当業者であれば、本明細書で提供されるイントロン配列に基づき、 N M _ 0 0 1 0 3 1 6 8 1 または N M _ 0 0 1 0 3 1 6 8 1 における m R N A 配列を参照して得られる番号を使用することで、任意のアイソフォームにおける対応する番号を判定することができる。当業者はさらに、本明細書で提供されるイントロン配列に基づき、 N M _ 0 0 1 0 3 1 6 8 1 または N M _ 0 0 1 0 3 1 6 8 1 における m R N A 配列を参照して得られるイントロン番号を使用することで、本発明の方法を使用して標的化のための任意の C T N S アイソフォームにおける隣接するエクソンの配列を判定することができる。

【 0 1 7 8 】

実施形態では、 P A X 2 イントロンの番号付けは、 N M _ 0 0 1 3 0 4 5 6 9 、 N M _ 0 0 0 2 7 8 、 N M _ 0 0 3 9 9 0 、 N M _ 0 0 3 9 8 8 、 N M _ 0 0 3 9 8 7 、または N M _ 0 0 3 9 8 9 における m R N A 配列に相当する。実施形態では、 P A X 2 R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 1 または 2 内にある。実施形態では、 R I C m R N A 前駆体の標的部位への A S O のハイブリダイゼーションは、結果として、保持されたイントロン 1 または 2 のスプライス部位 (5 ' スプライス部位あるいは 3 ' スプライス部位) におけるスプライシングの増強と、その後の P A X 2 タンパク質産生の増大をもたらした。異なる P A X 2 アイソフォーム配列を参照することで、イントロンの番号付けは変化しうると解される。当業者は、本明細書において提供されるイントロン配列に基づくか、または N M _ 0 0 1 3 0 4 5 6 9 、 N M _ 0 0 0 2 7 8 、 N M _ 0 0 3 9 9 0 、 N M _ 0 0 3 9 8 8 、 N M _ 0 0 3 9 8 7 、もしくは N M _ 0 0 3 9 8 9 における m R N A 配列に関して提供される番号を使用して、任意のアイソフォーム中の対応するイントロン番号を判定することができる。当業者は、本明細書において提供されるイントロン配列に基づくか、または N M _ 0 0 1 3 0 4 5 6 9 、 N M _ 0 0 0 2 7 8 、 N M _ 0 0 3 9 9 0 、 N M _ 0 0 3 9 8 8 、 N M _ 0 0 3 9 8 7 、もしくは N M _ 0 0 3 9 8 9 における m R N A 配列に関して提供されたイントロン番号を使用する本発明の方法を使用して、標的とするため

10

20

30

40

50

の任意の P A X 2 アイソフォーム中の隣接するエクソンの配列を判定することもできる。

【 0 1 7 9 】

実施形態では、 C Y P 2 4 A 1 イントロンの番号付けは、 N M _ 0 0 0 7 8 2 または N M _ 0 0 1 1 2 8 9 1 5 における m R N A 配列に相当する。実施形態では、 C Y P 2 4 A 1 R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 1 0 および / もしくは 9 、またはイントロン 1 1 内にある。実施形態では、 C Y P 2 4 A 1 R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 9 内にある。実施形態では、 C Y P 2 4 A 1 R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 1 1 内にある。実施形態では、保持されたイントロンのパーセントは 2 3 % である。実施形態では、 C Y P 2 4 A 1 R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 1 0 内にある。実施形態では、保持されたイントロンのパーセントは 5 0 % である。実施形態では、 R I C m R N A 前駆体の標的部位への A S O のハイブリダイゼーションは、結果として、保持されたイントロン 1 0 および / もしくは 9 、またはイントロン 1 1 のスプライス部位 (5 ' スプライス部位あるいは 3 ' スプライス部位) におけるスプライシングの増強と、その後の C Y P 2 4 A 1 タンパク質産生の増大をもたらした。異なる C Y P 2 4 A 1 アイソフォーム配列を参照することで、イントロンの番号付けは変化しうると解される。当業者であれば、本明細書で提供されるイントロン配列に基づき、 N M _ 0 0 0 7 8 2 または N M _ 0 0 1 1 2 8 9 1 5 における m R N A 配列を参照して得られる番号を使用することで、任意のアイソフォームにおける対応する番号を判定することができる。当業者はさらに、本明細書で提供されるイントロン配列に基づき、 N M _ 0 0 0 7 8 2 または N M _ 0 0 1 1 2 8 9 1 5 における m R N A 配列を参照して得られるイントロン番号を使用することで、本発明の方法を使用して標的化のための任意の C Y P 2 4 A 1 アイソフォームにおける隣接するエクソンの配列を判定することができる。

【 0 1 8 0 】

実施形態では、 P P A R D イントロンの番号付けは、 N M _ 0 0 6 2 3 8 、 N M _ 1 7 7 4 3 5 、 N M _ 0 0 1 1 7 1 8 1 8 、 N M _ 0 0 1 1 7 1 8 1 9 、または N M _ 0 0 1 1 7 1 8 2 0 における m R N A 配列に相当する。実施形態では、 P P A R D R I C m R N A 前駆体の標的部位は、イントロン 3 、もしくは 4 、もしくは 5 、もしくは 6 、もしくは 7 、および / またはイントロン 2 、もしくは 3 、もしくは 4 、もしくは 5 、もしくは 6 、もしくは 7 、もしくは 8 内にある。実施形態では、 P P A R D R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 2 内にある。実施形態では、 P P A R D R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 3 内にある。実施形態では、 P P A R D R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 4 内にある。実施形態では、 P P A R D R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 5 内にある。実施形態では、 P P A R D R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 6 内にある。実施形態では、 P P A R D R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 7 内にある。実施形態では、 P P A R D R I C m R N A 前駆体の標的部位はイントロン 8 内にある。実施形態では、 R I C m R N A 前駆体の標的部位に対する A S O のハイブリダイゼーションは、保持されたイントロンのスプライス部位 (5 ' スプライス部位または 3 ' スプライス部位) における増強されたスプライシングを結果としてもたらし、その後 P P A R D タンパク質産生を増大させる。異なる P P A R D アイソフォーム配列を参照することで、イントロンの番号付けは変化することもあると解される。当業者は、本明細書において提供されるイントロン配列に基づくか、または N M _ 0 0 6 2 3 8 、 N M _ 1 7 7 4 3 5 、 N M _ 0 0 1 1 7 1 8 1 8 、 N M _ 0 0 1 1 7 1 8 1 9 、もしくは N M _ 0 0 1 1 7 1 8 2 0 における m R N A 配列に関して提供される番号を使用して、任意のアイソフォーム中の対応するイントロン番号を判定することができる。当業者は、本明細書において提供されるイントロン配列に基づくか、または N M _ 0 0 6 2 3 8 、 N M _ 1 7 7 4 3 5 、 N M _ 0 0 1 1 7 1 8 1 8 、 N M _ 0 0 1 1 7 1 8 1 9 、もしくは N M _ 0 0 1 1 7 1 8 2 0 における m R N A 配列に関して提供されたイントロン番号を使用する本発明の方法を使用して、標的とするための任意の P P A R D アイソフォーム中の隣接するエクソンの配列を判定することもできる。

【 0 1 8 1 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるASOは、CTNS, PAX2, CYP24A1、またはPPARDのゲノム配列から転写されたRIC mRNA前駆体を標的とする。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるASOは、CTNS, PAX2, CYP24A1、またはPPARDのRIC mRNA前駆体の配列を標的とする。

【0182】

いくつかの実施形態では、ASOは、CTNSゲノム配列によりコードされたRIC mRNA前駆体の転写産物の配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン9および/または10を含むCTNSのゲノム配列によりコードされたRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ_ID_NO:3によってコードされたRIC mRNA前駆体を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ_ID_NO:16または17のRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン9および/または10を含むSEQ_ID_NO:16または17のRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、本明細書中に開示されるASOは、SEQ_ID_NO:10748および/または10734を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ_ID_NO:20-6952のうちいずれか1つの配列を含む。

【0183】

いくつかの実施形態では、ASOは、PAX2のゲノム配列によりコードされたRIC mRNA前駆体の転写産物の配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン1および/または2を含むPAX2のゲノム配列によりコードされたRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ_ID_NO:2によってコードされたRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ_ID_NO:10-15のうち1つ以上のRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン1または2を含む、SEQ_ID_NO:10-15のうち1つ以上のRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、本明細書中に開示されるASOは、SEQ_ID_NO:10740および/または10738を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ_ID_NO:6953-8623のうちいずれか1つの配列を含む。

【0184】

いくつかの実施形態では、ASOは、CYP24A1のゲノム配列によりコードされたRIC mRNA前駆体の転写産物の配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン10および/もしくは9、またはイントロン11を含むCYP24A1のゲノム配列によりコードされたRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ_ID_NO:4によってコードされたRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ_ID_NO:18または19のRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン10および/もしくは9、またはイントロン11を含むSEQ_ID_NO:18または19のRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、本明細書中に開示されるASOは、SEQ_ID_NO:10748、10734、10746、10745、および/または10741を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ_ID_NO:9520-10733のうちいずれか1つの配列を含む。

【0185】

いくつかの実施形態では、ASOは、PPARDのゲノム配列によりコードされたRIC mRNA前駆体の転写産物の配列を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、および/または保持されたイントロン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8を含むPPARDのゲノム配列によりコードされたRIC mRNA前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ_ID_NO:

10

20

30

40

50

1によってコードされたR I C m R N A前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ ID NO: 5 - 9のうち1つ以上のR I C m R N A前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、および/または保持されたイントロン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8を含むSEQ ID NO: 5 - 9のうち1つ以上のR I C m R N A前駆体の転写産物を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ ID NO: 10736、10747、10739、10743、10742、10737、10735、および/または10744を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、SEQ ID NO: 20 - 6952のうちいずれか1つの配列を含む。

10

【0186】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン9および/または10を含む、CTNSのR I C m R N A前駆体のエクソン9および/または10を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン9および/または10を含む、CTNS R I C m R N A前駆体の5'スプライス部位よりも上流(あるいは5')のエクソン9および/または10配列を標的とする。

【0187】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン9および/または10を含む、CTNSのR I C m R N A前駆体におけるイントロン9および/または10を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン9および/または10を含む、CTNS R I C m R N A前駆体の5'スプライス部位よりも下流(あるいは3')のイントロン9および/または10配列を標的とする。

20

【0188】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン9および/または10を含む、CTNS R I C m R N A前駆体の3'スプライス部位よりも上流(あるいは5')のイントロン9および/または10配列を標的とする。

【0189】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン9および/または10を含む、CTNSのR I C m R N A前駆体におけるエクソン10および/または11を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン9および/または10を含む、CTNS R I C m R N A前駆体の3'スプライス部位よりも下流(あるいは3')のエクソン10および/または11配列を標的とする。

30

【0190】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン1または2を含む、PAX2のR I C m R N A前駆体のエクソン1または2を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン1または2を含む、PAX2のR I C m R N A前駆体の5'スプライス部位よりも上流(あるいは5')のエクソン1または2配列を標的とする。

【0191】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン1または2を含む、PAX2のR I C m R N A前駆体におけるイントロン1または2を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン1または2を含む、PAX2のR I C m R N A前駆体の5'スプライス部位よりも下流(あるいは3')のイントロン1または2配列を標的とする。

40

【0192】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン1または2を含む、PAX2のR I C m R N A前駆体の3'スプライス部位よりも上流(あるいは5')のイントロン1または2配列を標的とする。

【0193】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン1または2を含む、PAX2のR I C m R N A前駆体におけるエクソン2または3を標的とする。いくつかの実施形態

50

では、ASOは、保持されたイントロン1または2を含む、PAX2のRIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも下流（あるいは3'）のエクソン2または3配列を標的とする。

【0194】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン10および／もしくは9、またはイントロン11を含む、CYP24A1のRIC mRNA前駆体のエクソン10および／もしくは9、またはエクソン11を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン10および／もしくは9、またはイントロン11を含む、CYP24A1のRIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも上流（あるいは5'）のエクソン10および／もしくは9、またはエクソン11配列を標的とする。

10

【0195】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン10および／もしくは9、またはイントロン11を含む、CYP24A1のRIC mRNA前駆体におけるイントロン10および／もしくは9、またはイントロン11を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン10および／もしくは9、またはイントロン11を含む、CYP24A1のRIC mRNA前駆体の5'スプライス部位よりも下流（あるいは3'）のイントロン10および／もしくは9、またはイントロン11配列を標的とする。

【0196】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン10および／もしくは9、またはイントロン11を含む、CYP24A1のRIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも上流（あるいは5'）のイントロン10および／もしくは9、またはイントロン11配列を標的とする。

20

【0197】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン10および／もしくは9、またはイントロン11を含む、CYP24A1のRIC mRNA前駆体におけるエクソン11および／もしくは10、またはエクソン12を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン10および／もしくは9、またはイントロン11を含む、CYP24A1のRIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも下流（あるいは3'）のエクソン11および／もしくは10、またはエクソン12配列を標的とする。

30

【0198】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、および／または保持されたイントロン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8を含む、PPARDのRIC mRNA前駆体のエクソン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、および／またはエクソン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、および／または保持されたイントロン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8を含む、PPARDの5'スプライス部位よりも上流（あるいは5'）のエクソン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、および／またはエクソン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8の配列を標的とする。

40

【0199】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、および／または保持されたイントロン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8を含むPPARDのRIC mRNA前駆体における、イントロン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、および／またはイントロン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、および／または保持されたイントロン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、

50

もしくは8を含む、PPARDの5'スプライス部位よりも下流（あるいは3'）のイントロン3、もしくは4、もしくは3、もしくは6、もしくは7、および/またはイントロン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8の配列を標的とする。

【0200】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、および/または保持されたイントロン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8を含む、PPARDの3'スプライス部位よりも上流（あるいは5'）のイントロン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、および/またはイントロン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8の配列を標的とする。

10

【0201】

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、および/または保持されたイントロン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8を含む、PPARDのRIC mRNA前駆体におけるエクソン4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8、および/またはエクソン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8、もしくは9を標的とする。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、および/または保持されたイントロン2、もしくは3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8を含む、PPARDのRIC mRNA前駆体の3'スプライス部位よりも下流（あるいは3'）のエクソン4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8、および/またはエクソン3、もしくは4、もしくは5、もしくは6、もしくは7、もしくは8、もしくは9の配列を標的とする。

20

【0202】

タンパク質発現

実施形態では、本明細書において記載される方法が、機能的タンパク質の産生を増加させるために使用される。本明細書で使用されるように、用語「機能的な（functional）」は、処置される疾患の1つ以上の症状を除去するのに必要とされるタンパク質の活性または機能の量を指す。実施形態では、部分的な機能的タンパク質の産生を増加させるために、前記方法が使用される。本明細書において使用されるように、用語「部分的な機能的」は、疾患または疾病の1つ以上の症状を除去または予防するために必要な活性または機能の量よりも少ない、タンパク質の活性または機能の任意の量を指す。いくつかの実施形態では、部分的な機能的タンパク質またはRNAは、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の、完全な機能的タンパク質またはRNAに比してより小さな活性を持つだろう。

30

【0203】

実施形態では、該方法は、タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体を有する被験体の細胞によって、タンパク質発現を増加させる方法であり、前記被験体は、本明細書に記載されたタンパク質の活性量の欠失に起因する、本明細書に記載の疾患有する。いくつかの実施形態では、タンパク質量の欠失は、タンパク質のハプロ不全に起因する。そのような実施形態では、被験体は、機能的タンパク質をコードする第1の対立遺伝子と、タンパク質を産生しない第2の対立遺伝子とを有する。別のそのような実施形態では、被験体は、機能的タンパク質をコードする第1の対立遺伝子と、非機能的タンパク質をコードする第2の対立遺伝子を有する。別のそのような実施形態では、被験体は、機能的タンパク質をコードする第1の対立遺伝子と、部分的な機能的タンパク質をコードする第2の対立遺伝子を有する。これらの実施形態のいずれの場合でも、アンチセンスオリゴマーは、第1の対立遺伝子（機能的タンパク質をコードする）から転写されたRIC mRNA前駆体

40

50

の標的部位に結合し、それによって、R I C m R N A 前駆体からの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘導し、かつ、機能的タンパク質をコードする成熟m R N A 量の増加と、被検体の細胞中のタンパク質発現の増加をもたらす。

【 0 2 0 4 】

実施形態では、被検体は、機能的タンパク質をコードする第1の対立遺伝子と、部分的な機能的タンパク質をコードする第2の対立遺伝子を有し、アンチセンスオリゴマーは、第1の対立遺伝子から転写されたR I C m R N A 前駆体の標的部位、あるいは第2の対立遺伝子（部分的な機能的タンパク質をコードする）から転写されたR I C m R N A 前駆体の標的部位に結合する。それによって、R I C m R N A 前駆体からの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘導し、タンパク質をコードする成熟m R N A 量の増加と、被検体の細胞中の機能的あるいは部分的な機能的タンパク質発現の増加をもたらす。

10

【 0 2 0 5 】

関連する実施形態では、前記方法は、タンパク質あるいは機能的R N A の発現を増大させるためにA S Oを用いる方法である。実施形態では、タンパク質をコードするR I C m R N A 前駆体を有する被検体の細胞中の、本明細書に記載のタンパク質発現を増加させるために、A S Oを用いる。その被検体は、タンパク質の量または機能の不足を有する。

【 0 2 0 6 】

実施形態では、疾患または疾病を引き起こすタンパク質をコードするR I C m R N A 前駆体の転写産物は、本明細書に記載されるA S Oによって標的化される。いくつかの実施形態では、タンパク質をコードするR I C m R N A 前駆体の転写産物は、A S Oの標的とされる疾患の原因ではない。例えば、特定の経路における第1のタンパク質の突然変異または不足がもたらす疾患は、第2のタンパク質をコードするR I C m R N A 前駆体を標的とし、それによって第2のタンパク質産生が増加することで、改善しうる。いくつかの実施形態では、第2のタンパク質の機能は、第1のタンパク質の突然変異または不足（それは疾患または疾病の原因である）を補うことができる。

20

【 0 2 0 7 】

実施形態では、被検体は、

a . 第1の変異対立遺伝子であって、そこから、

i) タンパク質が、野生型対立遺伝子からの生成と比較して低下したレベルで生成され、

i i) タンパク質が、同等の野生型タンパク質と比較して低下した機能を有する形態で生成され、または

i i i) タンパク質あるいは機能的R N A は生成されない、

第1の変異対立遺伝子；及び

b . 第2の変異対立遺伝子であって、そこから、

i) タンパク質が、野生型対立遺伝子からの生成と比較して低下したレベルで生成され、

i i) タンパク質が、同等の野生型タンパク質と比較して低下した機能を有する形態で生成され、または

i i i) タンパク質は生成されない、

第2の変異対立遺伝子を有し、

ここで、R I C m R N A 前駆体は、第1の対立遺伝子および／または第2の対立遺伝子から転写される。これらの実施形態では、A S Oは、第1の対立遺伝子または第2の対立遺伝子から転写されたR I C m R N A 前駆体の標的部分に結合することで、R I C m R N A 前駆体からの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘導し、被検体の細胞中でタンパク質をコードするm R N A 量の増加を引き起こし、標的タンパク質または機能的R N A の発現の増加をもたらす。これらの実施形態では、R I C m R N A 前駆体からの保持されたイントロンの構成的スプライシングによって、発現レベルの増加した標的タンパク質あるいは機能的R N A は、同等の野生型タンパク質（部分的機能）と比較して機能が低い、あるいは同等の野生型タンパク質（完全機能）と比較して十分な機能を有する、いずれかの形態である。

40

【 0 2 0 8 】

50

実施形態では、本明細書に記載されるタンパク質をコードするmRNAのレベルは、例えば、アンチセンスオリゴマーで処置されない、あるいはRIC mRNA前駆体の標的部と結合しないアンチセンスオリゴマーによって処置される、対照細胞中で生成されたタンパク質をコードするmRNAの量と比較した時、1.1から10倍に増加する。

