

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2025-507279  
(P2025-507279A)

(43)公表日 令和7年3月18日(2025.3.18)

|                   |                                     |         |         |                        |                   |
|-------------------|-------------------------------------|---------|---------|------------------------|-------------------|
| (51)国際特許分類        |                                     | F I     |         | テーマコード (参考)            |                   |
| C 1 2 N           | 15/113 (2010.01)                    | C 1 2 N | 15/113  | Z Z N A                | 4 B 0 6 5         |
| C 1 2 N           | 15/63 (2006.01)                     | C 1 2 N | 15/63   | Z                      | 4 C 0 8 6         |
| C 1 2 N           | 1/15 (2006.01)                      | C 1 2 N | 1/15    |                        |                   |
| C 1 2 N           | 1/19 (2006.01)                      | C 1 2 N | 1/19    |                        |                   |
| C 1 2 N           | 1/21 (2006.01)                      | C 1 2 N | 1/21    |                        |                   |
|                   |                                     | 審査請求    | 未請求     | 予備審査請求                 | 未請求 (全54頁) 最終頁に続く |
| (21)出願番号          | 特願2024-545792(P2024-545792)         |         | (71)出願人 | 523209564              |                   |
| (86)(22)出願日       | 令和5年2月2日(2023.2.2)                  |         |         | ペロン インスティテュート フォー ニ    |                   |
| (85)翻訳文提出日        | 令和6年9月27日(2024.9.27)                |         |         | ューロロジカル アンド トランスレーシ    |                   |
| (86)国際出願番号        | PCT/AU2023/050067                   |         |         | ヨナル サイエンス リミテッド        |                   |
| (87)国際公開番号        | WO2023/147630                       |         |         | オーストラリア国 6 0 0 9 ウエスタン |                   |
| (87)国際公開日         | 令和5年8月10日(2023.8.10)                |         |         | オーストラリア, ネッドランズ, ヴァ    |                   |
| (31)優先権主張番号       | 2022900200                          |         |         | ーダン ストリート 8, キューイート    |                   |
| (32)優先日           | 令和4年2月2日(2022.2.2)                  |         |         | ウー メディカル センター, アールア    |                   |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | オーストラリア(AU)                         |         |         | ール ブロック, グラウンド フロア     |                   |
| (81)指定国・地域        | AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ       |         | (74)代理人 | 100078282              |                   |
|                   | ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),    |         |         | 弁理士 山本 秀策              |                   |
|                   | EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(     |         | (74)代理人 | 100113413              |                   |
|                   | AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,   |         |         | 弁理士 森下 夏樹              |                   |
|                   | FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV |         | (74)代理人 | 100181674              |                   |
|                   | 最終頁に続く                              |         |         | 弁理士 飯田 貴敏              |                   |
|                   |                                     |         |         | 最終頁に続く                 |                   |

(54)【発明の名称】 病原性 F U S バリエントに関連する疾患を処置するための組成物および方法

(57)【要約】  
本発明は、タンパク質 F U S、またはそのバリエントをコードする F U S 遺伝子の選択された対立遺伝子の発現を低減させるのに使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドの分野に関する。本発明はまた、F U S、またはそのバリエントを標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチド、および A O N を含む治療用組成物の投与によって、病原性 F U S の遺伝的バリエントに関連する疾患の作用を処置するための医薬組成物、および方法も提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

F U S プレ m R N A または m R N A をコードする核酸分子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、  
前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、

a . 配列番号 1 ～配列番号 3 4 またはそのバリエーションからなるリストから選択される核酸塩基配列；または

b . 配列番号 1 ～配列番号 3 4 またはそのバリエーションが同様に結合する標的 F U S プレ m R N A または m R N A 中の少なくとも 1 つまたは複数の連続する核酸塩基に相補的である核酸塩基配列

10

を有し、

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、F U S 遺伝子またはその F U S 遺伝子バリエーションの少なくとも 1 つの対立遺伝子の発現を阻害し、

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、実質的に単離または精製されている、アンチセンスオリゴヌクレオチド。