【0209】

実施形態では、タンパク質の量または活性の不足に起因する疾病は、ASOが標的とする保持されたイントロンの選択的または異常なスプライシングに起因する疾病ではない。実施形態では、タンパク質の量または活性の不足に起因する疾病は、タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体中の保持されたイントロンの選択的または異常なスプライシングに起因する疾病ではない。実施形態では、選択的または異常なスプライシングは、遺伝子から転写されたmRNA前駆体に生じ得るが、本発明の組成物および方法は、mRNA前駆体中の選択的または異常なスプライシングを妨げず、または修正しない。

10

【0210】

実施形態では、本発明の方法を使用して処置された被験体は、1つの対立遺伝子から部分的に機能的タンパク質を発現し、部分的に機能的タンパク質は、フレームシフト変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異、あるいは部分的な遺伝子欠失に起因する。実施形態では、本発明の方法を使用して処置された被験体は、1つの対立遺伝子から非機能的タンパク質を発現し、非機能的タンパク質は、1つの対立遺伝子中のフレームシフト変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異、あるいは部分的な遺伝子欠失に起因する。実施形態では、本発明の方法を使用して処置された被験体は、1つの対立遺伝子に全体の遺伝子欠失を有する。

20

【0211】

タンパク質発現を増加させるためのTANGOの使用

上述したように、実施形態では、核内遺伝子出力の標的とされた増強(TANGO)は、タンパク質の発現を増加させるために、本発明の方法において使用される。これらの実施形態では、タンパク質をコードする保持されたイントロン含有mRNA前駆体(RIC mRNA前駆体)は、細胞核に存在する。保持されたイントロンを含むRIC mRNA前駆体を有する細胞、5'スプライス部位に隣接するエクソン、および3'スプライス部位に隣接するエクソンは、RIC mRNA前駆体の標的部位に対して相補的な、アンチセンスオリゴマー(ASO)と接触する。RIC mRNA前駆体の標的部位とハイブリダイズするASOは、保持されたイントロンのスプライス部位(5'スプライス部位あるいは3'スプライス部位)のスプライシングを強化し、その後の標的タンパク質生成を増加させる。

30

【0212】

「mRNA前駆体」と「mRNA前駆体の転写産物」の用語は、交換可能に使用され、少なくとも1つのイントロンを含む任意のmRNA前駆体種を指す。実施形態では、mRNA前駆体またはmRNA前駆体の転写産物は、5'-7-メチルグアノシン・キャップ、および/またはポリA末端を含む。実施形態では、mRNA前駆体またはmRNA前駆体の転写産物は、5'-7-メチルグアノシン・キャップおよびポリA末端の両方を含む。幾つかの実施形態では、mRNA前駆体の転写産物は、5'-7-メチルグアノシン・キャップ、および/またはポリA末端を含まない。タンパク質に翻訳されない場合(あるいは核から細胞質へと輸送された場合)、mRNA前駆体の転写産物は非増殖性のメッセンジャーRNA(mRNA)分子である。

40

【0213】

本明細書で使用されるように、「保持されたイントロン含有mRNA前駆体」(「RIC mRNA前駆体」)は、少なくとも1つの保持されたイントロンを含むmRNA前駆体の転写産物である。RIC mRNA前駆体は、保持されたイントロン、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接するエクソン、保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接するエクソンを含み、標的タンパク質をコードする。「標的タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体」は、完全にスプライシングされた時、標的タンパク質をコ

50

ードすると解される。「保持されたイントロン」は、同じ遺伝子によってコードされた、例えば隣接するイントロンのような1つ以上の他のイントロンが、同じmRNA前駆体の転写産物からスプライシングアウトされた時に、mRNA前駆体の転写産物に存在する任意のイントロンである。幾つかの実施形態では、保持されたイントロンは、標的タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体中で最も豊富なイントロンである。実施形態では、保持されたイントロンは、細胞中の標的タンパク質をコードする遺伝子から転写されたRIC mRNA前駆体の集団中で最も豊富なイントロンであり、そのRIC mRNA前駆体の集団は2つ以上の保持されたイントロンを含む。実施形態では、標的タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体の集団中で最も豊富なイントロンに対し標的とされるアンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴマーが標的にする、あるいは結合する保持されたイントロンを含む集団中で、2つ以上の保持されたイントロンのスプライシングアウトを誘導する。実施形態では、それにより標的タンパク質をコードする成熟mRNAが生成される。「成熟mRNA」および「完全にスプライシングされたmRNA」の用語は、標的タンパク質をコードする完全にプロセシングされたmRNA（例えば、核から細胞質へと輸送され、標的タンパク質に翻訳されたmRNA）、あるいは完全にプロセシングされた機能的RNAを説明するために、本明細書で交換可能に使用される。「増殖性mRNA」の用語も、標的タンパク質をコードする完全にプロセシングされたmRNAを説明するために使用することができる。実施形態では、標的領域は、タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体に最も豊富に存在するイントロンである、保持されたイントロン中にある。

10

20

【0214】

本明細書で使用されるように、用語「含む（comprise）」、あるいは「含む（comprises）」または「含んでいる（comprising）」等の変化形は、詳細に言及された特徴（例えば、アンチセンスオリゴマーの場合は、定義された核酸塩基配列）を含むが、他のいかなる特徴をも排除するものではないと解される。したがって、本明細書で使用されるように、用語「含んでいる」は包括的であり、詳細に言及されていない追加の特徴（例えば、アンチセンスオリゴマーの場合、詳細に言及されていない追加の核酸塩基の存在）を除外しない。

【0215】

本明細書で提供される組成物及び方法の何れかの実施形態において、「含んでいる」は、「～から実質的に成る（consisting essentially of）」または「～から成る（consisting of）」と置き換えられ得る。「～から実質的に成る」という句は、請求項に係る発明の形質や機能に実質的に影響しない特徴と同様、特定の特徴（例えば核酸塩基配列）を要するように本明細書において使用される。本明細書で使用されるように、「成る」という用語は、詳細に言及された特徴（例えば核酸塩基配列）のみの存在を示すために使用される（よって、特定の核酸塩基配列から成るアンチセンスオリゴマーの場合には、詳細に言及されていない追加の核酸塩基の存在は除外される）。

30

【0216】

実施形態では、標的領域は、本明細書に記載されるタンパク質をコードするRIC mRNA前駆体において2番目に豊富に存在するイントロンである、保持されたイントロン中にある。例えば、2番目に豊富な保持されたイントロンのヌクレオチド配列の独自性、特定のヌクレオチド配列を標的とするASO設計の容易さ、及び/又はASOを持つイントロンの標的化から結果として生じるタンパク質生成の増加の量により、最も豊富な保持されたイントロンではなく、2番目に豊富な保持されたイントロンが標的とされ得る。実施形態では、保持されたイントロンは、細胞中の標的タンパク質をコードする遺伝子から転写されたRIC mRNA前駆体の集団中において2番目に豊富なイントロンであり、RIC mRNA前駆体の集団は2つ以上の保持されたイントロンを含む。実施形態では、標的タンパク質をコードするRIC mRNA前駆体の集団において2番目に豊富なアンチセンスオリゴマーに標的とされるアンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴマー

40

50

が標的とされるまたは結合する保持されたイントロンを含む集団において、2つ以上の保持されたイントロンのスプライシングアウトを誘導する。実施形態では、それにより標的タンパク質をコードする完全にスプライシングされた（成熟）RNAが生成される。

【0217】

実施形態において、ASOは、RIC mRNA前駆体中の保持されていないイントロン内にある、標的とされた領域に相補的である。実施形態では、RIC mRNA前駆体の標的部分は、保持されていないイントロンの5'スプライス部位に対する+6から+100の領域；または保持されていないイントロンの3'スプライス部位に対する-16～-100の領域内にある。実施形態において、RIC mRNA前駆体の標的部分は、保持されていないイントロンの5'スプライス部位に対して+100から、保持されていないイントロンの3'スプライス部位に対して-100までの領域内にある。領域または配列の場所を特定するために使用されるように、「内（with in）」は、列挙される位置で残基を含むように理解される。例えば、+6～+100の領域は、+6および+100の位置で残基を含む。実施形態では、それにより標的タンパク質をコードする完全にスプライシングされた（成熟）RNAが生成される。

10

【0218】

実施形態では、RIC mRNA前駆体の保持されたイントロンは非効率的にスプライシングされたイントロンである。本明細書で使用されるように「非効率的にスプライシングされた」は、RIC mRNA前駆体における別のスプライス部位でのスプライシングの頻度と比較して、保持されたイントロンに隣接しているスプライス部位（5'スプライス部位または3'スプライス部位）での比較的少ない頻度のスプライシングを指し得る。用語「非効率的にスプライシングされた」はまた、スプライス部位でのスプライシングの相対速度または動力学を指し、ここでは、「非効率的にスプライシングされた」イントロンは、RIC mRNA前駆体における別のイントロンと比較して遅い速度でスプライシングまたは除去され得る。

20

【0219】

実施形態において、5'スプライス部位、および保持されたイントロンの+1～+6に隣接するエクソンの-3e～-1eでの9つのヌクレオチド配列は、対応する野生型の配列と同一である。実施形態において、保持されたイントロンの-15～-1、及び3'スプライス部位に隣接するエクソンの+1eでの16のヌクレオチド配列は、対応する野生型の配列と同一である。本明細書で使用されるように、「野生型の配列」は、生物学および科学情報のNCBIRポジトリに寄託される公開された参考ゲノムにおける遺伝子のヌクレオチド配列を指す（全米バイオテクノロジー情報センター、国立医療図書館、8600 Rockville Pike、Bethesda、MD USA 20894により操作される）。本明細書で使用されるように、「e」で表わされたヌクレオチド位置は、ヌクレオチドがエクソン（例えば5'スプライス部位に隣接するエクソンまたは3'スプライス部位に隣接するエクソン）の配列に存在することを示す。

30

【0220】

方法は、細胞を、本明細書に記載されるタンパク質をコードするmRNA前駆体の一部に相補的なASOと接触させる工程を含み、その結果、タンパク質の発現の増加がもたらされる。本明細書で使用されるように、細胞に「接触させること」または「投与することは、ASOと細胞が相互に作用するように細胞に最も近づいた状態でASOを提供する方法を指す。ASOと接触される細胞は、細胞を取り入れ、または細胞にASOを運ぶ。該方法は、疾病または疾患に関係する又は疾病または疾患に関連する細胞を、ASOと接触させる工程を含む。幾つかの実施形態では、ASOは、ASOを細胞型に対して標的とする、ASOと疾病または疾患に関係する又は疾病または疾患に関連する細胞との間の接触を増強する、またはASOの取り込みを増強するために、さらに修飾され得るか又は別の分子に結合され得る（例えば、共有結合される）。

40

【0221】

本明細書で使用されるように、用語「タンパク質生成を増加する」または「標的タンパク

50

質の発現を増加する」は、細胞中のmRNAから翻訳されるタンパク質の量を増強することを意味する。「標的タンパク質」は発現／生成の増加が望まれる任意のタンパク質でもよい。

【0222】

RIC mRNA前駆体を発現する細胞を、RIC mRNA前駆体の転写物の標的部分に相補的なASOと接触させた結果、mRNA前駆体によりコードされるタンパク質（例えば標的タンパク質）の量の測定可能な増加がもたらされる。タンパク質の生成を測定または検出する方法は、当業者に明白であり、例えば、ウェスタンプロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡検査、及びELISAといった既知の方法を含む。

【0223】

実施形態では、細胞を、RIC mRNA前駆体の転写産物の標的部分に相補的なASOと接触させた結果、ASOの欠如／処置の欠如における細胞により生成されたタンパク質の量と比較して、少なくとも10、20、30、40、50、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、500、または1000%生成されたタンパク質の量の増加がもたらされる。実施形態では、アンチセンスオリゴマーが接触される細胞により生成されたタンパク質の総量は、対照の化合物により生成される標的タンパク質の量と比較して、約1.1から約10倍、約1.5から約10倍、約2から約10倍、約3から約10倍、約4から約10倍、約1.1から約5倍、約1.1から約6倍、約1.1から約7倍、約1.1から約8倍、約1.1から約9倍、約2から約5倍、約2から約6倍、約2から約7倍、約2から約8倍、約2から約9倍、約3から約6倍、約3から約7倍、約3から約8倍、約3から約9倍、約4から約7倍、4から約8倍、約4から約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、あるいは少なくとも約10倍、増加する。対照の化合物は、例えば、RIC mRNA前駆体の標的部分に相補的でないオリゴヌクレオチドでもよい。

【0224】

幾つかの実施形態では、細胞を、RIC mRNA前駆体の転写物の標的部分に相補的なASOと接触させた結果、標的タンパク質をコードする成熟mRNAを含む、タンパク質をコードするmRNAの量の増加がもたらされる。幾つかの実施形態では、タンパク質をコードするmRNAの量、またはタンパク質をコードする成熟mRNAの量は、ASOの欠如／処置の欠如における細胞により生成されたタンパク質の量と比較して、少なくとも10、20、30、40、50、60、80、100、150、200、250、300、350、400、450、500、または1000%増加される。実施形態では、タンパク質をコードするmRNAの総量、またはアンチセンスオリゴマーが接触された細胞において生成されたタンパク質をコードする成熟mRNAの総量は、未処置の細胞、例えば未処置の細胞対照の化合物で処置した細胞において生成される成熟RNAの量と比較して、約1.1から約10倍、約1.5から約10倍、約2から約10倍、約3から約10倍、約4から約10倍、約1.1から約5倍、約1.1から約6倍、約1.1から約7倍、約1.1から約8倍、約1.1から約9倍、約2から約5倍、約2から約6倍、約2から約7倍、約2から約8倍、約2から約9倍、約3から約6倍、約3から約7倍、約3から約8倍、約3から約9倍、約4から約7倍、4から約8倍、約4から約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍、増加する。対照の化合物は、例えば、RIC mRNA前駆体の標的部分に相補的でないオリゴヌクレオチドでもよい。

【0225】

RIC mRNA前駆体からの保持されたイントロンの構成的なスプライシング
本明細書で提供される方法とアンチセンスオリゴヌクレオチドの組成物は、タンパク質をコードするmRNA、或いはタンパク質をコードする成熟mRNAのレベルの増加により、細胞、例えば、本明細書に記載されるタンパク質の量または活性の不足により引き起こ

10

20

30

40

50

される疾病を患う被験体において、タンパク質の発現を増加させるのに有用である。特に、本明細書に記載されるような方法と組成物は、タンパク質をコードする R I C m R N A 前駆体の転写物からの保持されたイントロンの構成的なスプライシングを誘発し、それにより、タンパク質をコードする m R N A のレベル、或いはタンパク質をコードする成熟 m R N A のレベルを増加させ、且つタンパク質の発現を増加させる。

【 0 2 2 6 】

R I C m R N A 前駆体からの保持されたイントロンの構成的なスプライシングは、R I C m R N A 前駆体から保持されたイントロンを正確に取り除き、ここで、保持されたイントロンには野生型スプライス配列がある。本明細書で使用されるように、構成的なスプライシングは、遺伝子または対立遺伝子から転写された m R N A 前駆体の選択的スプライシング或いは異常なスプライシングを引き起こす突然変異を伴う、遺伝子または対立遺伝子から転写された R I C m R N A 前駆体からの、保持されたイントロンのスプライシングを包含しない。例えば、保持されたイントロンの構成的なスプライシングは、本明細書で提供される方法とアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して誘発されるように、m R N A 前駆体の異常なスプライシングを調整せず、又はその選択的スプライシングに影響せず、その結果、標的タンパク質または機能的 R N A の発現の増加がもたらされる。

10

【 0 2 2 7 】

実施形態では、構成的なスプライシングは、R I C m R N A 前駆体から保持されたイントロンを正確に取り除き、ここで、R I C m R N A 前駆体は、完全に機能的な標的タンパク質または機能的 R N A をコードする、野生型遺伝子または対立遺伝子、或いは多型遺伝子または対立遺伝子から転写され、及び、遺伝子または対立遺伝子には、保持されたイントロンの選択的スプライシングまたは異常なスプライシングを引き起こす突然変異がない。

20

【 0 2 2 8 】

幾つかの実施形態では、タンパク質をコードする R I C m R N A 前駆体からの保持されたイントロンの構成的なスプライシングは、タンパク質をコードする R I C m R N A 前駆体から保持されたイントロンを正確に取り除き、ここで、R I C m R N A 前駆体は、標的遺伝子または機能的 R N A が野生型対立遺伝子からの生成と比較して低下したレベルで生成される遺伝子または対立遺伝子から転写され、および、遺伝子または対立遺伝子には、保持されたイントロンの選択的スプライシングまたは異常なスプライシングを引き起こす突然変異がない。これら実施形態では、構成的にスプライシングされた保持されたイントロンの正確な除去の結果、同等の野生型タンパク質または機能的 R N A と比較した時に機能的である標的タンパク質または機能的 R N A の生成がもたらされる。

30

【 0 2 2 9 】

他の実施形態では、構成的なスプライシングは、R I C m R N A 前駆体から保持されたイントロンを正確に取り除き、ここで、R I C m R N A 前駆体は、同等な野生型タンパク質または機能的 R N A と比較して機能が低下した形態で生成される、標的タンパク質または機能的 R N A をコードする遺伝子または対立遺伝子から転写され、及び、遺伝子または対立遺伝子には、保持されたイントロンの選択的スプライシングまたは異常なスプライシングを引き起こす突然変異がない。これら実施形態では、構成的にスプライシングされた保持されたイントロンの正確な除去の結果、部分的に機能的な標的タンパク質、または、同等の野生型タンパク質または機能的 R N A と比較した時に部分的に機能的である機能的 R N A の生成がもたらされる。

40

【 0 2 3 0 】

構成的なスプライシングによる保持されたイントロンの「正確な除去」は、エクソンの任意の部分の除去を行わない、イントロン全体の除去を指す。

【 0 2 3 1 】

実施形態において、本明細書に記載されるような、または本明細書に記載される任意の方法で使用されるアンチセンスオリゴマーは、遺伝子から転写された m R N A 前駆体の選択的スプライシングまたは異常なスプライシングの調節により、タンパク質をコードする m

50

R N A の量、またはタンパク質の量を増加しない。選択的スプライシングまたは異常なスプライシングの調節は、例えば R T - P C R により R N A 種の配列と長さを分析する既知の方法により、および本明細書と文献の中で別記された方法を使用して、測定され得る。実施形態では、選択的または異常なスプライシングの調節は、少なくとも 10 % または 1 . 1 倍の対象のスプライシングされた種の量の増加或いは減少に基づいて決定される。実施形態では、調節は、本発明の方法でタンパク質をコードする m R N A の増加の決定に関して本明細書に記載されるように、少なくとも 10 % から 100 % または 1 . 1 から 10 倍であるレベルでの増加または減少に基づいて決定される。

【 0 2 3 2 】

実施形態では、方法は、 R I C m R N A 前駆体が、野生型 m R N A 前駆体の部分的スプライシングによって生成された方法である。実施形態では、方法は、 R I C m R N A 前駆体が、全長の野生型 m R N A 前駆体の部分的スプライシングによって生成された方法である。実施形態では、 R I C m R N A 前駆体は、全長の m R N A 前駆体の部分的スプライシングによって生成された。これらの実施形態では、全長の m R N A 前駆体は、野生型スプライス部位配列を有する保持されたイントロンのスプライシングと比較して、保持されたイントロンの正しいスプライシングを損なわない保持されたイントロンのスプライス部位に多型性を有し得る。