**【請求項 2】**

前記対立遺伝子が、前記 F U S 遺伝子の病原性バリエーションを含む、請求項 1 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

**【請求項 3】**

前記病原性バリエーションが、疾患に対する対象の感受性または素因を増加させる遺伝子変化である、請求項 2 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

20

**【請求項 4】**

前記疾患が、A L S、F T D、E T からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記疾患が、A L S または F T D からなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記疾患が、F U S - A L S または F U S - F T D からなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

F U S 上のエクソン 3、エクソン 4 または 3' U T R 内に含まれる転写物の領域に結合する、前記請求項のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

30

**【請求項 8】**

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、C V ( r s 7 4 1 8 1 0 )、C V 2 ( r s 1 0 5 2 3 5 2 )、または C V 3 ( r s 4 8 8 9 5 3 7 ) を含む前記転写物の領域に結合する、請求項 7 に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

**【請求項 9】**

F U S またはその F U S バリエーションの前記プレ m R N A および／または m R N A の 1 つの対立遺伝子の発現を選択的にノックダウンし、その一方で、実質的な量のタンパク質を産生するのに十分な正常 m R N A を存在させたままにする、前記請求項のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

40

**【請求項 10】**

前記 F U S プレ m R N A および／または F U S m R N A の R N アーゼ H によって媒介される分解を誘導する、前記請求項のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

**【請求項 11】**

チオホスホルアミデートモルホリノオリゴマー ( T M O ) キメラである、前記請求項のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

**【請求項 12】**

前記チオホスホルアミデートモルホリノオリゴマー ( T M O ) キメラが、T M O および

50

ホスホロチオエートDNAまたはDNAサブユニットを含むギャップマー設計を有する、請求項11に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項13】

ペプチド-チオホスホリアルアミデートモルホリノオリゴマー（TMO）キメラコンジュゲートである、請求項11または12に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項14】

配列番号1～12からなるリストから選択される、前記請求項のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項15】

配列番号2、4、5、8、または11である、請求項14に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項16】

FUSブレRNAおよびmRNAの選択された対立遺伝子の選択的なノックダウンを誘導する方法であって、

a) 請求項1～15のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの1つまたは複数を提供するステップ；および

b) 前記オリゴマー（複数可）を、標的核酸部位に結合させるステップを含む、方法。

【請求項17】

FUS遺伝子の病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための組成物であって、

a) 1種または複数の請求項1～15のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド；および

b) 1種または複数の治療的に許容できる担体および／または希釈剤を含む、組成物。

【請求項18】

FUS遺伝子の病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための医薬組成物であって、

a) 1種または複数の請求項1～15のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド；ならびに

b) 1種または複数の医薬的に許容される担体および／または希釈剤を含む、医薬組成物。

【請求項19】

FUS遺伝子の病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和する方法であって、有効量の請求項18に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項20】

前記病原性バリエーションが、前記疾患に対する前記対象の感受性または素因を増加させる遺伝子変化である、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記疾患が、ALS、FTDまたはETからなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記疾患が、ALSまたはFTDからなる群から選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記疾患が、FUS-ALSまたはFUS-FTDからなる群から選択される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

バイオマーカーによって同定された患者における、FUS遺伝子における病原性バリエーション

10

20

30

40

50

ントに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための方法であって、

a) 患者がFUS抑制に応答する可能性がある、FUSタンパク質症に関連する疾患に関連するバイオマーカーの存在に関して、対象を試験するステップ；および

b) 前記対象が前記バイオマーカーを発現することが見出される場合、有効量の請求項18のいずれか一項に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項25】

前記疾患が、ALSまたはFTDからなる群から選択される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記バイオマーカーが、前記FUS遺伝子の病原性バリエーションである、請求項24に記載の方法。

【請求項27】

対象における選択されたFUS対立遺伝子の発現を低減させる方法、および／または対象における自己調節によって引き起こされるFUSの過剰発現を低減させる方法であって、有効量の請求項18に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項28】