10

【 0 2 3 3 】

実施形態では、タンパク質をコードする m R N A は、全長の成熟 m R N A または野生型成熟 m R N A である。これらの実施形態では、全長の成熟 m R N A は、野生型成熟 m R N A によってコードされたタンパク質の活性と比較して、成熟 m R N A によってコードされた標的タンパク質または機能的 R N A の活性に影響しない多型を有し得る。

20

【 0 2 3 4 】

アンチセンスオリゴマー

本開示の一態様は、 R I C m R N A 前駆体の標的部位に結合することによってスプライシングを増強するアンチセンスオリゴマーを含む組成物である。本明細書で使用されるように、用語「 A S O 」および「アンチセンスオリゴマー」は、交換可能に使用され、ワトソン・クリック塩基対またはゆらぎ塩基対 (G - U) によって標的核酸 (例えば、 R I C m R N A 前駆体) 配列にハイブリダイズする、核酸塩基を含む、ポリヌクレオチドなどのオリゴマーを指す。 A S O は、標的配列に相補的な又はほぼ相補的 (例えば、標的配列に結合し、スプライス部位でスプライシングを増強させるのに十分な相補性) である正確な配列を有し得る。 A S O は、標的核酸 (例えば、 m R N A 前駆体の転写産物の標的部位) に結合し (ハイブリダイズし) 、生理学的条件下でハイブリダイズされたままであるように設計されている。典型的に、 A S O は、意図した (標的とされた) 核酸配列以外の部位にハイブリダイズする場合、標的核酸でない限られた数の配列に (標的核酸以外の少数の部位に) ハイブリダイズする。 A S O の設計は、 m R N A 前駆体の転写産物の標的部分の核酸配列、或いはゲノムまたは細胞の m R N A 前駆体またはトランスクリプトームにおける他の場所での十分に類似した核酸配列の発生を考慮に入れることができ、その結果、 A S O が他の部位に結合し「オフターゲット」効果を引き起こす可能性は限定される。例えば、発明の名称「 Reducing Nonsense - Mediated m R N A Decay 」の W O 2 0 1 5 / 0 3 5 0 9 1 として公開された P C T 國際出願番号 P C T / U S 2 0 1 4 / 0 5 4 1 5 1 におけるものなどの、当業者に既知のアンチセンスオリゴマーは、本明細書に記載される方法を実施するために使用され得る。

30

【 0 2 3 5 】

幾つかの実施形態では、 A S O は、標的核酸または R I C m R N A 前駆体の標的部位に「特異的にハイブリダイズする」または「特異的」である。典型的に、そのようなハイブリダイゼーションは、 37 より実質的に高い融解温度 (T m) で、好ましくは少なくとも 50 ° で、および典型的に 60 ° からおよそ 90 ° の間で生じる。そのようなハイブリダイゼーションは、好ましくは、厳しいハイブリダイゼーション条件に対応している。与えられたイオン強度および pH で、 T m は、標的配列の 50 % が相補的オリゴヌクレオチ

40

50

ドにハイブリダイズする温度である。

【0236】

オリゴヌクレオチドなどのオリゴマーは、ハイブリダイゼーションが2つの一本鎖ポリヌクレオチド間の逆平行構成で生じるときに、互いに「相補的」である。二本鎖ポリヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションが第1のポリヌクレオチドの鎖の1つと第2のポリヌクレオチドの鎖の1つの間に生じる場合に、別のポリヌクレオチドに「相補的」であり得る。相補性（1つのポリヌクレオチドが別のポリヌクレオチドと相補的である程度）は、一般に容認された塩基対合則に従って、互いに水素結合を形成すると予期される対向する鎖における塩基の割合（例えばパーセンテージ）の点から数量化できる。アンチセンスオリゴマー（ASO）の配列は、ハイブリダイズするその標的核酸の配列に100%相補的である必要はない。特定の実施形態では、ASOは、標的とされる標的核酸配列内の標的部位に対する、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列相補性を含むことができる。例えば、オリゴマー化合物の20の核酸塩基のうちの18が標的部位に相補的であり、それ故、特異的にハイブリダイズするASOは、90パーセントの相補性を表わす。この例において、残りの相補的でない核酸塩基は、ともにクラスター化され得るか、または相補的な核酸塩基と分散され（interspersed）、互いに又は相補的な核酸塩基に隣接している必要はない。ASOの標的核酸の領域とのパーセント相補性は、BLASTプログラム（基礎的なローカルアライメント検索ツール）および当該技術分野で既知のPower BLASTプログラム（Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656）を慣例的に使用して判定され得る。

10

20

30

【0237】

ASOは、標的配列におけるすべての核酸塩基にハイブリダイズする必要はなく、それがハイブリダイズする核酸塩基は、隣接しているか又は隣接していないかもしれない。ASOは、mRNA前駆体の転写産物の1つ以上のセグメントにわたってハイブリダイズし得、その結果、介在する又は隣接するセグメントは、ハイブリダイゼーション事象に関係しない（例えば、ループ構造またはヘアピン構造が形成され得る）。特定の実施形態では、ASOは、標的mRNA前駆体の転写産物において隣接していない核酸塩基にハイブリダイズする。例えば、ASOは、ASOがハイブリダイズしない1つ以上の核酸塩基によって分離される、mRNA前駆体の転写産物における核酸塩基にハイブリダイズすることができる。

【0238】

本明細書に記載されるASOは、RIC mRNA前駆体の標的部分に存在する核酸塩基に相補的である核酸塩基を含む。用語「ASO」は、オリゴヌクレオチド、および標的mRNA上の相補的な核酸塩基にハイブリダイズすることができる核酸塩基を含むが、ペプチド核酸（PNA）などの糖部を含まない、他のオリゴマー分子を具体化する。ASOは、自然発生のヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、修飾されたヌクレオチド、またはそれらの2つ又は3つの任意の組み合わせを含み得る。用語「自然発生のヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む。用語「修飾されたヌクレオチド」は、修飾された又は置換された糖類及び/又は修飾された骨格を有するヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、ASOのヌクレオチドのすべてが、修飾されたヌクレオチドである。本明細書に記載される方法および組成物と適合性のあるASOの化学修飾およびASOの成分は、当業者に明白であり、例えば、米国特許第8,258,109号B2、米国特許第5,656,612号、米国特許公開番号2012/0190728、およびDias and Stein, Mol. Cancer Ther. 2002, 347-355で見ることができ、それら全体が引用によって本明細書に組み込まれる。

40

【0239】

ASOの核酸塩基は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルなどの自然

50

発生の未修飾の核酸塩基、または標的mRNA前駆体上に存在する核酸塩基との水素結合が可能であるように未修飾の核酸塩基に十分に類似している合成または修飾された核酸塩基であり得る。修飾された核酸塩基の例としては、限定されないが、ヒポキサンチン、キサンチン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、および5-ヒドロキシメチルシトシンが挙げられる。

【0240】

本明細書に記載されるASOはまた、オリゴマーの成分に結合する骨格構造を含む。用語「骨格構造」および「オリゴマー結合」は、交換可能に使用され、ASOの単量体間の結合を指し得る。自然発生のオリゴヌクレオチドでは、骨格は、オリゴマーの糖部を結合する3'-5'ホスホジエステル結合を含む。本明細書に記載されるASOの骨格構造またはオリゴマー結合は、(限定されないが)ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニラデート(phosphoranoladate)、ホスホラミデート(phosphoramidate)などを含む。例えば、LaPlanche et al., Nucleic Acids Res. 14: 9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1984), Stein et al., Nucleic Acids Res. 16: 3209 (1988), Zon et al., Anti Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al., 米国特許第5,151,510号; Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews 90: 543 (1990)を参照。幾つかの実施形態では、ASOの骨格構造は、亜リン酸を含有していないが、例えば、ペプチド核酸(PNA)、またはカルバミン酸塩、アミド、および直鎖および環式の炭化水素基を含む連結基において、ペプチド結合を含有している。幾つかの実施形態では、骨格修飾は、ホスホロチオエート結合である。幾つかの実施形態では、骨格修飾は、ホスホラミデート結合である。

【0241】

実施形態では、ASO骨格のリンヌクレオチド間の結合の各々での立体化学は、ランダムである。実施形態では、ASO骨格のリンヌクレオチド間の結合の各々での立体化学は、制御され、ランダムではない。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開番号2014/0194610, 「Methods for the Synthesis of Functionalized Nucleic Acids」は、核酸オリゴマーにおいて各リン原子でキラリティーの掌性(handedness)を独立して選択する方法について記載している。実施形態では、本発明の方法において使用されるASOは、ランダムではないリンヌクレオチド間の結合を有するASOを含む。実施形態では、本発明の方法に使用される組成物は、純粋なジアステレオマーASOを含む。実施形態では、本発明の方法に使用される組成物は、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、約100%、約90%から約100%、約91%から約100%、約92%から約100%、約93%から約100%、約94%から約100%、約95%から約100%、約96%から約100%、約97%から約100%、約98%から約100%、または約99%から約100%のジアステレオマー純度を有するASOを含む。

【0242】

実施形態では、ASOは、そのリンヌクレオチド間の連鎖でRpおよびSpの構成のランダムでない混合物を有している。例えば、良好な活性とヌクレアーゼの安定性のバランスを達成するために、RpとSpの混合がアンチセンスオリゴヌクレオチドに求められることが示唆されてきた(Wan, et al., 2014, 「Synthesis, bio

10

20

30

40

50

physical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages』Nucleic Acids Research 42(22) : 13456 - 13468、参照により本明細書に組み込まれる)。実施形態では、本発明の方法において使用されるASOは、約5～100%のRp、少なくとも約5%のRp、少なくとも約10%のRp、少なくとも約15%のRp、少なくとも約20%のRp、少なくとも約25%のRp、少なくとも約30%のRp、少なくとも約35%のRp、少なくとも約40%のRp、少なくとも約45%のRp、少なくとも約55%のRp、少なくとも約60%のRp、少なくとも約65%のRp、少なくとも約70%のRp、少なくとも約75%のRp、少なくとも約80%のRp、少なくとも約85%のRp、少なくとも約90%のRp、または少なくとも約95%のRpと、残りのSp、あるいは約100%のRpを含む。実施形態では、本発明の方法において使用されるASOは、約10%から約100%のRp、約15%から約100%のRp、約20%から約100%のRp、約25%から約100%のRp、約30%から約100%の、約35%から約100%のRp、約40%から約100%のRp、約45%から約100%のRp、約50%から約100%のRp、約55%から約100%のRp、約60%から約100%のRp、約65%から約100%のRp、約70%から約100%のRp、約75%から約100%のRp、約80%から約100%のRp、約85%から約100%のRp、約90%から約100%のRp、あるいは約95%から約100%のRp、約20%から約80%のRp、約25%から約75%のRp、約30%から約70%のRp、約40%から約60%のRp、あるいは約45%から約55%のRpと、残りのSpを含む。

【0243】

実施形態では、本発明の方法において使用されるASOは、約5～100%のSp、少なくとも約5%のSp、少なくとも約10%のSp、少なくとも約15%のSp、少なくとも約20%のSp、少なくとも約25%のSp、少なくとも約30%のSp、少なくとも約35%のSp、少なくとも約40%のSp、少なくとも約45%のSp、少なくとも約50%のSp、少なくとも約55%のSp、少なくとも約60%のSp、少なくとも約65%のSp、少なくとも約70%のSp、少なくとも約75%のSp、少なくとも約80%のSp、少なくとも約85%のSp、少なくとも約90%のSp、あるいは少なくとも約95%のSpと、残りのRp、あるいは約100%のSpを含む。実施形態では、本発明の方法において使用されるASOは、約10%から約100%のSp、約15%から約100%のSp、約20%から約100%のSp、約25%から約100%のSp、約30%から約100%のSp、約35%から約100%のSp、約40%から約100%のSp、約45%から約100%のSp、約50%から約100%のSp、約55%から約100%のSp、約60%から約100%のSp、約65%から約100%のSp、約70%から約100%のSp、約75%から約100%のSp、約80%から約100%のSp、約85%から約100%のSp、約90%から約100%のSp、あるいは約95%から約100%のSp、約20%から約80%のSp、約25%から約75%のSp、約30%から約70%のSp、約40%から約60%のSp、あるいは約45%から約55%のSpと、残りのRpを含む。

【0244】

本明細書に記載されるASOのいずれかは、自然発生のヌクレオチド中に存在するような、リボースまたはデオキシリボースを含む糖部、あるいはモルホリン環を含む、修飾された糖部または糖アナログを含有し得る。修飾された糖部の限定しない例は、2'-O-メチル(2'-O-Me)、2'-O-メトキシエチル(2'MOE)、2'-O-アミノエチル、2'F; N3'-P5'ホスホラミデート、2'ジメチルアミノオキシエトキシ、2'ジメチルアミノエトキシエトキシ、2'-グアニジニウム(guanidinium)、2'-O-グアニジニウムエチル、カルバミン酸塩修飾した糖、および二環式修飾した糖などの、2'置換基を含む。幾つかの実施形態では、糖部修飾は、2'-O-Me、2'F、および

10

20

30

40

50

2' MOE から選択される。幾つかの実施形態では、糖部修飾は、ロックド核酸 (LNA) におけるような追加の架橋結合である。幾つかの実施形態では、糖アナログは、ホスホロジアミデートモルホリノ (PMO) などのモルホリン環を含有している。幾つかの実施形態では、糖部は、リボフラノシリルまたは 2' デオキシリボフラノシリルの修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、2' 4' 抑制された (constrained) 2' O-メチルオキシエチル (cMOE) 修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、cEt 2', 4 抑制された 2' - O エチル RNA 修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、トリシクロ DNA (tcDNA) 修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、エチレン核酸 (ENA) 修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、MCE 修飾を含む。修飾は当該技術分野で既知であり、文献、例えば、Jarver, et al., 2014, 「A Chemical View of Oligonucleotides for Exon Skipping and Related Drug Applications」Nucleic Acid Therapeutics 24 (1) : 37 - 47 に記載され、これは、この目的のための引用によって本明細書に組み込まれる。
10

【0245】

幾つかの例では、ASO の各単量体は、同じ方法で修飾され、例えば、ASO の骨格の各結合はホスホロジオエート結合を含み、または各リボース糖部は 2' O-メチル修飾を含む。ASO の単量体成分の各々の上に存在する、そのような修飾は、「均一な修飾」と呼ばれる。幾つかの例では、異なる修飾の組み合わせが望まれ得、例えば、ASO は、ホスホロジアミデート結合とモルホリン環を含む糖部 (モルホリノ) との組み合わせを含み得る。ASO への異なる修飾の組み合わせは、「混合修飾」または「混合化学作用」と呼ばれる。
20

【0246】

幾つかの実施形態では、ASO は、1 つ以上の骨格修飾を含む。幾つかの実施形態では、ASO は、1 つ以上の糖部修飾を含む。幾つかの実施形態では、ASO は、1 つ以上の骨格修飾および 1 つ以上の糖部修飾を含む。幾つかの実施形態では、ASO は、2' MOE 修飾およびホスホロジオエート骨格を含む。幾つかの実施形態では、ASO は、ホスホロジアミデートモルホリノ (PMO) を含む。幾つかの実施形態では、ASO は、ペプチド核酸 (PNA) を含む。本明細書に記載される ASO のいずれか又は ASO の成分 (例えば、核酸塩基、糖部、骨格) は、ASO の望ましい特性または活性を達成するために或いは ASO の望ましくない特性または活性を減少させるために修飾されてもよい。例えば、ASO または ASO の 1 つ以上の成分は、mRNA 前駆体の転写産物上の標的配列への結合親和性を増強する; 非標的配列への結合を減少させる; 細胞のヌクレアーゼ (つまり、RNase H) による分解を減少させる; 細胞及び/又は細胞の核への ASO の取り込みを改善する; ASO の薬物動態 (pharmacokinetics) または薬力 (pharmacodynamics) を変更する; および ASO の半減期を調節するために修飾され得る。
30

【0247】

いくつかの実施形態では、ASO は、2' - O - (2-メトキシエチル) (MOE) ホスホロジオエート修飾されたヌクレオチドで構成される。そのようなヌクレオチドで構成された ASO は、特に、本明細書で開示される方法によく適しており、そのような修飾を有しているオリゴマーは、ヌクレアーゼ分解に対する著しく増強された耐性および増加したバイオアベイラビリティを有すると示されており、これによって、例えば、本明細書に記載される幾つかの実施形態における経口送達に適するようになる。例えば、Geary et al., J Pharmacol Exp Ther. 2001; 296 (3) : 890 - 7; Geary et al., J Pharmacol Exp Ther. 2001; 296 (3) : 898 - 904 を参照。
40

【0248】

ASO を合成する方法は当業者に既知である。代替的に又は加えて、ASO は商用源から得てもよい。

【0249】

他に明記されない限り、一本鎖核酸（例えば、mRNA前駆体の転写産物、オリゴヌクレオチド、ASOなど）配列の左端は、5'末端であり、一本鎖または二本鎖の核酸配列の左方向は、5'方向と呼ばれる。同様に、核酸配列（一本鎖または二本鎖）の右端または右方向は、3'末端または3'方向である。一般に、核酸中の基準点に対する5'にある領域または配列は、「上流」として言及され、核酸中の基準点に対する3'にある領域または配列は、「下流」として言及される。一般に、mRNAの5'方向または5'末端は、開始コドン（*initiation or start codon*）が位置する場所であり、一方で、3'末端または3'方向は、終止コドンが位置する場所である。幾つかの態様では、核酸中の基準点の上流にあるヌクレオチドは、負の数によって指定され、基準点の下流にあるヌクレオチドは、正の数によって指定され得る。例えば、基準点（例えば、mRNA中のエクソン-エクソン連結）は「ゼロ」部位として指定され得、基準点に直接隣接し且つその上流にあるヌクレオチドは、「マイナス1」、例えば「-1」と指定され、一方で、基準点に直接隣接し且つその下流にあるヌクレオチドは、「プラス1」、例えば「+1」と指定される。

10

【0250】

他の実施形態では、ASOは、CTNS、PAX2、CYP24A1、またはPPARD RIC mRNA前駆体において保持されたイントロンの5'スプライス部位の下流（3'の方向）である、CTNS、PAX2、CYP24A1、またはPPARD mRNA前駆体の標的部分（例えば、5'スプライス部位に対して正の数で示された方向）に対して相補的である（及び、標的部分に結合する）（図1）。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して、1から+4000、1から+3500、1から+3000、1から+2500、1から+2000、1から+1500、1から+1000、1から+500、+2から+4000、+2から+3500、+2から+3000、+2から+2500、+2から+2000、+2から+1500、+2から+1000、+2から+500、+2から+400、+2から+300、+2から+200、+6から+4000、+6から+3500、+6から+3000、+6から+2500、+6から+2000、+6から+1500、+6から+1000、+6から+500、+6から+400、+6から+300、+6から+200、または+6から+100の領域内である、CTNS、PAX2、CYP24A1、またはPPARD RIC RNA前駆体の標的部分に対して相補的である。いくつかの実施形態では、ASOは、5'スプライス部位に対して、+1から+5までのヌクレオチド（5'スプライス部位の下流に位置付けられた最初の5つのヌクレオチド）に対して相補的ではない。

20

いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して、+6から+50のヌクレオチドの領域内にあるCTNS、PAX2、CYP24A1、またはPPARD RIC mRNA前駆体の標的部分に対して相補的であることもある。いくつかの態様では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して、+6から+90、+6から+80、+6から+70、+6から+60、+6から+50、+6から+40、+6から+30、または+6から+20の領域内にあるCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARD RIC mRNA前駆体の標的部分に対して相補的である。

30

【0251】

幾つかの実施形態では、ASOは、RIC mRNA前駆体において保持されたイントロンの3'スプライス部位の上流（5'の方向）にあるCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARD RIC mRNA前駆体の標的領域（例えば、負の数で指定された方向）に対して相補的である（図1）。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して-16から-4000、-16から-3000、-16から-2000、-16から-1000、-16から-500、-16から-400、-16から-300、-6から-200、または-16から-100の領域内にある、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARD RIC mRNA前駆体の標的部分に

40

50

相補的である。幾つかの実施形態では、ASOは、3'スプライス部位に対して、-1から-15までのヌクレオチド(3'スプライス部位の上流に位置付けられた最初の15のヌクレオチド)には相補的ではない。いくつかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して、-16から-50の領域内にあるCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARD RIC mRNA前駆体の標的部位に対して相補的である。幾つかの態様では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して、-16から-90、-16から-80、-16から-70、-16から-60、-16から-50、-16から-40、または-16から-30の領域内にある、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARD RIC mRNA前駆体の標的部位に相補的である。

10

【0252】

実施形態では、RIC mRNA前駆体の標的部位は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+100から、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-100までの領域内に存在する。

【0253】

幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位(上流)に隣接するエクソンにある、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARD RIC mRNA前駆体の標的部位に相補的である(図1)。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接するエクソンにおける+2eから-4eの領域内にあるRIC mRNA前駆体の標的部位に相補的である。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対するヌクレオチド-1eから-3eに相補的ではない。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対して、-4eから-100e、-4eから-90e、-4eから-80e、-4eから-70e、-4eから-60e、-4eから-50e、-4eから-40e、-4eから-30e、または-4eから-20eの領域内にある、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARD RIC mRNA前駆体の標的部位に相補的である。

20

【0254】

幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位(下流)に隣接するエクソン内にあるCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARD RIC mRNA前駆体の標的部位に相補的である(図1)。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接するエクソン内にある、+2eから-4eの領域内にあるCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARD RIC mRNA前駆体の標的部位に相補的である。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対するヌクレオチド+1eに相補的ではない。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対して、+2eから+100e、+2eから+90e、+2eから+80e、+2eから+70e、+2eから+60e、+2eから+50e、+2eから+40e、+2eから+30e、または+2eから+20eの領域内にある、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARD RIC mRNA前駆体の標的部位に相補的である。ASOは、スプライシングの特異的結合および効果的な増強作用に適する任意の長さでもよい。幾つかの実施形態では、ASOは8から50の核酸塩基から成る。例えば、ASOは、長さが8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、45または50の核酸塩基であってもよい。幾つかの実施形態では、ASOは50よりも多い核酸塩基から成る。いくつかの実施形態では、ASOは、8から50の核酸塩基、8から40の核酸塩基、8から35の核酸塩基、8から30の核酸塩基、8から25の核酸塩基、8から20の核酸塩基、8から15の核酸塩基、9から50の核酸塩基、9から40の核酸塩基、9から35の核酸塩基、9から30の核酸塩基、9から25の核酸塩基、9から20の核酸塩基、9から15の核酸塩基、10から50の核酸塩基、10から40の核酸塩基、10から

30

40

50

ら 3 5 の核酸塩基、1 0 から 3 0 の核酸塩基、1 0 から 2 5 の核酸塩基、1 0 から 2 0 の核酸塩基、1 0 から 1 5 の核酸塩基、1 1 から 5 0 の核酸塩基、1 1 から 4 0 の核酸塩基、1 1 から 3 5 の核酸塩基、1 1 から 3 0 の核酸塩基、1 1 から 2 5 の核酸塩基、1 1 から 2 0 の核酸塩基、1 1 から 1 5 の核酸塩基、1 2 から 5 0 の核酸塩基、1 2 から 4 0 の核酸塩基、1 2 から 3 5 の核酸塩基、1 2 から 3 0 の核酸塩基、1 2 から 2 5 の核酸塩基、1 2 から 2 0 の核酸塩基、1 2 から 1 5 の核酸塩基、1 3 から 5 0 の核酸塩基、1 3 から 4 0 の核酸塩基、1 3 から 3 5 の核酸塩基、1 3 から 3 0 の核酸塩基、1 3 から 2 5 の核酸塩基、1 3 から 2 0 の核酸塩基、1 4 から 5 0 の核酸塩基、1 4 から 4 0 の核酸塩基、1 4 から 3 5 の核酸塩基、1 4 から 3 0 の核酸塩基、1 4 から 2 5 の核酸塩基、1 4 から 2 0 の核酸塩基、1 5 から 5 0 の核酸塩基、1 5 から 4 0 の核酸塩基、1 5 から 3 5 の核酸塩基、1 5 から 3 0 の核酸塩基、1 5 から 2 5 の核酸塩基、1 5 から 2 0 の核酸塩基、2 0 から 5 0 の核酸塩基、2 0 から 4 0 の核酸塩基、2 0 から 3 5 の核酸塩基、2 0 から 3 0 の核酸塩基、2 0 から 2 5 の核酸塩基、2 5 から 5 0 の核酸塩基、2 5 から 4 0 の核酸塩基、2 5 から 3 5 の核酸塩基、または 2 5 から 3 0 の核酸塩基の長さである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 3 0 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 2 9 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 2 8 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 2 7 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 2 6 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 2 5 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 2 4 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 2 3 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 2 2 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 2 1 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 2 0 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 1 9 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 1 8 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 1 7 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 1 6 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 1 5 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 1 4 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 1 3 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 1 2 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 1 1 のヌクレオチドである。幾つかの実施形態では、A S O は長さが 1 0 のヌクレオチドである。

【 0 2 5 5 】

幾つかの実施形態では、異なる化学的性質を有するが、R I C m R N A 前駆体の同じ標的部分に相補的である 2 つ以上の A S O が使用される。幾つかの実施形態では、R I C m R N A 前駆体の異なる標的部分に相補的である 2 つ以上の A S O が使用される。

【 0 2 5 6 】

実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、1 つ以上の部分または抱合体、例えば、オリゴヌクレオチドの活性または細胞取り込みを増強する標的部分または他の抱合体に化学的に連結される。そのような部分には、限定されないが、例えば、コレステロール部分、コレステリル部分、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基などの脂肪族鎖、ポリアミンまたはポリエチレングリコール鎖、または、アダマンタン酢酸として、脂質部分が含まれる。親油性部分を含むオリゴヌクレオチドおよび調製方法は、公開された文献に記載されている。実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定されないが、脱塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、例えば N - アセチルガラクトサミン (G l u N A c) 、N - A c グルコサミン (G a l N A c) 、もしくはマンノース (例えばマンノース - 6 - リン酸) 、脂質、またはポリ炭化水素化合物を含む部分で抱合される。抱合体は、当該技術分野で理解され文献に記載されるように、例えばリンカーを用いて、糖、塩基またはリン酸基上のいくつかの位置のうちのいずれかでアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む任意のヌクレオチドの 1 つ以上に連結されうる。リンカーは二価または三価の分枝リンカーを含みうる。実施

10

20

30

40

50

形態では、抱合体はアンチセンスオリゴヌクレオチドの3'末端に結合している。オリゴヌクレオチド抱合体を調製する方法は、例えば、米国特許第8,450,467号「Carbohydrate conjugates as delivery agents for oligonucleotides」に記載され、参照により本明細書に組み込まれる。

【0257】

幾つかの実施形態では、ASOによって標的とされる核酸は、真核細胞などの細胞内に発現したRIC mRNA前駆体である。幾つかの実施形態では、用語「細胞」は、細胞の集団を指すこともある。幾つかの実施形態では、細胞は被験体内に存在する。幾つかの実施形態では、細胞は被験体から単離されている。幾つかの実施形態では、細胞はエクスピボである。幾つかの実施形態では、細胞は疾患または疾病に関連した細胞もしくは細胞株である。幾つかの実施形態では、細胞はインビトロである（例えば細胞培養液中にある）。

10

【0258】

医薬組成物

記載された組成物のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含み、上記方法のいずれかにおいて使用するための医薬組成物または医薬製剤は、医薬品産業において周知の従来技術に従って調製することができ、且つ公開文献においても記載されている。実施形態において、被験体を処置するための医薬組成物または医薬製剤は、上記のような任意のアンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物、水和物、またはエステルの有効量、および薬学的に許容可能な希釈剤を含む。医薬製剤のアンチセンスオリゴマーはさらに、薬学的に許容可能な賦形剤、希釈剤または担体を含み得る。

20

【0259】

薬学的に許容可能な塩は、過度の毒性反応、刺激反応、アレルギー反応等を持たないヒトおよび下等動物の組織に接する使用に適しており、かつ適切なベネフィット・リスク比に相応している（例えば、この目的のための参照によって本明細書に組み込まれる、S. M. Berge, et al., J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977)を参照）。塩は、化合物の最終的な分離および精製中にインサイチュで、または遊離基機能を適切な有機酸と反応させることによって別々に調製される。薬学的に許容可能で無毒な酸付加塩の例は、塩化水素、臭化水素酸、リン酸、硫酸、および過塩素酸などの無機酸か、酢酸、シュウ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸もしくはマロン酸などの有機酸か、またはイオン交換などの他の文書で立証された方法を用いることによって形成されたアミノ基の塩である。他の薬学的に許容可能な塩は、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルピン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシ-エタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸、チオシアニ酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩などを含む。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属の塩は、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどを含む。さらに薬学的に許容可能な塩は、適切な場合、ハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、低級アルキルのスルホン酸塩、およびアリールスルホン酸塩などの対イオンを使用して形成された、無毒なアンモニウム、第四級アンモニウム、およびアミンのカチオンを含む。

30

【0260】

実施形態において、組成物は、限定されないが、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シ

40

50

ロップ、ソフトゲル、坐剤、および浣腸剤などの多くの考え得る剤形のいずれかに製剤される。実施形態において、組成物は、水性培地、非水性培地、または混合培地状の懸濁液として製剤される。水性懸濁液は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム(ソルビトールおよび/またはデキストラン)を含む懸濁液の粘度を増加させる物質をさらに含むこともある。その懸濁液は、安定化剤も含むこともある。実施形態において、本発明の医薬製剤または医薬組成物は、限定されないが、溶液、エマルジョン、マイクロエマルジョン、発泡体またはリポソーム含有製剤(例えばカチオンリポソームまたは非カチオンリポソーム)を含む。

【0261】

本発明の医薬組成物または医薬製剤は、当業者にとって適当でありかつ周知である、または公開文献に記載されている、1つ以上の透過促進剤、担体、賦形剤、または他の活性成分あるいは非活性成分を含むこともある。実施形態において、リポソームは立体的に安定したリポソーム、例えば1つ以上の特定の脂質を含むリポソームも含む。これらの特定の脂質は、循環寿命が増強されたリポソームを結果としてもたらす。実施形態では、立体的に安定したリポソームは、1つ以上の糖脂質を含むか、またはポリエチレングリコール(PEG)部分などの1つ以上の親油性ポリマーを用いて誘導体化される。実施形態では、界面活性剤は医薬製剤または医薬組成物中に含まれる。薬物製品、製剤およびエマルジョンにおける界面活性剤の使用は、当技術分野においてよく知られている。実施形態では、本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの効率的な送達を達成する、例えば、細胞膜にわたる拡散を助ける及び/又は脂溶性薬物の浸透性を増強するために、浸透促進剤を利用する。実施形態では、浸透促進剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、または非キレート性の非界面活性剤である。

10

【0262】

実施形態において、医薬製剤は複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは他の薬物または治療剤と組み合わせて投与される。実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当技術分野において既知の任意の方法によって、血液脳関門を介する対象のアンチセンスオリゴヌクレオチドの浸透を促進することができる1つ以上の薬剤と共に投与される。例えば、筋組織内の運動ニューロンヘアデノウイルスベクターを投与することによる薬剤の送達は、引用によって本明細書に組み込まれる米国特許第6,632,427号「Adenoviral vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons」に記載されている。脳、例えば、線条体、視床、海馬、または黒質への直接のベクターの送達は、例えば、引用によって本明細書に組み込まれる米国特許第6,756,523号「Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain」に記載される。

20

30

【0263】

実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、望ましい薬理学的性質または薬力学的性質を提供する薬剤に結合されるか抱合される。実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、血液脳関門を介する浸透または輸送を促進すると当技術分野において知られている物質、例えばトランスフェリン受容体の抗体に結合される。実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、アンチセンス化合物をより効果的にするために、または血液脳関門を介する輸送を増加させるためにウイルスベクターに結合される。実施形態において、浸透性の血液脳関門の破壊は、砂糖、例えばメソエリスリトール、キシリトール、D(+)ガラクトース、D(+)ラクトース、D(+)キシロース、ズルシトール、ミオ-イノシトール、L(-)フルクトース、D(-)マンニトール、D(+)グルコース、D(+)アラビノース、D(-)アラビノース、セロビオース、D(+)マルトース、D(+)ラフィノース、L(+)ラムノース、D(+)メリビオース、D(-)リボース、アドニトール、D(+)アラビトール、L(-)アラビトール

40

50

、D (+)フコース、L (-)フコース、D (-)リキソース、L (+)リキソース、およびL (-)リキソース、またはアミノ酸、例えばグルタミン、リジン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、チロシン、バリン、およびタウリンを注入することにより促進される。血液脳関門浸透を増強する方法および材料は、例えば、それぞれが引用により本明細書に組み込まれた、米国特許第4,866,042号「Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier」、米国特許第6,294,520号「Material for passage through the blood-brain barrier」、および米国特許第6,936,589号「Parenteral delivery systems」に記載されている。10

【0264】

実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、1つ以上の部分または抱合体、例えば、オリゴヌクレオチドの活性または細胞取り込みを増強する標的部分または他の抱合体、に化学的に結合される。そのような部分は、限定されないが、例えばコレステロール部分、コレステリル部分のような脂質部分、例えばドデカンジオールもしくはウンデシルの残基、ポリアミン鎖もしくはポリエチレングリコール鎖などの脂肪鎖、またはアダマンタン酢酸を含む。親油性部分を含むオリゴヌクレオチドおよび調製方法は、公開された文献に記載されている。複数の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定されないが、脱塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、例えば、N-アセチルガラクトサミン(GlucNAc)、N-Acグルコサミン(GalNAc)、もしくはマンノース(例えばマンノース-6-リン酸)、脂質、またはポリ炭化水素化合物を含む部分で抱合される。当該技術分野で理解され文献に記載されるように、例えばリンカーを用いて、抱合体は、糖、塩基またはリン酸基上のいくつかの位置のうちのいずれかでアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む任意のヌクレオチドの1つ以上に結合することができる。リンカーは二価または三価の分枝リンカーを含むことができる。実施形態では、抱合体はアンチセンスオリゴヌクレオチドの3'末端に結合されている。オリゴヌクレオチド抱合体を調製する方法は、例えば、米国特許第8,450,467号「Carbohydrate conjugates as delivery agents for oligonucleotides」に記載され、該文献は参照により本明細書に組み込まれる。20

【0265】

被験体の処置

本明細書に提供される組成物のうちのいずれかが個体に投与されうる。「個体」は、「被験体」または「患者」と交換可能に使用されてもよい。個体は哺乳動物でもよく、例えば人間、または、人類以外の靈長類、げっ歯類、ウサギ、ラット、マウス、馬、ロバ、ヤギ、猫、犬、雌牛、ブタ、あるいは羊などの動物である。実施形態では、個体はヒトである。実施形態では、個体は胎児、胚、または小児である。他の実施形態では、個体は植物などの別の真核生物であってもよい。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される化合物は細胞にエクスピボで投与される。30

【0266】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される組成物は、疾病または障害を処置する方法として個体に投与される。いくつかの実施形態では、個体は、本明細書に記述された疾病のいずれかなどの遺伝病を有する。いくつかの実施形態では、個体は、本明細書に記述された疾病のいずれかなどの疾病を有するリスクがある。いくつかの実施形態では、個体は、不十分な量のタンパク質または不十分な活性のタンパク質により引き起こされる疾病または障害を有するリスクが増大している。個体が、不十分な量のタンパク質または不十分な活性のタンパク質により引き起こされる疾病または障害を有するリスクが増大している場合、方法は防止的または予防的な処置を含む。例えば、個体は、その疾病の家族健康40

歴のために、そのような疾病または障害を有するリスクが増大している場合がある。典型的には、そのような疾病または障害を有するリスクが増大している個体は、予防的処置（例えば、疾病または障害の発症または悪化を予防するかまたは遅らせることによる）から利益を受ける。

【0267】

本発明のASOの投与に適切な経路は、ASOの送達が所望される細胞型に応じて変わりうる。多数の組織および器官は本明細書に記載の症状に影響を受けることがあり、腎臓が最も著しく影響を受ける組織である。本発明のASOは、例えば、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射または静脈内注射によって、患者に非経口的に投与されてもよい。複数の実施形態では、送達は腎臓に行われる。実施形態では、胎児は、例えば胎児にASO組成物を直接的または間接的に（例えば母親を介して）投与することによって、子宮内で処置される。

10

【0268】

スプライシングを増強する追加のASOを特定する方法

本発明の範囲内にはまた、特異的に標的イントロンでのRIC mRNA前駆体のスプライシングを増強する追加のASOを特定する（判定する）方法がある。mRNA前駆体の標的領域内で様々なヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするASOは、標的イントロンのスプライシングの速度および/または程度を改善するASOを特定する（判定する）ためにスクリーニングされてもよい。いくつかの実施形態では、ASOはスプライシング抑制因子/サイレンサーの結合部位をブロックまたは妨害することがある。当該技術分野において既知の任意の方法が、イントロンの標的領域にハイブリダイズされた時に所望の効果（例えばスプライシング、タンパク質または機能的RNA生産の向上）をもたらすASOを特定する（判定する）ために使用されてもよい。これらの方法はまた、保持されたイントロンに隣接するエクソン中、または保持されていないイントロン中の標的領域へ結合することにより、保持されたイントロンのスプライシングを増強するASOの特定のために使用することができる。使用されうる方法の一例が下記に提供される。

20

【0269】

mRNA前駆体の標的領域にハイブリダイズするように設計されたASOを用いて、ASO「ウォーク」（walk）と呼ばれる、一ラウンドのスクリーニングを行いうる。例えば、ASOウォークに使用されるASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位のおよそ100ヌクレオチド上流（例えば、標的とされた/保持されたイントロンの上流に位置するエクソンの配列の一部）から、標的とされた/保持されたイントロンの5'スプライス部位のおよそ100ヌクレオチド下流まで、および/または、保持されたイントロンの3'スプライス部位のおよそ100ヌクレオチド上流から、標的とされた/保持されたイントロンの3'スプライス部位のおよそ100ヌクレオチド下流（例えば、標的とされた/保持されたイントロンの下流に位置するエクソンの配列の一部）まで、5つのヌクレオチドごとに敷き詰められ得る。例えば、15ヌクレオチドの長さの第1のASOは、標的とされた/保持されたイントロンの5'スプライス部位に対しヌクレオチド+6から+20に特異的にハイブリダイズするように設計され得る。第2のASOは、標的とされた/保持されたイントロンの5'スプライス部位に対するヌクレオチド+11から+25に特異的にハイブリダイズするように設計されている。ASOは、mRNA前駆体の標的領域に及ぶように設計されている。複数の実施形態では、ASOは、より密に、例えば、1、2、3、または4つのヌクレオチドごとに敷き詰められ得る。さらに、ASOは、5'スプライス部位の100ヌクレオチド下流から、3'スプライス部位の100ヌクレオチド上流まで敷き詰められ得る。

30

【0270】

1つ以上のASO、または1つの対照ASO（標的領域にハイブリダイズするとは予期されていない配列である、スクランブル配列を有するASO）は、例えばトランスフェクションによって、標的mRNA前駆体（例えば、本明細書で別記されるRIC mRNA前駆体）を発現する疾患関連の細胞株へと送達される。ASOの各々のスプライシングを誘