(1) 対象における選択されたFUS対立遺伝子の発現を低減させる方法；および／または

(2) 対象における自己調節によって引き起こされるFUSの過剰発現を低減させる方法であって、

(a) 1種または複数の請求項1～15のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド；

(b) 1種または複数の医薬的に許容される担体および／または希釈剤を含む医薬組成物の有効量を前記対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項29】

1種または複数の請求項1～15のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項30】

請求項1～15のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む細胞。

【請求項31】

FUS遺伝子の病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための医薬を製造するための、請求項1～15のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項32】

前記FUS遺伝子の病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための、請求項1～15のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項33】

前記疾患が、ALSまたはFTDからなる群から選択される、請求項31または32に記載の使用。

【請求項34】

対象における病原性FUSバリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するためのキットであって、その使用のための指示と共に、好適な容器中に詰められた、少なくとも請求項1～15のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

## 【0001】

## 技術分野

本発明は、FUS RNA結合タンパク質（肉腫融合（Fused in Sarcoma）としても公知）をコードするFUS遺伝子の発現を低減させるアンチセンスオリゴヌクレオチド（AON）に関する。本発明は、神経変性疾患に関連する病原性変種を含むFUSの発現を低減させるために、AONの投与によってFUS転写物の特定の対立遺伝子の発現を選択的に低減させる方法を提供する。

## 【背景技術】

## 【0002】

## 背景技術

以下の背景技術の議論は、単に本発明の理解を容易にすることが意図される。この議論は、本出願の優先日の時点で、言及された材料がいずれも一般的な常識の一部である、またはそうであったことの承認でも容認でもない。

## 【0003】

## FUS

## 【0004】

FUSは、RNA結合タンパク質のFETファミリーに属する、普遍的に発現される526アミノ酸のタンパク質をコードする。FUSは、主に正常な生理学的条件下で核に局在しているが、細胞質に移り、核細胞質間輸送において機能する。FUSは、転写、プレmRNAのスプライシング、RNA輸送および翻訳調節を含む多様な細胞プロセスで機能する。FUSはまた、DNA二本鎖切断修復中の相同組換えと非相同末端結合における相同組換えの両方を含むDNA修復メカニズムにも関与する。加えて、FUSは、様々な種類のストレスに対する細胞防御を提供するパラスペックルの形成において役割を果たす。

## 【0005】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）に罹患した個体の最大10%が、少なくとも1人の他の罹患した家族を有しており、家族性ALS（fALS）を有するとして定義される；これらの症例のほとんど全てが、常染色体優性の方式で遺伝することが見出されている。ALSの症例の残りの90~95%は、それまでに家族歴がない人で起こり、これらの個体は、孤発性ALS（sALS）を有すると言われる。FUSにおける病原性変種は、fALS症例のおよそ5%およびsALS症例の1%未満に関与する。

## 【0006】

現在、50種を超える常染色体優性FUSバリエントがALS患者において同定されている。大部分がミスセンス変異であるが、まれな場合において、挿入、欠失、スプライシングおよびナンセンス変異が報告されている。病原性バリエントの多くは、核局在化シグナル内にクラスター化され、細胞質へのFUSの再分布をもたらす。その他は、グリシンおよびアルギニンリッチな領域であるプリオン様ドメインおよび3'UTRにおいて生じる。一部の領域内のバリエントは、固体凝集体を形成するタンパク質の傾向を増加させると考えられ、これは、FUS関連ALSにおいて作動する様々な病理学的機序を示す。

## 【0007】

FUSは、このタンパク質がそれ自体のプレmRNAに結合することを含む1つのメカニズムで、エクソン7の発現を抑制するように自己調節される。エクソン7をスキップしたスプライスバリエントにおけるフレームシフトは、転写物がナンセンス媒介崩壊に供される未成熟停止コドンをもたらす。FUS-ALS（FUS-筋萎縮性側索硬化症）およびFUS-FTD（FUS-前頭側頭型認知症）において、FUSの細胞質への誤った局在化は、自己調節を損ない、過剰発現をもたらす可能性がある。