40

50

発する効果は、本明細書で記載されるように、当該技術分野で既知の方法、例えば、スプライスジャンクションに及ぶプライマーを使用する逆転写酵素（R T ）- P C R によって評価され得る（「イントロン保持事象の特定」を参照）。対照 A S O 処理された細胞と比較して、A S O 処理された細胞におけるスプライスジャンクションに及ぶプライマーを使用して生成された R T - P C R 産物が減少または欠如することは、標的イントロンのスプライシングが増強されたことを示している。いくつかの実施形態では、スプライシング効率、スプライシングされていない m R N A 前駆体に対するスプライシングされた m R N A 前駆体の割合、スプライシングの速度、またはスプライシングの程度は、本明細書に記載される A S O を使用して改善され得る。標的 m R N A 前駆体によってコードされるタンパク質または機能的 R N A の量も、各 A S O が所望の効果（例えば、タンパク質産生の増強）を達成したかどうかを判定するために評価され得る。ウェスタンプロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡検査法、および E L I S A などの、タンパク質産生を評価し及び／又は定量するための、当該技術分野で既知の方法も使用することができる。

【 0 2 7 1 】

A S O 「ミクロウォーク」（ m i c r o - w a l k ）と呼ばれる第 2 ラウンドのスクリーニングは、m R N A 前駆体の標的領域にハイブリダイズするように設計された A S O を使用して実行され得る。A S O ミクロウォークに使用される A S O は、A S O でハイブリダイズされたときに結果的にスプライシングを増強させる m R N A 前駆体のヌクレオチド酸配列をさらに改良する（ r e f i n e ）ために、1 つのヌクレオチドごとに敷き詰められる。標的イントロンのスプライシングを促進する A S O によって定義される領域は、1 - n t ステップ（ 1 - n t s t e p s ）で配置された A S O 、ならびに、典型的には 1 8 - 2 5 n t である、より長い A S O を含む、A S O 「ミクロウォーク」によって、より詳細に調査される。上記で A S O ウォークに関して記載されたように、1 つ以上の A S O 、または対照 A S O （標的領域にハイブリダイズすると予期されていない配列である、スクランブル配列を有する A S O ）を、例えばトランスフェクションによって、標的 m R N A 前駆体を発現する疾患関連細胞株へと送達することにより、A S O ミクロウォークが実行される。A S O の各々のスプライシングを誘発する効果は、本明細書で記載されるように、当該技術分野で既知の方法、例えば、スプライスジャンクションに及ぶプライマーを使用する逆転写酵素（R T ）- P C R によって評価され得る（「イントロン保持事象の特定」を参照）。対照 A S O 処理された細胞と比較して、A S O 処理された細胞におけるスプライスジャンクションに及ぶプライマーを使用して生成された R T - P C R 産物が減少または欠如することは、標的イントロンのスプライシングが増強されたことを示している。いくつかの実施形態では、スプライシング効率、比率、スプライシングされていない m R N A 前駆体に対するスプライシングされた m R N A 前駆体の割合、スプライシングの速度、またはスプライシングの程度は、本明細書に記載される A S O を使用して改善され得る。標的 m R N A 前駆体によってコードされるタンパク質または機能的 R N A の量も、各 A S O が所望の効果（例えば、タンパク質産生の増強）を達成したかどうかを判定するために評価され得る。ウェスタンプロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡検査法、および E L I S A などの、タンパク質産生を評価し及び／又は定量するための、当該技術分野で既知の方法も使用することができる。

【 0 2 7 2 】

m R N A 前駆体の領域にハイブリダイズされたときに、結果的にスプライシングを増強させ、タンパク質産生を増加させる A S O は、動物モデル、例えば、全長ヒト遺伝子がノックインされたトランスジェニックマウスモデルまたは疾患のヒト化マウスモデルを使用して、インビボで試験され得る。A S O の投与に適した経路は、A S O の送達が望まれる疾患及び／又は細胞型に応じて変化し得る。A S O は、例えば、腹腔内注射、筋肉注射、皮下注射、または静脈注射によって投与され得る。投与後に、モデル動物の細胞、組織、及び／又は臓器は、当該技術分野に既知の方法および本明細書に記載される方法によって、例えば、スプライシング（効率、速度、程度）およびタンパク質産生を評価することにより、A S O 処置の効果を判定するために評価され得る。動物モデルはまた、疾患または疾

10

20

30

40

50

患重症度の表現型の徵候または行動的な徵候であり得る。

【 0 2 7 3 】

本発明の好ましい実施形態が本明細書に示され記載された一方、そのような実施形態が一例としてのみ提供されていることは当業者にとって明白である。多くの変更、変化および置換が、本発明から逸脱することなく、当業者の心に思い浮かぶであろう。本明細書に記載される本発明の実施形態の様々な代案が、本発明の実施において利用されるかもしれないことを理解されたい。以下の請求項は本発明の範囲を定義するものであり、この請求項とその均等物の範囲内の方法および構造体がそれによって包含されるものであるということが意図されている。

本明細書は以下の発明の態様を包含する。

10

【 1 】

被験体の細胞により標的タンパク質または機能的 RNA の発現を増加させることによって被験体の腎臓病を処置する方法であって、ここで、前記細胞は、保持されたイントロン含有 m RNA 前駆体 (R I C m RNA 前駆体) を有し、該 R I C m RNA 前駆体は、保持されたイントロン、 5 ' スプライス部位に隣接しているエクソン、および 3 ' スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、ここで、 R I C m RNA 前駆体は、標的タンパク質または機能的 RNA をコードし、前記方法は、被験体の細胞を、標的タンパク質または機能的 RNA をコードする R I C m RNA 前駆体の標的部分に相補的なアンチセンスオリゴマー (A S O) と接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能的 RNA をコードする R I C m RNA 前駆体から構成的にスプライシングされ、それにより、標的タンパク質または機能的 RNA をコードする m RNA のレベルを増加させ、被験体の細胞内で、標的タンパク質または機能的 RNA の発現を増加させる、方法。

20

【 2 】

腎臓病は、幼児の腎症性シスチン蓄積症、遅発性シスチン蓄積症、巣状分節性糸球体硬化症 7 、乳頭腎症候群、あるいは幼児の高カルシウム血症である、【 1 】に記載の方法。

【 3 】

保持されたイントロン含有 m RNA 前駆体 (R I C m RNA 前駆体) を有している細胞によって、標的タンパク質の発現を増加させる方法であって、 R I C m RNA 前駆体は、保持されたイントロン、保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に隣接しているエクソン、および保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、ここで、 R I C m RNA 前駆体は標的タンパク質をコードし、前記方法は、細胞を、標的タンパク質をコードする R I C m RNA 前駆体の標的部分に相補的なアンチセンスオリゴマー (A S O) と接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、標的タンパク質をコードする R I C m RNA 前駆体から構成的にスプライシングされ、それにより、標的タンパク質をコードする m RNA のレベルを増加させ、細胞内で標的タンパク質の発現を増加させ、ここで、標的タンパク質は、シスチノシン、タンパク質ペアードボックス遺伝子 2 タンパク質、タンパク質シトクロム P 4 5 0 ファミリー 2 4 、サブファミリー A 、ポリペプチド 1 、あるいはペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 である、方法。

30

【 4 】

標的タンパク質は、シスチノシン、タンパク質ペアードボックス遺伝子 2 タンパク質、タンパク質シトクロム P 4 5 0 ファミリー 2 4 、サブファミリー A 、ポリペプチド 1 、あるいはペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 である、【 1 】または【 2 】に記載の方法。

40

【 5 】

標的タンパク質または機能的 RNA は、被験体において量あるいは活性が不足している標的タンパク質あるいは機能的 RNA を機能的に増大させるか、これに取って代わる、補償タンパク質あるいは補償機能的 RNA である、【 1 】または【 2 】に記載の方法。

【 6 】

50

細胞は、標的タンパク質の量または活性の不足によって引き起こされた疾患有する被験体内にあるか、または被験体に由来する、[3] に記載の方法。

[7]

標的タンパク質の量の不足は、標的タンパク質のハプロ不全によって引き起こされ、ここで被験体は、機能的な標的タンパク質をコードする第 1 の対立遺伝子、標的タンパク質が産生されない第 2 の対立遺伝子、または非機能的な標的タンパク質をコードする第 2 の対立遺伝子を有し、アンチセンスオリゴマーは、第 1 の対立遺伝子から転写された R I C m R N A 前駆体の標的部分に結合する、[1] - [6] のいずれか 1 つに記載の方法。

[8]

被験体は、標的タンパク質の量または機能の不足に起因する障害により引き起こされた疾患有してあり、ここで、被験体は、

(a) (i) 標的タンパク質が野生型対立遺伝子からの生成と比較して、減少したレベルで生成され、

(i i) 標的タンパク質が同等の野性型タンパク質と比較して機能が低下した形態で生成され、あるいは、

(i i i) 標的タンパク質が生成されない、第 1 の変異対立遺伝子と、

(b) (i) 標的タンパク質が野生型対立遺伝子からの生成と比較して、減少したレベルで生成され、

(i i) 標的タンパク質が同等の野性型タンパク質と比較して、機能が低下した形態で生成され、あるいは、

(i i i) 標的タンパク質が生成されない、第 2 の変異対立遺伝子と、を有し、ここで、被験体が第 1 の変異対立遺伝子 (a) (i i i) を有するとき、第 2 の変異対立遺伝子は (b) (i) あるいは (b) (i i) であり、被験体が第 2 の変異対立遺伝子 (b) (i i i) を有するとき、第 1 の変異対立遺伝子は (a) (i) あるいは (a) (i i) であり、R I C m R N A 前駆体は、(a) (i) あるいは (a) (i i) である第 1 の変異対立遺伝子、および / または、(b) (i) あるいは (b) (i i) である第 2 の変異対立遺伝子から転写される、[1] - [6] のいずれか 1 つに記載の方法。

[9]

標的タンパク質は、同等の野性型タンパク質と比較して、機能が低下した形態で生成される、[8] に記載の方法。

[1 0]

標的タンパク質は、同等の野性型タンパク質と比較して、十分に機能的な形態で生成される、[8] に記載の方法。

[1 1]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に対して + 6 ~ 保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対して - 1 6までの領域内の保持されたイントロンにある、[1] - [1 0] のいずれか 1 つに記載の方法。

[1 2]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に対して + 6 9 ~ 保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対して - 7 9までの領域内の保持されたイントロンにある、[1] - [1 0] のいずれか 1 つに記載の方法。

[1 3]

標的タンパク質はシスチノシンである、[1] - [1 2] のいずれか 1 つに記載の方法。

[1 4]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に対して + 5 0 0 ~ 保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対して - 5 0 0までの領域内の保持されたイントロンにある、[1 3] に記載の方法。

[1 5]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、S E Q I D N O : 8 6 2 4 - 1 0 0 6 8 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9

10

20

30

40

50

8 %、99 %、あるいは100 %相補的な配列を含む、[13]または[14]に記載の方法。

[16]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO: 10748 または SEQ ID NO: 10734 の少なくとも 8 つの隣接する核酸を含む領域に少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、あるいは 100 % の配列同一性を備えた配列を含む、[13] - [15] のいずれか 1 つに記載の方法。

[17]

ASO は、SEQ ID NO: 8624 - 10068 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、あるいは 100 % の配列同一性を備えた配列を含む、[13] - [16] のいずれか 1 つに記載の方法。

10

[18]

R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO: 16 または SEQ ID NO: 17 に対して少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、あるいは 100 % の配列同一性を備えた配列を含む、[13] - [17] のいずれか 1 つに記載の方法。

[19]

R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO: 3 に対して少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる、[13] - [18] のいずれか 1 つに記載の方法。

20

[20]

標的タンパク質はペアードボックス遺伝子 2 タンパク質である、[1] - [12] のいずれか 1 つに記載の方法。

[21]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対して +500 ~ 保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対して -500 までの領域内の保持されたイントロンにある、[20] に記載の方法。

[22]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO: 6953 - 8623 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、あるいは 100 % 相補的な配列を含む、[20] または [21] に記載の方法。

30

[23]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO: 10738 または SEQ ID NO: 10740 の少なくとも 8 つの隣接する核酸を含む領域に少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、あるいは 100 % の配列同一性を備えた配列を含む、[20] - [22] のいずれか 1 つに記載の方法。

[24]

R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO: 6953 - 8623 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、あるいは 100 % の配列同一性を備えた配列を含む、[20] - [23] のいずれか 1 つに記載の方法。

40

[25]

R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO: 10 - 15 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、あるいは 100 % の配列同一性を備えた配列を含む、[20] - [24] のいずれか 1 つに記載の方法。

[26]

R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO: 2 に対して少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、あるいは 100 % の配列同一性

50

を有する遺伝子配列によってコードされる、[2 0] - [2 5] のいずれか 1 つに記載の方法。

[2 7]

標的タンパク質はタンパク質シトクロム P 4 5 0 ファミリー 2 4 、サブファミリー A 、
ポリペプチド 1 である、[1] - [1 2] のいずれか 1 つに記載の方法。

[2 8]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に対して + 5 0 0 ~ 保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対して - 5 0 0 までの領域内の保持されたイントロンにある、[2 7] に記載の方法。

[2 9]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、S E Q I D N O : 9 5 2 0 - 1 0 7 3 3 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、あるいは 1 0 0 % 相補的な配列を含む、[2 7] または [2 8] に記載の方法。

10

[3 0]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、S E Q I D N O : 1 0 7 4 8 、 S E Q I D N O : 1 0 7 3 4 、 S E Q I D N O : 1 0 7 4 6 、 S E Q I D N O : 1 0 7 4 5 、あるいは S E Q I D N O : 1 0 7 4 1 の少なくとも 8 つの隣接する核酸を含む領域に少なくとも 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を備えた配列を含む、[2 7] - [2 9] のいずれか 1 つに記載の方法。

20

[3 1]

A S O は、S E Q I D N O : 9 5 2 0 - 1 0 7 3 3 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を備えた配列を含む、[2 7] - [3 0] のいずれか 1 つに記載の方法。

[3 2]

R I C m R N A 前駆体は、S E Q I D N O : 1 6 - 1 9 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を備えた配列を含む、[2 7] - [3 1] のいずれか 1 つに記載の方法。

30

[3 3]

R I C m R N A 前駆体は、S E Q I D N O : 4 に対して少なくとも約 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる、[2 7] - [3 2] のいずれか 1 つに記載の方法。

[3 4]

標的タンパク質はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 である、[1] - [1 2] のいずれか 1 つに記載の方法。

[3 5]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に対して + 5 0 0 ~ 保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対して - 5 0 0 までの領域内の保持されたイントロンにある、[3 4] に記載の方法。

40

[3 6]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、S E Q I D N O : 2 0 - 6 9 5 2 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、あるいは 1 0 0 % 相補的な配列を含む、[3 4] または [3 5] に記載の方法。

[3 7]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、S E Q I D N O : 1 0 7 3 6 、 S E Q I D N O : 1 0 7 4 7 、 S E Q I D N O : 1 0 7 3 9 、 S E Q I D N O : 1 0 7 4 3 、 S E Q I D N O : 1 0 7 4 2 、 S E Q I D N O : 1 0 7 3 7 、 S E Q I D N O :

50

10735、あるいはSEQ_ID_NO:10744の少なくとも8つの隣接する核酸を含む領域に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む、[34]-[36]のいずれか1つに記載の方法。

[38]

ASOは、SEQ_ID_NO:20-6952のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む、[34]-[37]のいずれか1つに記載の方法。

[39]

RIC_mRNA前駆体は、SEQ_ID_NO:5-9のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を備えた配列を含む、[34]-[38]のいずれか1つに記載の方法。

[40]

RIC_mRNA前駆体は、SEQ_ID_NO:1に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは100%の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる、[34]-[39]のいずれか1つに記載の方法。

[41]

RIC_mRNA前駆体の標的部位は、

(a) 保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+6から+100の領域、あるいは、

(b) 保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-16から-100の領域、の内部の保持されたイントロンにある、[1]-[10]および[13]-[40]のいずれか1つに記載の方法。

[42]

アンチセンスオリゴマーは、少なくとも1つの保持されたイントロンの5'スプライス部位の約100ヌクレオチド下流から、少なくとも1つの保持されたイントロンの3'スプライス部位の約100ヌクレオチド上流までの領域内にあるRIC_mRNA前駆体の一部を標的とする、[1]-[10]および[13]-[40]のいずれか1つに記載の方法。

[43]

RIC_mRNA前駆体の標的部位は、

(a) 保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接するエクソン中の+2e~-4eの領域、あるいは、

(b) 保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接するエクソン中の+2e~-4eの領域、

の内部にある、[1]-[10]および[13]-[40]のいずれか1つに記載の方法。

[44]

アンチセンスオリゴマーは、機能的RNAまたは標的タンパク質をコードする遺伝子から転写されたmRNA前駆体の選択的スプライシングを調節することにより、標的タンパク質または機能的RNAの量を増加させない、[1]-[43]のいずれか1つに記載の方法。

[45]

アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能的RNAをコードする遺伝子の突然変異に起因する異常スプライシングを調節することにより、標的タンパク質または機能的RNAの量を増加させない、[1]-[44]のいずれか1つに記載の方法。

[46]

RIC_mRNA前駆体は、全長のmRNA前駆体の部分的スプライシング、または野生型のmRNA前駆体の部分的スプライシングによって生成された、[1]-[45]のい

10

20

30

40

50

すれか 1 つに記載の方法。

[4 7]

標的タンパク質または機能的 RNA をコードする mRNA は、全長の成熟 mRNA、あるいは野生型の成熟 mRNA である、[1] - [4 6] のいずれか 1 つに記載の方法。

[4 8]

生成された標的タンパク質は全長のタンパク質あるいは野生型のタンパク質である、[1] - [4 7] のいずれか 1 つに記載の方法。

[4 9]

アンチセンスオリゴマーと接触させた細胞において生成された標的タンパク質または機能的 RNA をコードする mRNA の総量は、対照細胞において生成された標的タンパク質または機能的 RNA をコードする mRNA の総量と比較して、約 1 . 1 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 5 ~ 約 1 0 倍、約 2 ~ 約 1 0 倍、約 3 ~ 約 1 0 倍、約 4 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 1 ~ 約 5 倍、約 1 . 1 ~ 約 6 倍、約 1 . 1 ~ 約 7 倍、約 1 . 1 ~ 約 8 倍、約 1 . 1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3 . 5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、あるいは少なくとも約 1 0 倍増加する、[1] - [4 8] のいずれか 1 つに記載の方法。

[5 0]

アンチセンスオリゴマーと接触させた細胞によって生成された標的タンパク質の総量は、対照細胞によって生成された標的タンパク質の総量と比較して、約 1 . 1 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 5 ~ 約 1 0 倍、約 2 ~ 約 1 0 倍、約 3 ~ 約 1 0 倍、約 4 ~ 約 1 0 倍、約 1 . 1 ~ 約 5 倍、約 1 . 1 ~ 約 6 倍、約 1 . 1 ~ 約 7 倍、約 1 . 1 ~ 約 8 倍、約 1 . 1 ~ 約 9 倍、約 2 ~ 約 5 倍、約 2 ~ 約 6 倍、約 2 ~ 約 7 倍、約 2 ~ 約 8 倍、約 2 ~ 約 9 倍、約 3 ~ 約 6 倍、約 3 ~ 約 7 倍、約 3 ~ 約 8 倍、約 3 ~ 約 9 倍、約 4 ~ 約 7 倍、約 4 ~ 約 8 倍、約 4 ~ 約 9 倍、少なくとも約 1 . 1 倍、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 2 . 5 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 3 . 5 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、あるいは少なくとも約 1 0 倍増加する、[1] - [4 9] のいずれか 1 つに記載の方法。

[5 1]

アンチセンスオリゴマーは、ホスホロチオエート結合またはホスホジアミデート結合を含む骨格修飾を含む、[1] - [5 0] のいずれか 1 つに記載の方法。

[5 2]

アンチセンスオリゴマーはホスホジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2' - O - メチル、2' - フルオロ、あるいは 2' - O - メトキシエチル部分を含む、[1] - [5 1] のいずれか 1 つに記載の方法。

[5 3]