## 【0008】

細胞機能の障害はまた、スプライシング欠陥、DNA傷害を引き起こし、FUS自己調節を損なうことが報告されている病原性FUSバリエントの直接の結果でもあり得る。加えて、FUS-ALSにおける疾患の繁殖メカニズムが、そのプリオン様タンパク質ドメインによって媒介される可能性があるという指摘がある。

10

20

30

40

50

## 【0009】

機能喪失または機能獲得メカニズムがどの程度FUS-AALSにおいて疾患を引き起こすかについての議論は続いている。FUS機能喪失理論は、病的な細胞質内へのFUSの再分布が、核におけるその機能の実行を不可能にすると仮定している。マウスモデルからの証拠は、FUSの喪失は、AALSを引き起こすには不十分であることを示唆している。しかしながら、この所見は、FUSオルソログであるCabezaのノックダウンの後にニューロン変性と運動の欠陥が起こったショウジョウバエFUSノックダウンモデルを使用した場合に矛盾した。

## 【0010】

FUS-AALSにおいて作動する機能獲得メカニズムに対する強い証拠がある。野生型ヒトFUSを過剰発現するトランスジェニックマウスモデルにおいて、運動神経変性の悪性表現型と細胞質内のFUS蓄積の証拠が見出されたことが報告されている。毒性が、主としてFUS凝集体によって直接媒介されるか、または可溶性FUSの再分布後のその細胞質における増加を介して媒介されるかどうかについて、議論がなされている。また細胞質内のFUS分布も、ストレス顆粒の動態を変更する。FUSの凝集する性質は、純粋に病的というわけではなく、正常な細胞機能において重要である。FUS凝集は、可溶性の細胞質内FUSにおける潜在的に有毒な増加から細胞を保護する補償的なメカニズムであり得ることを一部が提唱している。

## 【0011】

病原性FUSバリエントは、早期発症および若年性AALSに関連しており、これは、絶え間なく進行する筋肉の萎縮および衰弱として現れ、ほとんどの場合、疾患発症後の3年未満に生存を制限する呼吸筋への作用を伴う。現在の処置選択肢は、症状の管理および呼吸補助と、それに伴う唯一の承認された薬物療法に基づくが、生存をほんの数ヶ月延長するかまたは一部の患者においてわずかな利益しか提供しない。疾患進行を遅くしたりまたは停止させたりする有効な処置はない。

## 【0012】

FUS凝集、過剰発現または細胞質内の誤った局在化によって引き起こされる毒性の機能獲得の強い証拠のために、FUSのノックダウンは、一般的に、病原性FUS変異を有する患者を処置するための許容できる治療戦略とみなされる。数人の患者が、現在フェーズ3の臨床試験(NCT04768972)が行われている処置(ION363)での救済使用を根拠にして治験のFUS標的化AONを受けた。FUSは、いくつかのDNA修復メカニズムにおいて主要な役割を果たし、他の多くの遺伝子の調節およびスプライシングに関与し、細胞性ストレスに対する防御において役割を果たすため、FUSをノックダウンすると、これらの役割を実行できなくなることにより将来的に健康上のリスクを引き起こす可能性があるという懸念がある。この理由のために、患者の病原性変種が遭遇する対立遺伝子に対して標的化され得る、あるFUS対立遺伝子を別のFUS対立遺伝子よりも選択的にノックダウンする戦略が追求されてきた。

## 【0013】

対立遺伝子の選択的なノックダウン戦略

## 【0014】

FUS-AALSは、優性疾患であり、罹患した患者の大部分が、その2つの対立遺伝子のうち一方のみに有害なバリエントを有する。これが、FUSノックダウンへのAONベースの対立遺伝子特異的なアプローチを、これらの患者を処置するための実行可能な戦略にしている。FUSは、そのタンパク質レベルで自己調節されるため、AONを利用して病原性バリエントを含有するプレmRNAおよびmRNAの発現を選択的にノックダウンし、その一方で生理学的に健康な量のタンパク質を産生するのに十分な正常mRNAが存在させたままにすることが可能であり得る。