アンチセンスオリゴマーは少なくとも 1 つの修飾された糖部を含む、[1] - [5 2] のいずれか 1 つに記載の方法。

[5 4]

それぞれの糖部は修飾された糖部である、[5 3] に記載の方法。

[5 5]

アンチセンスオリゴマーは、8 ~ 5 0 の核酸塩基、8 ~ 4 0 の核酸塩基、8 ~ 3 5 の核酸塩基、8 ~ 3 0 の核酸塩基、8 ~ 2 5 の核酸塩基、8 ~ 2 0 の核酸塩基、8 ~ 1 5 の核酸塩基、9 ~ 5 0 の核酸塩基、9 ~ 4 0 の核酸塩基、9 ~ 3 5 の核酸塩基、9 ~ 3 0 の核酸塩基、9 ~ 2 5 の核酸塩基、9 ~ 2 0 の核酸塩基、9 ~ 1 5 の核酸塩基、1 0 ~ 5 0 の核酸塩基、1 0 ~ 4 0 の核酸塩基、1 0 ~ 3 5 の核酸塩基、1 0 ~ 3 0 の核酸塩基、1 0 ~ 2 5 の核酸塩基、1 0 ~ 2 0 の核酸塩基、1 0 ~ 1 5 の核酸塩基、1 1 ~ 5 0 の核酸塩基、1 1 ~ 4 0 の核酸塩基、1 1 ~ 3 5 の核酸塩基、1 1 ~ 3 0 の核酸塩基、1 1 ~ 2 5 の核酸塩基、1 1 ~ 2 0 の核酸塩基、1 1 ~ 1 5 の核酸塩基、1 2 ~ 5 0 の核酸塩基、1

10

20

30

40

50

2 ~ 4 0 の核酸塩基、1 2 ~ 3 5 の核酸塩基、1 2 ~ 3 0 の核酸塩基、1 2 ~ 2 5 の核酸塩基、1 2 ~ 2 0 の核酸塩基、あるいは1 2 ~ 1 5 の核酸塩基からなる、[1] - [5 4] のいずれか 1 つに記載の方法。

[5 6]

アンチセンスオリゴマーは、タンパク質をコードする R I C m R N A 前駆体の標的部に少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、あるいは 1 0 0 % 相補的である、[1] - [5 5] のいずれか 1 つに記載の方法。

[5 7]

細胞は、標的タンパク質または機能的 R N A をコードする遺伝子から転写された R I C m R N A 前駆体の集団を含み、ここで、R I C m R N A 前駆体の集団は 2 つ以上の保持されたイントロンを含み、および、ここで、アンチセンスオリゴマーは、R I C m R N A 前駆体の集団で最も豊富な保持されたイントロンに結合する、[1] - [5 6] のいずれか 1 つに記載の方法。

[5 8]

最も豊富な保持されたイントロンに対するアンチセンスオリゴマーの結合は、標的タンパク質または機能的 R N A をコードする m R N A を生成するために R I C m R N A 前駆体の集団からの 2 つ以上の保持されたイントロンのスプライシングアウトを誘発する、[5 7] に記載の方法。

[5 9]

細胞は、標的タンパク質または機能的 R N A をコードする遺伝子から転写された R I C m R N A 前駆体の集団を含み、ここで、R I C m R N A 前駆体の集団は 2 つ以上の保持されたイントロンを含み、および、ここで、アンチセンスオリゴマーは、R I C m R N A 前駆体の集団で 2 番目に豊富な保持されたイントロンに結合する、[1] - [5 6] のいずれか 1 つに記載の方法。

[6 0]

2 番目に豊富な保持されたイントロンに対するアンチセンスオリゴマーの結合は、標的タンパク質または機能的 R N A をコードする m R N A を生成するために R I C m R N A 前駆体の集団からの 2 つ以上の保持されたイントロンのスプライシングアウトを誘発する、[5 9] に記載の方法。

[6 1]

疾病は、疾患または障害である、[6] - [6 0] のいずれか 1 つに記載の方法。

[6 2]

疾患または障害は腎臓病である、[6 1] に記載の方法。

[6 3]

腎臓病は、幼児の腎症性シスチン蓄積症、遅発性シスチン蓄積症、巣状分節性糸球体硬化症 7 、乳頭腎症候群、あるいは幼児の高カルシウム血症である、[6 2] に記載の方法。

[6 4]

標的タンパク質と R I C m R N A 前駆体は、遺伝子によってコードされ、ここで、遺伝子は C T N S 、 P A X 2 、 C Y P 2 4 A 1 、あるいは P P A R D である、[6 3] に記載の方法。

[6 5]

前記方法はタンパク質発現を評価する工程をさらに含む、[1] - [6 4] のいずれか 1 つに記載の方法。

[6 6]

被験体はヒトである、[1] - [6 5] のいずれか 1 つに記載の方法。

[6 7]

被験体はヒト以外の動物である、[1] - [6 5] のいずれか 1 つに記載の方法。

[6 8]

被験体は胎児、胚、あるいは子供である、[1] - [6 6] のいずれか 1 つに記載の方法。

10

20

30

40

50

法。

[6 9]

細胞はエクスピボである、[1] - [6 7] のいずれか 1 つに記載の方法。

[7 0]

アンチセンスオリゴマーは、被験体の腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、あるいは静脈内注射によって投与される、[1] - [6 7] のいずれか 1 つに記載の方法。

[7 1]

5' スプライス部位に隣接するエクソンの - 3 e ~ - 1 e と、保持されたイントロンの + 1 ~ + 6 にある 9 つのヌクレオチドは、対応する野性型配列と同一である、[1] - [7 0] のいずれか 1 つに記載の方法。

10

[7 2]

保持されたイントロンの - 1 5 ~ - 1 と 3' スプライス部位に隣接するエクソンの + 1 e にある 1 6 のヌクレオチドは、対応する野性型配列と同一である、[1] - [7 1] のいずれか 1 つに記載の方法。

[7 3]

[1] - [7 2] のいずれか 1 つの方法で使用されるアンチセンスオリゴマー。

[7 4]

SEQ ID NO : 2 0 - 1 0 7 3 3 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を備えた配列を含むアンチセンスオリゴマー。

20

[7 5]

[7 3] または [7 4] のアンチセンスオリゴマーと賦形剤とを含む医薬組成物。

[7 6]

腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、あるいは静脈内注射によって [7 5] に記載の医薬組成物を投与することにより被験体を処置する方法。

[7 7]

不足しているタンパク質または不足している機能的な RNA に関連している被験体の腎臓病を処置するために、細胞によって標的タンパク質あるいは機能的 RNA の発現を増加させる方法で使用されるアンチセンスオリゴマーを含む組成物であって、ここで、不足しているタンパク質または機能的 RNA は、被験体において量あるいは活性が不足しており、ここで、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能的 RNA をコードする、保持されたイントロン含有 m RNA 前駆体 (R I C m RNA 前駆体) の構成的スプライシングを増強し、ここで、標的タンパク質は、

30

(a) 不足しているタンパク質、あるいは、

(b) 被験体において不足しているタンパク質を機能的に増大させるか、これに取って代わる、補償タンパク質であり、

ここで、機能的 RNA は、

(a) 不足している RNA 、あるいは、

(b) 被験体の不足している機能的 RNA を機能的に増大させるか、これに取って代わる、補償機能的 RNA であり、

40

ここで R I C m RNA 前駆体は、保持されたイントロン、5' スプライス部位に隣接しているエクソン、および 3' スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能的 RNA をコードする R I C m RNA 前駆体からスプライシングされ、それによって、被験体において標的タンパク質または機能的 RNA の產生または活性を増加させる、組成物。

[7 8]

腎臓病は、幼児の腎症性シスチン蓄積症、遅発性シスチン蓄積症、巣状分節性糸球体硬化症 7 、乳頭腎症候群、あるいは幼児の高カルシウム血症である、[7 7] に記載の組成物。

[7 9]

50

被験体において標的タンパク質に関する疾病を処置する方法に使用するためのアンチセンスオリゴマーを含む組成物であって、前記方法は、被験体の細胞によって標的タンパク質の発現を増加させる工程であって、細胞が保持されたイントロン、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソン、および保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソンを含む、保持されたイントロン含有mRNA前駆体(R I C mRNA前駆体)を有し、R I C mRNA前駆体は、標的タンパク質をコードする、工程と、細胞をアンチセンスオリゴマーと接触させる工程であって、それによって、保持されたイントロンが、標的タンパク質をコードするR I C mRNA前駆体の転写産物から構成的にスプライシングされ、それにより、被験体の細胞内で、標的タンパク質または機能的RNAをコードするmRNAのレベルを増加させ、標的タンパク質の発現を増加させる、工程とを含む、組成物。

10

[8 0]

標的タンパク質は、シスチノシン、タンパク質ペアードボックス遺伝子2タンパク質、タンパク質シトクロムP450ファミリー24、サブファミリーA、ポリペプチド1、あるいはペルオキシソーム増殖因子活性化受容体である、[7 7] - [7 9]のいずれか1つに記載の組成物。

[8 1]

疾患は、疾患または障害である、[7 9]に記載の組成物。

[8 2]

疾患または障害は腎臓病である、[8 0]に記載の組成物。

20

[8 3]

腎臓病は、幼児の腎症性シスチン蓄積症、遅発性シスチン蓄積症、巣状分節性糸球体硬化症7、乳頭腎症候群、または幼児の高カルシウム血症である[8 2]に記載の組成物。

[8 4]

標的タンパク質およびR I C mRNA前駆体は、遺伝子によってコードされ、ここで遺伝子は、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDである、[8 2]または[8 3]に記載の組成物。

[8 5]

アンチセンスオリゴマーは、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+6から、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-16の領域内にある、R I C mRNA前駆体の一部を標的とする、[7 7] - [8 4]のいずれか1つに記載の組成物。

30

[8 6]

R I C mRNA前駆体の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+69から、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-79の領域内にある、[7 7] - [8 4]のいずれか1つに記載の組成物。

[8 7]

標的タンパク質はシスチノシンである、[7 7] - [8 6]のいずれか1つに記載の組成物。

[8 8]

R I C mRNA前駆体の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+500から、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-500の領域内にある、[8 7]に記載の組成物。

40

[8 9]

R I C mRNA前駆体の標的部分は、SEQ ID NO: 8624 - 10068のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%相補的な配列を含む、[8 7]または[8 8]に記載の組成物。

[9 0]

R I C mRNA前駆体の標的部分は、SEQ ID NO: 10748または1073

50

4の少なくとも8つの隣接する核酸を含む領域に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を備えた配列を含む、[87]-[89]のいずれか1つに記載の組成物。

[91]

A S O は、SEQ ID NO: 8624-10068のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を備えた配列を含む、[87]-[90]のいずれか1つに記載の組成物。

[92]

R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO: 16または17に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を備えた配列を含む、[87]-[91]のいずれか1つに記載の組成物。

10

[93]

R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO: 3に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる、[87]-[92]のいずれか1つに記載の組成物。

[94]

標的タンパク質は、ペアードボックス遺伝子2タンパク質である、[77]-[86]のいずれか1つに記載の組成物。

[95]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+500から、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-500の領域内にある、[94]に記載の組成物。

20

[96]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO: 6953-8623のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%相補的である配列を含む、[94]または[95]に記載の組成物。

[97]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO: 10738または10740の少なくとも8つの隣接する核酸を含む領域に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を備えた配列を含む、[94]-[96]のいずれか1つに記載の組成物。

30

[98]

A S O は、SEQ ID NO: 6953-8623のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を備えた配列を含む、[94]-[97]のいずれか1つに記載の組成物。

[99]

R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO: 10-15のいずれか1つに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を備えた配列を含む、[94]-[98]のいずれか1つに記載の組成物。

40

[100]

R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO: 2に対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる、[94]-[99]のいずれか1つに記載の組成物。

[101]

標的タンパク質は、タンパク質シトクロムP450ファミリー24、サブファミリーA、ポリペプチド1である、[77]-[86]のいずれか1つに記載の組成物。

50

[1 0 2]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する + 500 から、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対する - 500 の領域内にある、[1 0 1] に記載の組成物。

[1 0 3]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO : 9520 - 10733 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 相補的である配列を含む、[1 0 1] または [1 0 2] に記載の組成物。

[1 0 4]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO : 10748、10734、10746、10745 または 10741 の少なくとも 8 つの隣接する核酸を含む領域に対して、少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を備えた配列を含む、[1 0 1] - [1 0 3] のいずれか 1 つに記載の組成物。

10

[1 0 5]

A S O は、SEQ ID NO : 9520 - 10733 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を備えた配列を含む、[1 0 1] - [1 0 4] のいずれか 1 つに記載の組成物。

20

[1 0 6]

R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO : 16 - 19 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を備えた配列を含む、[1 0 1] - [1 0 5] のいずれか 1 つに記載の組成物。

[1 0 7]

R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO : 4 に対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる、[1 0 1] - [1 0 6] のいずれか 1 つに記載の組成物。

30

[1 0 8]

標的タンパク質は、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 である、[7 7] - [8 6] のいずれか 1 つに記載の組成物。

[1 0 9]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する + 500 から、保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対する - 500 の領域内にある、[1 0 8] に記載の組成物。

[1 1 0]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO : 20 - 6952 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 相補的である配列を含む、[1 0 8] または [1 0 9] に記載の組成物。

40

[1 1 1]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、SEQ ID NO : 10736、10747、10739、10743、10742、10737、10735、または 10744 の少なくとも 8 つの隣接する核酸を含む領域に対して、少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を備えた配列を含む、[1 0 8] - [1 1 0] のいずれか 1 つに記載の組成物。

[1 1 2]

A S O は、SEQ ID NO : 20 - 6952 のいずれか 1 つに対して少なくとも約 8

50

0 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %または100 %の配列同一性を備えた配列を含む、[108] - [111]のいずれか1つに記載の組成物。

[113]

R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO : 5 - 9 のいずれか1つに対して少なくとも約80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %または100 %の配列同一性を備えた配列を含む、[108] - [112]のいずれか1つに記載の組成物。

[114]

R I C m R N A 前駆体は、SEQ ID NO : 1 に対して少なくとも約80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %または100 %の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる、[108] - [113]のいずれか1つに記載の組成物。

10

[115]

アンチセンスオリゴマーは、保持されたイントロンにおいて、

(a) 保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+6から+100の領域、または、

(b) 保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-16から-100の領域、の内部にある、R I C m R N A 前駆体の一部を標的とする、[77] - [84]、および、[87] - [114]のいずれか1つに記載の組成物。

20

[116]

アンチセンスオリゴマーは、少なくとも1つの保持されたイントロンの5'スプライス部位の約100ヌクレオチド下流から、少なくとも1つの保持されたイントロンの3'スプライス部位の約100ヌクレオチド上流までの領域内にある、R I C m R N A 前駆体の一部を標的とする、[77] - [84]、および、[87] - [114]のいずれか1つに記載の組成物。

[117]

R I C m R N A 前駆体の標的部分は、

(a) 保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける+2eから-4eの領域、または、

(b) 保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける+2eから-4eの領域、

30

の内部にある、[77] - [84]、および、[87] - [114]のいずれか1つに記載の組成物。

[118]

アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能RNAをコードする遺伝子から転写されたmRNA前駆体の選択的スプライシングを調節することにより標的タンパク質または機能的RNAの量を増加させない、[77] - [117]のいずれか1つに記載の組成物。

[119]

アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能的RNAをコードする遺伝子の突然変異から結果として生じる異常スプライシングを調節することにより機能的RNAまたは機能的タンパク質の量を増加させない、[77] - [118]のいずれか1つに記載の組成物。

40

[120]

R I C m R N A 前駆体は、全長mRNA前駆体または野生型mRNA前駆体からの部分的スプライシングによって生成された、[77] - [119]のいずれか1つに記載の組成物。

[121]

標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAは、全長成熟mRNAまたは野生型成熟mRNAである、[77] - [120]のいずれか1つに記載の組成物。

50

[1 2 2]

生成される標的タンパク質は、全長タンパク質または野生型タンパク質である、[7 7] - [1 2 1] のいずれか 1 つに記載の組成物。

[1 2 3]

保持されたイントロンは律速イントロンである、[7 7] - [1 2 2] のいずれか 1 つに記載の組成物。

[1 2 4]

前記保持されたイントロンは、前記 R I C m R N A 前駆体で最も豊富な保持されたイントロンである、[7 7] - [1 2 3] のいずれか 1 つに記載の組成物。

[1 2 5]

保持されたイントロンは、前記 R I C m R N A 前駆体で 2 番目に豊富な保持されたイントロンである、[7 7] - [1 2 3] のいずれか 1 つに記載の組成物。

[1 2 6]

アンチセンスオリゴマーは、ホスホロチオエート結合またはホスホジアミデート結合を含む骨格修飾を含む、[7 7] - [1 2 5] のいずれか 1 つに記載の組成物。

[1 2 7]

前記アンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、[7 7] - [1 2 6] のいずれか 1 つに記載の組成物。

[1 2 8]

アンチセンスオリゴマーは、ホスホジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2' - O - メチル、2' - フルオロ、または 2' - O - メトキシエチル部分を含む、[7 7] - [1 2 7] のいずれか 1 つに記載の組成物。

[1 2 9]

アンチセンスオリゴマーは、少なくとも 1 つの修飾された糖部を含む、[7 7] - [1 2 8] のいずれか 1 つに記載の組成物。

[1 3 0]

各糖部は、修飾された糖部である、[1 2 9] に記載の組成物。

[1 3 1]

アンチセンスオリゴマーは、8 ~ 5 0 の核酸塩基、8 ~ 4 0 の核酸塩基、8 ~ 3 5 の核酸塩基、8 ~ 3 0 の核酸塩基、8 ~ 2 5 の核酸塩基、8 ~ 2 0 の核酸塩基、8 ~ 1 5 の核酸塩基、9 ~ 5 0 の核酸塩基、9 ~ 4 0 の核酸塩基、9 ~ 3 5 の核酸塩基、9 ~ 3 0 の核酸塩基、9 ~ 2 5 の核酸塩基、9 ~ 2 0 の核酸塩基、9 ~ 1 5 の核酸塩基、1 0 ~ 5 0 の核酸塩基、1 0 ~ 4 0 の核酸塩基、1 0 ~ 3 5 の核酸塩基、1 0 ~ 3 0 の核酸塩基、1 0 ~ 2 5 の核酸塩基、1 0 ~ 2 0 の核酸塩基、1 0 ~ 1 5 の核酸塩基、1 1 ~ 5 0 の核酸塩基、1 1 ~ 4 0 の核酸塩基、1 1 ~ 3 5 の核酸塩基、1 1 ~ 3 0 の核酸塩基、1 1 ~ 2 5 の核酸塩基、1 1 ~ 2 0 の核酸塩基、1 1 ~ 1 5 の核酸塩基、1 2 ~ 5 0 の核酸塩基、1 2 ~ 4 0 核酸塩基、1 2 ~ 3 5 核酸塩基、1 2 ~ 3 0 の核酸塩基、1 2 ~ 2 5 の核酸塩基、1 2 ~ 2 0 の核酸塩基、または 1 2 ~ 1 5 の核酸塩基から成る、[7 7] - [1 3 0] のいずれか 1 つに記載の組成物。

[1 3 2]

アンチセンスオリゴマーは、タンパク質をコードする R I C m R N A 前駆体の標的部分に対して、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % 相補的である、[7 7] - [1 3 1] のいずれか 1 つに記載の組成物。

[1 3 3]

[7 7] - [1 3 2] の組成物のいずれかのアンチセンスオリゴマー、および賦形剤を含む、医薬組成物。

[1 3 4]

腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または静脈内注射により [1 3 3] に記載の医薬組成物を投与することによって、被験体を処置する方法。

10

20

30

40

50

[1 3 5]

不足した CTNS、PAX2、CYP24A1 または PPARD の mRNA 転写産物の標的配列にハイブリダイズするアンチセンスオリゴマーであって、不足した CTNS、PAX2、CYP24A1 または PPARD の mRNA 転写産物が保持されたイントロンを含み、アンチセンスオリゴマーが、不足した CTNS、PAX2、CYP24A1 または PPARD の mRNA 転写産物からの保持されたイントロンのスプライシングアウトを誘発する、アンチセンスオリゴマーと、

薬学的に許容可能な賦形剤と、を含む、医薬組成物。

[1 3 6]

不足した CTNS、PAX2、CYP24A1 または PPARD の mRNA 転写産物は、CTNS、PAX2、CYP24A1 または PPARD の RIC mRNA 前駆体の転写産物である、[1 3 5] に記載の医薬組成物。

10

[1 3 7]

CTNS、PAX2、CYP24A1 または PPARD の RIC mRNA 前駆体の標的部位は、保持されたイントロンにおいて、保持されたイントロンの 5' スライス部位に対する + 500 から、保持されたイントロンの 3' スライス部位に対する - 500 の領域内にある、[1 3 5] または [1 3 6] に記載の医薬組成物。

[1 3 8]

CTNS、PAX2、CYP24A1 または PPARD の RIC mRNA 前駆体の転写産物は、SEQ ID NO : 1 - 4 のいずれか 1 つに対して、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する遺伝子配列によってコードされる、[1 3 5] または [1 3 6] に記載の医薬組成物。

20

[1 3 9]

CTNS、PAX2、CYP24A1 または PPARD の RIC mRNA 前駆体の転写産物は、SEQ ID NO : 5 - 19 のいずれか 1 つに対して、少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を備えた配列を含む、[1 3 5] または [1 3 6] に記載の医薬組成物。

[1 4 0]

アンチセンスオリゴマーは、ホスホロチオエート結合またはホスホジアミデート結合を含む骨格修飾を含む、[1 3 5] に記載の医薬組成物。

30

[1 4 1]

アンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、[1 3 5] に記載の医薬組成物。

[1 4 2]

アンチセンスオリゴマーは、ホスホジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2' - O - メチル、2' - フルオロ、または 2' - O - メトキシエチル部分を含む、[1 3 5] に記載の医薬組成物。

[1 4 3]

アンチセンスオリゴマーは、少なくとも 1 つの修飾された糖部を含む、[1 3 5] に記載の医薬組成物。

40

[1 4 4]

アンチセンスオリゴマーは、8 ~ 50 の核酸塩基、8 ~ 40 の核酸塩基、8 ~ 35 の核酸塩基、8 ~ 30 の核酸塩基、8 ~ 25 の核酸塩基、8 ~ 20 の核酸塩基、8 ~ 15 の核酸塩基、9 ~ 50 の核酸塩基、9 ~ 40 の核酸塩基、9 ~ 35 の核酸塩基、9 ~ 30 の核酸塩基、9 ~ 25 の核酸塩基、9 ~ 20 の核酸塩基、9 ~ 15 の核酸塩基、10 ~ 50 の核酸塩基、10 ~ 40 の核酸塩基、10 ~ 35 の核酸塩基、10 ~ 30 の核酸塩基、10 ~ 25 の核酸塩基、10 ~ 20 の核酸塩基、10 ~ 15 の核酸塩基、11 ~ 50 の核酸塩基、11 ~ 40 の核酸塩基、11 ~ 35 の核酸塩基、11 ~ 30 の核酸塩基、11 ~ 25 の核酸塩基、11 ~ 20 の核酸塩基、11 ~ 15 の核酸塩基、12 ~ 50 の核酸塩基、12 ~ 40 の核酸塩基、12 ~ 35 核酸塩基、12 ~ 30 核酸塩基、12 ~ 25 の核酸塩基

50

12～20の核酸塩基、または12～15の核酸塩基を含む、[135]に記載の医薬組成物。

[145]

アンチセンスオリゴマーは、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのRIC mRNA前駆体の転写産物の標的部位に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相補的である、[135]または[136]に記載の医薬組成物。

[146]

CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのRIC mRNA前駆体の転写産物の標的部位は、SEQ ID NO: 10034-10748から選択される配列内にある、[135]または[136]に記載の医薬組成物。

10

[147]

アンチセンスオリゴマーは、SEQ ID NO: 20-10733のいずれか1つに対して、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%配列同一性であるヌクレオチド配列を含む、[135]に記載の医薬組成物。

[148]

アンチセンスオリゴマーは、SEQ ID NO: 20-10733から選択されるヌクレオチド配列を含む、[135]に記載の医薬組成物。

[149]

医薬組成物は、髄腔内注射、脳室内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、皮下注射、または静脈内注射のために製剤される、[135]-[148]のいずれか1つに記載の医薬組成物。

20

[150]

CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのタンパク質の機能形態をコードする、十分に処理されたCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物を産生するために、保持されたイントロンの除去を促進する、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物の処理を誘発する方法であって、前記方法は、

(a) アンチセンスオリゴマーを被験体の標的細胞に接触させる工程と、

30

(b) アンチセンスオリゴマーを、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物にハイブリダイズする工程であって、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物が、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのタンパク質の機能形態をコードすることができ、少なくとも1つの保持されたイントロンを含む、工程と、

(c) CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのタンパク質の機能形態をコードする、十分に処理されたCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物を産生するために、少なくとも1つの保持されたイントロンをCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物から除去する工程と、

(d) 十分に処理されたCTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物から、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのタンパク質の機能形態を翻訳する工程と、を含む、方法。

40

[151]

保持されたイントロンは、保持されたイントロン全体である、[150]に記載の方法。

[152]

CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのmRNA転写産物は、CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのRIC mRNA前駆体の転写産物である、[150]または[151]に記載の方法。

[153]

CTNS、PAX2、CYP24A1またはPPARDのタンパク質の量または活性の

50

不足によって引き起こされた疾患有する被験体を処置する方法であって、SEQ ID NO: 20-10733のいずれか1つに対して、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有するスクレオチド配列を含むアンチセンスオリゴマーを被験体に投与する工程を含む、方法。

【0274】

実施例

本発明は、以下の実施例によってより具体的に例示されるだろう。しかしながら、本発明がどんな方法でもこれらの実施例によって制限されていないことが理解されるべきである。

【0275】

実施例1：次世代配列決定を用いたRNAseqによる転写産物のイントロン保持事象の特定

イントロン保持事象を特定するために本明細書で記載された遺伝子によって生成された転写産物のスナップショットを明らかにするために、次世代配列決定を使用して、全トランスクリプトームのショットガン配列決定を実行した。このために、腎上皮細胞の核および細胞質の分画からのpolyA+ RNAを分離し、 IlluminaのTruSeq Stranded mRNAライプラリPrepキットを用いてcDNAライプラリを構築した。ライプラリを対末端配列決定(pair-end sequenced)し、結果として、ヒトゲノム(2009年2月、GRCh37/hg19アセンブリ)にマッピングされた100スクレオチドの読み取りをもたらした。マッピングされた読み取りは(UCSC Genome Informatics Group (Center for Biomolecular Science & Engineering, University of California, Santa Cruz, 1156 High Street, Santa Cruz, CA 95064)によって操作され、かつ、例えばRosenblom, et al., 2015, "The UCSC Genome Browser database: 2015 update," Nucleic Acids Research 43, Database Issue doi: 10.1093/nar/gku1177に記載された)UCSCゲノムブラウザを使用して視覚化され、読み取りの範囲および数はピーク信号によって推論される。ピークの高さは、特定の領域における読取密度によって与えられた発現のレベルを示している。ピークをエクソン領域およびイントロン領域に一致させられるように、(読み取りシグナルの下に)UCSCゲノムブラウザによってP遺伝子の模式図(縮尺通りに描かれている)が提供される。このディスプレイに基づいて、腎上皮細胞の核分画において高い読み取り密度を有するが、これらの細胞の細胞質分画においては読み取りが非常に低いかまたは全くないイントロンを特定した(本明細書に記載の遺伝子において特定されたイントロンについてのイントロン保持率(PIR)データについては表1を参照)。これは、これらのイントロンが保持されたこと、および、イントロン含有転写産物が核内に残っていることを示し、かつ、この保持されたRIC mRNA前駆体が、細胞質に排出されないので、非生産的であることを示唆している。

【0276】

実施例2：未だ特定されていない保持されたイントロンのための次世代配列決定を用いたRNAseqによる遺伝子転写産物でのイントロン保持事象の特定

未知のイントロン保持事象を特定するために、本明細書に記載された遺伝子によって生成された転写産物のスナップショットを明らかにするために、次世代配列決定を使用して、全トランスクリプトームのショットガン配列決定を実行した。このために、腎上皮細胞の核および細胞質の分画からのpolyA+ RNAを分離し、 IlluminaのTruSeq Stranded mRNAライプラリPrepキットを用いてcDNAライプラリを構築した。ライプラリを対末端配列決定(pair-end sequenced)し、結果として、ヒトゲノム(2009年2月、GRCh37/hg19アセンブリ)にマッピングされた100スクレオチドの読み取りがもたらされた。マッピングされた読み

10

20

30

30

40

50

取りは (UCSC Genome Informatics Group (Center for Biomolecular Science & Engineering, University of California, Santa Cruz, 1156 High Street, Santa Cruz, CA 95064) によって操作され、かつ、例えば Rosenblom, et al., 2015, "The UCSC Genome Browser database: 2015 update," Nucleic Acids Research 43, Database Issue doi: 10.1093/nar/gku1177 に記載された) UCSCゲノムブラウザを使用して視覚化され、読み取りの範囲および数はピーク信号によって推論されうる。ピークの高さは、特定の領域における読み取り密度によって与えられた発現のレベルを示している。ピークをエクソン領域およびインtron領域に一致させられるように、(読み取りシグナルの下に) UCSCゲノムブラウザによって遺伝子の模式図(縮尺通りに描かれている)が提供される。このディスプレイに基づいて、保持されたインtronは、腎臓の上皮細胞の核分画においては高い読み取り密度を有するが、これらの細胞の細胞質分画においては読み取りが非常に低いかまたは無いものとして推論された。これは、インtronが保持されたこと、および、インtron含有転写産物が核内に残ったことを示し、かつ、これらの保持された R I C m R N A 前駆体が、細胞質に排出されないので、非生産的であることを示唆している。

【0277】

実施例 3：保持されたインtronを標的とする ASO ウォークの設計

ASO ウォークは、本明細書に記述された方法を使用して、保持されたインtronを標的とするように設計された。例えばヌクレオチド + 6 から + 69 に及ぶインtron 5' スプライス部位のすぐ下流の領域と、例えばインtron のヌクレオチド - 16 から - 79 に及ぶインtron 3' スプライス部位のすぐ上流の領域とが 2' - O - Me RNA、PS 骨格、5' ヌクレオチド間隔でシフトした 18mer ASO で標的とされた。表 1 は、設計された例示的な ASO およびそれらの標的配列を列挙する。

【0278】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1

遺伝子 SEQ ID NO.	遺伝子 記号	mRNA 前駆体 (RNA 受入番号) SEQ ID NO.	ASOs SEQ ID NOs	保持された イントロン (保持%)	標的配列 SEQ ID NO.
PPARD SEQ ID NO. 1	5467	PPARD:NM_006238 SEQ ID NO. 5	20-276	イントロン 3	10736
			277-519	イントロン 4	10747
			520-772	イントロン 5	10739
			773-931	イントロン 6	10743
			932-1622	イントロン 7	10742
		PPARD:NM_177435 SEQ ID NO. 6	1623-1879	イントロン 3	10736
			1880-2122	イントロン 4	10747
			2123-2374	イントロン 5	10739
			2375-2655	イントロン 6	10737
		PPARD:NM_001171818 SEQ ID NO. 7	2656-3346	イントロン 8	10742
			3347-3603	イントロン 4	10736
			3604-3846	イントロン 5	10747
			3847-4098	イントロン 6	10739
			4099-4258	イントロン 7	10743
		PPARD:NM_001171819 SEQ ID NO. 8	5259-4488	イントロン 2	10735
			4489-4731	イントロン 3	10747
			4732-4983	イントロン 4	10739
			4984-5143	イントロン 5	10743
			5144-5834	イントロン 6	10742
		PPARD:NM_001171820 SEQ ID NO. 9	5835-6101	イントロン 3	10744
			6102-6261	イントロン 4	10743
			6262-6952	イントロン 5	10742
PAX2 SEQ ID NO. 2	5076	PAX2:NM_001304569 SEQ ID NO. 10	6953-7173	イントロン 2	10738
		PAX2:NM_000278 SEQ ID NO. 11	7174-7463	イントロン 1	10740

10

20

30

40

【0279】

50

【表 1 - 2】

		PAX2:NM_003990 SEQ ID NO. 12	7464-7753	イントロン 1 (N/A)	10740
		PAX2:NM_003988 SEQ ID NO. 13	7754-8043	イントロン 1	10740
		PAX2:NM_003987 SEQ ID NO. 14	8044-8333	イントロン 1	10740
		PAX2:NM_003989 SEQ ID NO. 15	8334-8623	イントロン 1	10740
CTNS SEQ ID NO. 3	1497	CTNS:NM_004937 SEQ ID NO. 16	8624-8846	イントロン 9 (10%)	10748
			8847-9071	イントロン 10	10734
		CTNS:NM_001031681 SEQ ID NO. 17	9072-9294	イントロン 9 (10%)	10748
			9295-9519	イントロン 10	10734
CYP24A1 SEQ ID NO. 4	1591	CYP24A1:NM_000782 SEQ ID NO. 18	9520-9595	イントロン 10 (23%)	10746
			9596-10068	イントロン 11 (50%)	10745
		CYP24A1:NM_001128915 SEQ ID NO. 19	10069-10260	イントロン 9	10741
			10261-10733	イントロン 10	10745

【0280】

実施例 4 : 保持されたイントロンの A S O 標的化による改善したスプライシング効率は C T N S 転写レベルを增加させる

A S O を使用して保持されたイントロンのスプライシング効率を改善することにより、C T N S の発現の増加を達成しうるかどうかを判定するために、本明細書に記述された方法が使用されうる。A R P E - 19 細胞は、独立して R N A i M A X (I n v i t r o g e n) 送達試薬を使用し、偽トランスフェクト (m o c k - t r a n s f e c t) され、または、C T N S 標的化 A S O で、または非標的化 A S O 対照で、トランスフェクトされた。実験は 8 0 n M A S O を使用して 2 4 時間行なわれた (図 3 B および C) 。 T a q m a n q P C R の結果は、いくつかの標的化 A S O が偽トランスフェクトされたものと比較して C T N S 遺伝子転写レベルを増加させることを示した。C T N S 標的化 A S O トランスフェクト細胞からの C t 値を R P L 3 2 に対して正規化し、偽処理細胞からの正規化 q P C R 産物と比較してプロットする。この分析の結果は、いくつかの C T N S 標的化 A S O が遺伝子転写レベルを増加させることを示した。これらの結果は、A S O を用いる遺伝子中の保持されたイントロンのスプライシングの誘導が、遺伝子発現の増加をもたらすことを示す。全体的に、これらの結果は、A S O を用いる C T N S 遺伝子中の律速イントロンのスプライシング効率を改善すると、C T N S 遺伝子発現が増加することを示している。

【0281】

実施例 5 : 保持されたイントロンの A S O 標的化による改善したスプライシング効率は C Y P 2 4 A 1 転写レベルを増加させる

A S O を使用して保持されたイントロンのスプライシング効率を改善することにより、C Y P 2 4 A 1 の発現の増加を達成しうるかどうかを判定するために、本明細書に記述され

10

20

30

40

50

た方法が使用されうる。ARPE-19細胞は、独立してRNAiMAX (Invitrogen)送達試薬を使用し、偽トランスフェクト (mock-transfect) され、または、CYP24A1標的化ASOまたは非標的化ASO対照でトランスフェクトされた。実験は80nM ASOを使用して24時間行なわれた(図4BおよびC)。

Taqman qPCRの結果は、いくつかの標的化ASOが偽トランスフェクトされたものと比較してCYP24A1遺伝子転写レベルを増加させることを示した。CYP24A1標的化ASOトランスフェクト細胞からのCt値をRPL32に対して正規化し、偽処理細胞からの正規化qPCR産物と比較してプロットする。この分析の結果は、いくつかのCYP24A1標的化ASOが遺伝子転写レベルを増加させることを示した。これらの結果は、ASOを用いる遺伝子中の保持されたイントロンのスプライシングの誘導が、遺伝子発現の増加をもたらすことを示す。全体的に、これらの結果は、ASOを用いるCYP24A1遺伝子中の律速イントロンのスプライシング効率を改善すると、CYP24A1遺伝子発現が増加することを示している。

【0282】

実施例6：保持されたイントロンのASO標的化による改善したスプライシング効率はPPARD転写レベルを増加させる

ASOを使用して保持されたイントロンのスプライシング効率を改善することにより、PPARDの発現の増加を達成しうるかどうかを判定するために、本明細書に記述された方法が使用されうる。ARPE-19細胞は、独立してRNAiMAX (Invitrogen)送達試薬を使用し、偽トランスフェクト (mock-transfect) され、または、PPARD標的化ASOまたは非標的化ASO対照でトランスフェクトされた。実験は80nM ASOを使用して24時間行なわれた(図6AおよびB、図6EおよびF)。Taqman qPCRの結果は、いくつかの標的化ASOが偽トランスフェクトされたものと比較してPPARD遺伝子転写レベルを増加させることを示した。PPARD標的化ASOトランスフェクト細胞からのCt値をRPL32に対して正規化し、偽処理細胞からの正規化qPCR産物と比較してプロットする。この分析の結果は、いくつかのPPARD標的化ASOが遺伝子転写レベルを増加させることを示した。これらの結果は、ASOを用いる遺伝子中の保持されたイントロンのスプライシングの誘導が、遺伝子発現の増加をもたらすことを示す。全体的に、これらの結果は、ASOを用いるPPARD遺伝子中の律速イントロンのスプライシング効率を改善すると、PPARD遺伝子発現が増加することを示している。

【0283】

実施例7：保持されたイントロンのASO標的化による改善したスプライシング効率は転写レベルを増加させる

ASOでのイントロンスプライシング効率の改善により標的遺伝子の発現の増加を達成しうるかどうかを判定するために、本明細書に記述された方法を使用した。ARPE-19細胞、すなわちヒトの網膜の上皮細胞株 (American Type Culture Collection (ATCC), USA)、またはHuH-7、すなわちヒトの肝細胞腫細胞株 (NIBIOHN, Japan)、またはSK-N-AS、すなわちヒトの神経芽細胞腫細胞株 (ATCC) は、図3-6および表1に記載の標的化ASOで、偽トランスフェクトされるか、またはトランスフェクトされる。細胞を、供給元の仕様書に従って、Lipofectamine RNAiMaxトランスフェクション試薬 (Thermo Fisher) を用いてトランスフェクトする。簡潔に述べると、ASOを96ウェル組織培養プレートに播種し、Opti-MEMで希釀したRNAiMaxと組み合わせる。トリプシンを用いて細胞を剥離し、完全培地に再懸濁し、約25,000個の細胞をASOトランスフェクション混合物に加える。トランスフェクション実験は三通りのプレート複製において実行される。最終的なASO濃度は80nMであった。供給元の仕様書に従って、培地をトランスフェクションの6時間後に交換し、細胞をCells-to-Ct溶解試薬を用い、DNase (Thermo Fisher) で試薬を補充し、24時間で採取する。供給元の仕様書に従い、cDNAをCells-to-Ct

10

20

30

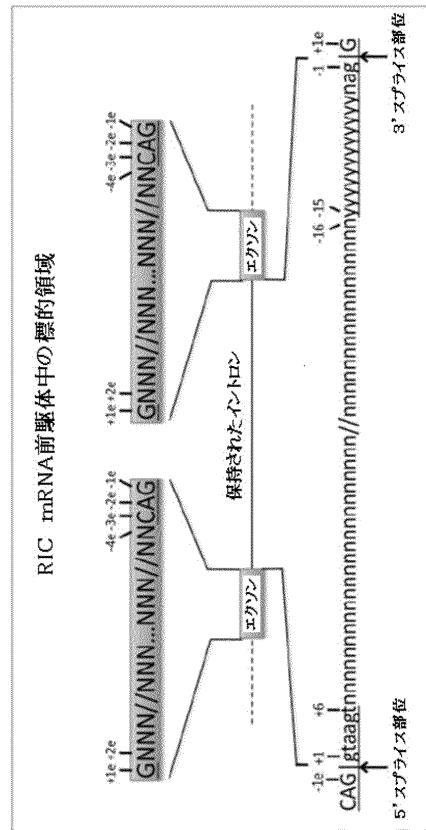
40

50

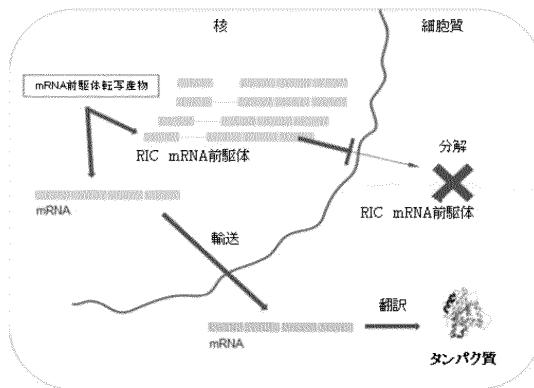
RT試薬(Thermo Fisher)で生成される。対象のイントロンでのスプライシングの量を定量化するために、表1に列挙した、保持されたイントロンの対応するエクソン・エクソンジャンクション(Thermo Fisher)に及ぶプローブでTaq manアッセイを用いて、定量PCRが実行される。Taq manアッセイは、Quant Studio 7Flex Real-Time PCRシステム(Thermo Fisher)上で、供給元の仕様書に従い実行される。標的遺伝子アッセイ値を、RPL32(delta Ct)およびプレート一致偽トランスクレクションサンプル(delta Ct - delta Ct)に対して正規化し、モック定量($2^{(\Delta - \Delta Ct)}$)に対する平均倍率変化をプロットする(図3C、図4C、図6Bおよび図6F)。標的遺伝子発現を増加させるいくつかのASOが特定され、その標的イントロンでのスプライシングの増加が示唆された。標的イントロン(図3-6)の保持を示す全トランスクリプトームデータと共に、これらの結果は、ASOが律速イントロンのスプライシング効率を改善し得ることを確認する。

【図面】

【図1】



【図2A】



10

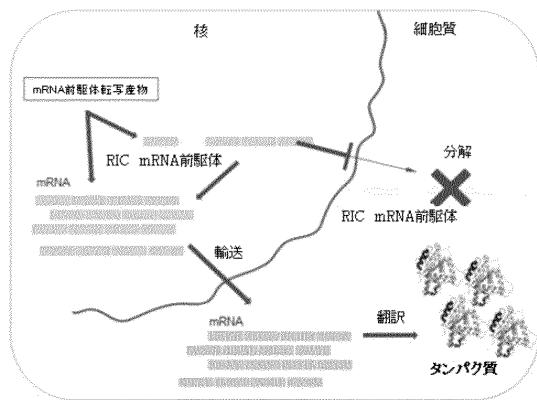
20

30

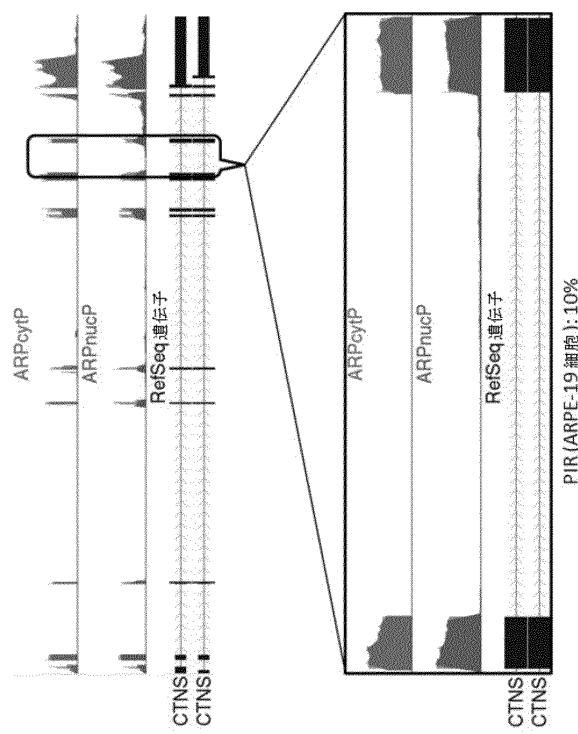
40

50

【図 2 B】



【図 3 A】



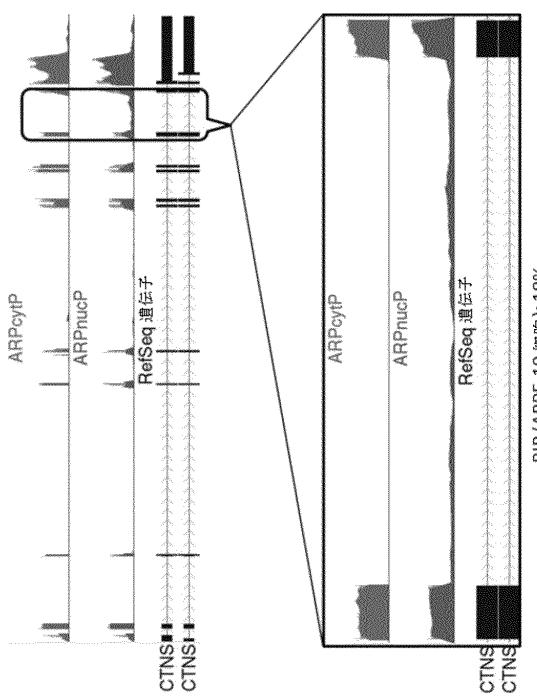
10

20

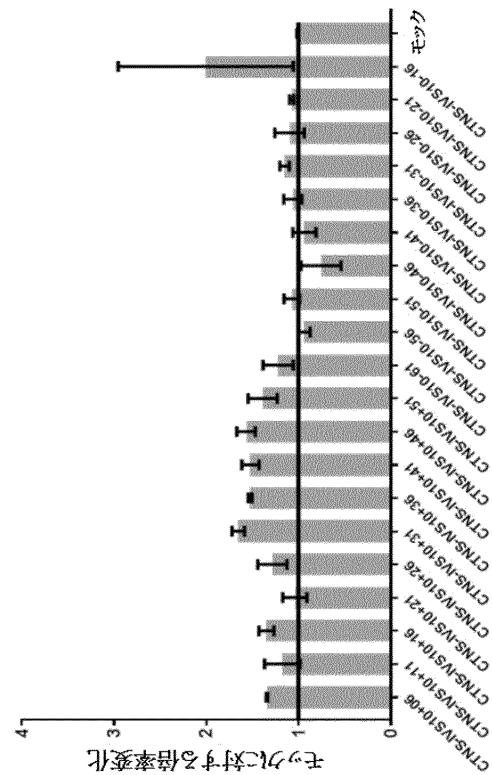
30

40

【図 3 B】

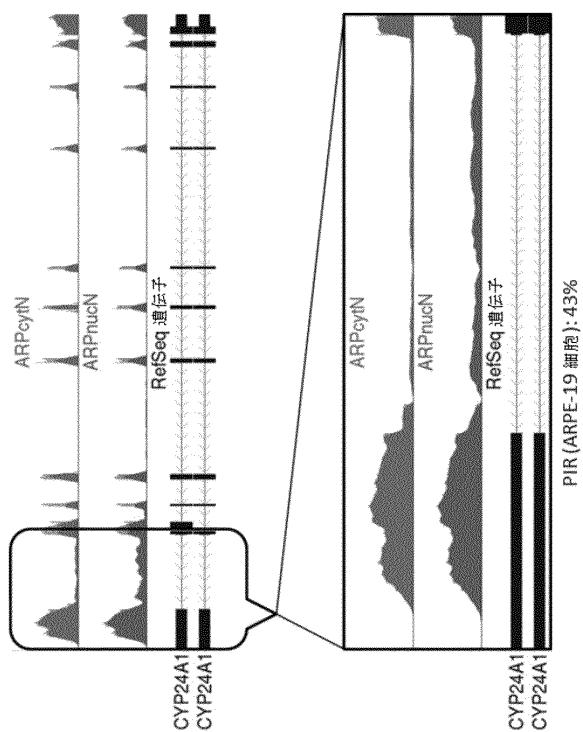


【図 3 C】

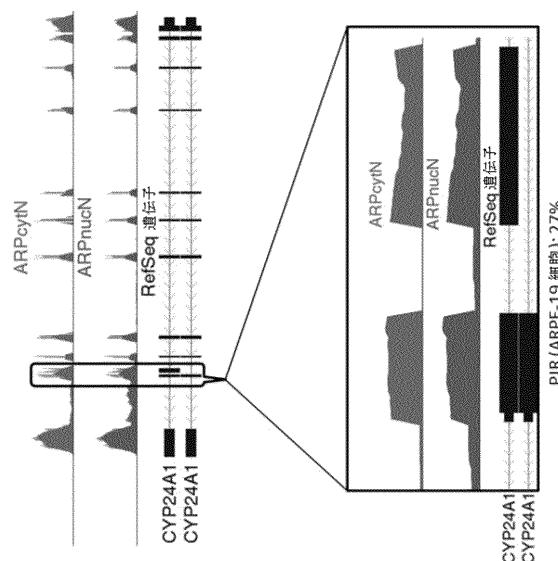


50

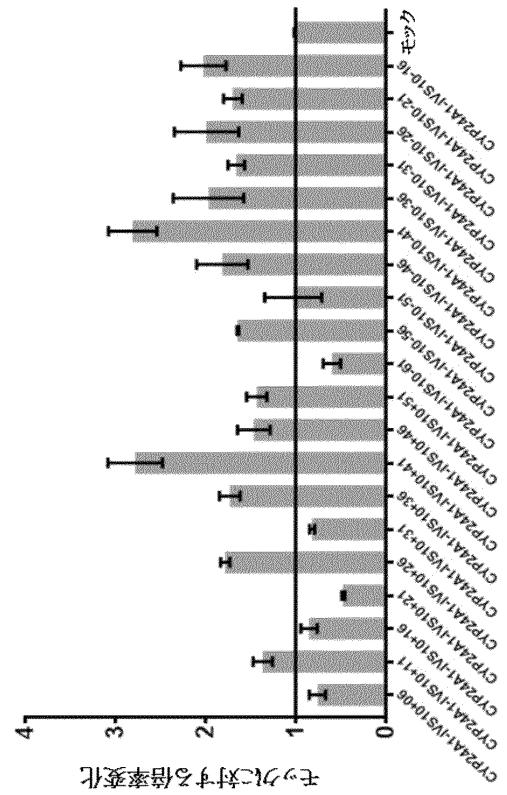
【図4A】



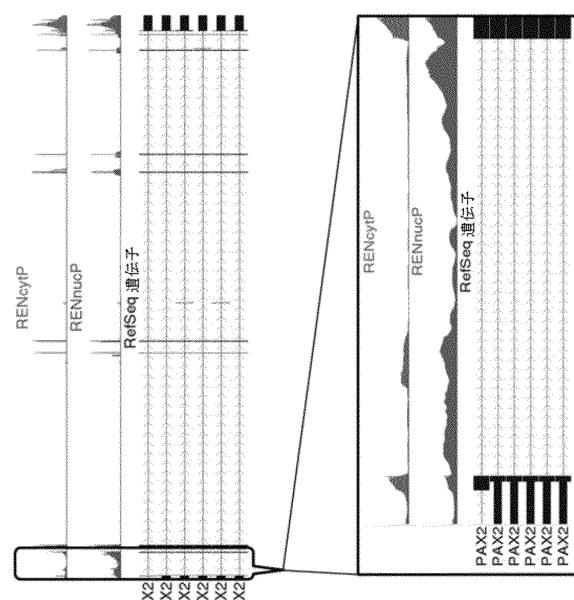
【図4B】



【図4C】



【図5】



10

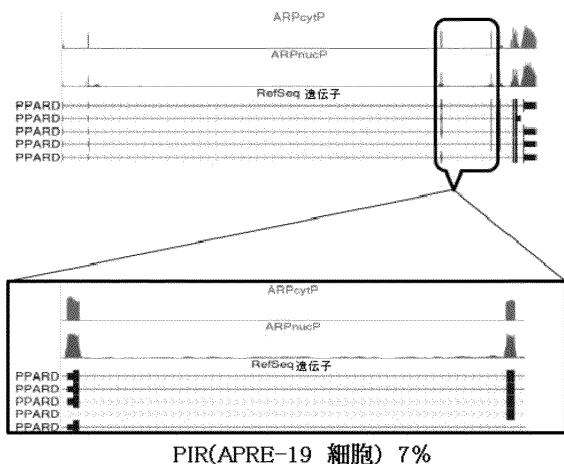
20

30

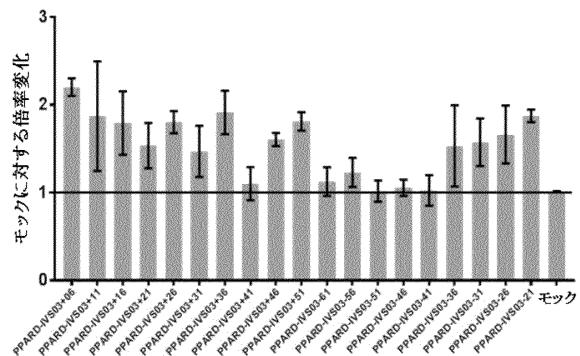
40

50

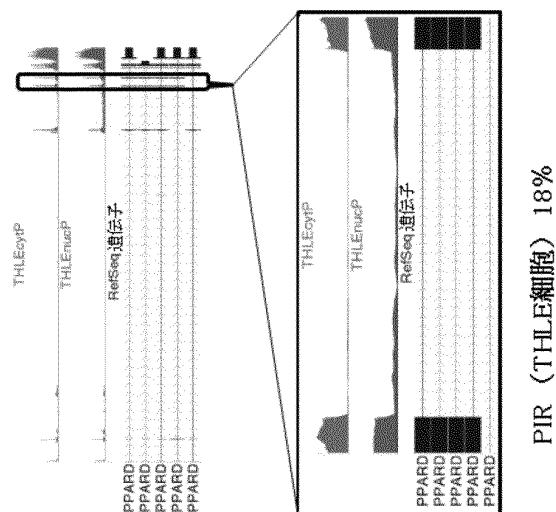
【図 6 A】



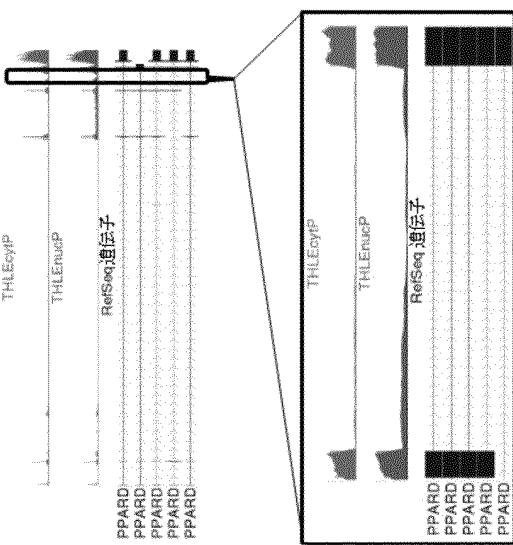
【図6B】



【図 6 C】



【図6D】



PIR (TH1E細胞) 12%

10

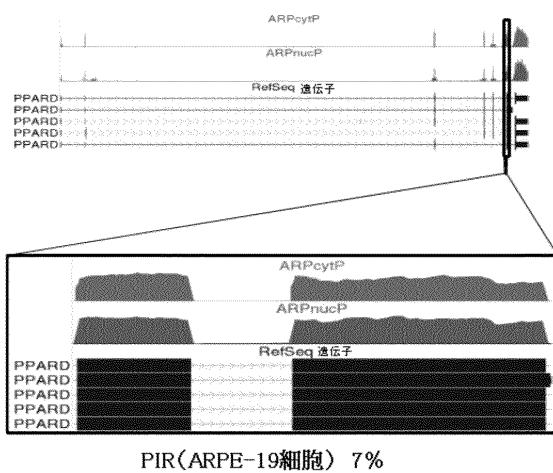
20

30

40

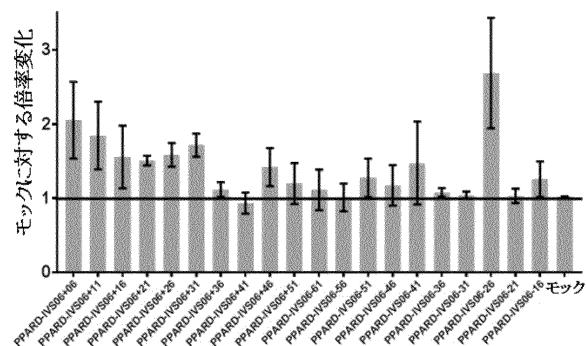
50

【図 6 E】



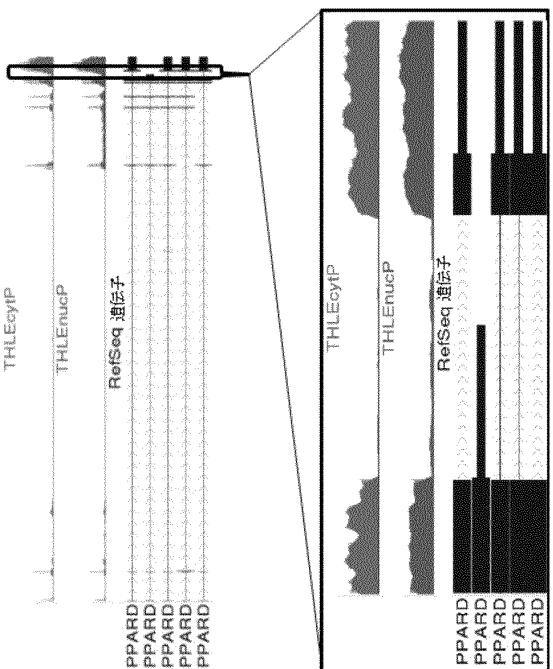
PIR(ARPE-19細胞) 7%

【図 6 F】



10

【図 6 G】



20

30

【配列表】

0007049247000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I
A 6 1 P	13/12 (2006.01)
A 6 1 K	9/08 (2006.01)
A 6 1 K	9/10 (2006.01)
A 6 1 K	45/00 (2006.01)
A 6 1 P	13/12
A 6 1 K	9/08
A 6 1 K	9/10
A 6 1 K	45/00

(74)代理人 100122644

弁理士 寺地 拓己

(72)発明者 アズナレズ, イザベル

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ マガジン・ストリート 55 アパートメント 12エー

(72)発明者 ナッシュ, ヒュー エム.

アメリカ合衆国 0 2 4 2 1 マサチューセッツ州 レキシントン ワシントン・ストリート 4

(72)発明者 クライナー, エイドリアン

アメリカ合衆国 1 1 7 3 1 ニューヨーク州 イースト・ノースポート デイリー・ロード 2 5 6

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 米国特許出願公開第2 0 1 4 / 0 1 2 8 4 4 9 (U S , A 1)

PNAS, 1996年, Vol.93, pp.12840-12844

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

A 6 1 K 3 1 / 7 0 8 8 - 3 1 / 7 1 3
A 6 1 K 4 8 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 1 1 3
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)