## 【0015】

この対立遺伝子選択的な戦略は、内因性酵素RNアーゼHを利用するギャップマーベースのAON設計を使用する。RNアーゼHは、DNA/RNAヘテロ二重鎖におけるRN

10

20

30

40

50

A鎖の切断を触媒する非配列特異的なエンドヌクレアーゼである。ギャップマーは、広範囲にわたり改変可能でありRNアーゼH活性に適合させる必要がないいくつかの塩基（ウイング）に挟まれている、RNアーゼH活性に適合するDNAベースのコアからなる。ギャップマーは、対立遺伝子間で変種（variation）があるRNAの領域に直接標的化されていてもよく、変種を利用して、標的対立遺伝子への選択性をもたらす。標的対立遺伝子への選択性を増加させることができるギャップマーの数々の特性は、一般的に実験的に決定する必要がある作用を用いて改変することができる。改変としては、ギャップマーと標的RNAとの間のミスマッチの数、配置および塩基組成、ウィンドウ（ギャップ）またはウイング長さ、加えて、分子の長さおよび化学物質の変化を挙げることができる。

【0016】

10

FUS-AALSは、比較的まれであり、FUSにおける少なくとも50種の常染色体優性ALS関連変異が報告されている。多数の病原性バリエーションを考慮すると、各バリエーションは極めてまれであり、そのため、それぞれにつき対立遺伝子特異的な処置を開発することに財源を投資することは製薬会社にとって経済的に実行不可能であり、この理由のために、FUSにおける共通バリエーションが標的とされてきた。

【0017】

FUSタンパク質症

【0018】

病原性変種を含有するFUS対立遺伝子の発現を低減させることは、患者が病原性FUS変異を有する可能性があるFUS-AALSおよびFUS-FTLDまたは他の神経学的状態における場合などにおいて、FUSタンパク質症に関連する疾患の防止および処置において用途を有する。また、病原性変種を含有するFUS対立遺伝子の発現は、以下の疾患：筋萎縮性側索硬化症（ALS）、前頭側頭型認知症（FTD）および本態性振戦（ET）の防止および処置において用途を有する可能性もある。

20

【0019】

本発明は、この背景に鑑みて開発されたものである。具体的には、本発明は、病原性FUS遺伝的バリエーションに関連する疾患におけるFUSタンパク質症を緩和するための手段を提供することを目的とする。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

30

【0020】

発明の要約

本発明は、FUSをコードする核酸を標的とした化合物、具体的にはAONを対象とする。本発明の実施形態は、FUSプレmRNAまたはmRNAに結合することが可能なAONに関する。

【0021】

概して、本発明の第1の態様によれば、FUSプレmRNAまたはmRNAをコードする核酸分子を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、（a）配列番号1～配列番号34またはそのバリエーションからなるリストから選択される核酸塩基配列；または（b）配列番号1～配列番号34またはそのバリエーションが同様に結合する標的FUSプレmRNAまたはmRNA中の少なくとも1つまたは複数の連続する核酸塩基に相補的である核酸塩基配列を有し、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、FUS遺伝子またはそのFUS遺伝子バリエーションの少なくとも1つの対立遺伝子の発現を阻害し、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、実質的に単離または精製されている、アンチセンスオリゴヌクレオチドが提供される。

40

【0022】

一実施形態において、対立遺伝子は、FUS遺伝子の病原性バリエーションを含む。別の実施形態において、病原性バリエーションは、疾患に対する対象の感受性または素因を増加させる遺伝子変化である。

【0023】

50

別の実施形態において、疾患は、ALS、FTD、ETからなる群から選択される。好ましくは、疾患は、ALSまたはFTDからなる群から選択される。好ましくは、疾患は、FUS-ALSまたはFUS-FTDからなる群から選択される。

【0024】

別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、FUS上のエクソン3、エクソン4または3'UTR内に含まれる転写物の領域に結合する。好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、CV(rs741810)、CV2(rs1052352)、またはCV3(rs4889537)を含む転写物の領域に結合する。

【0025】

別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、FUSまたはそのFUSバリエーションのpre-mRNAおよび／またはmRNAの1つの対立遺伝子の発現を選択的にノックダウンし、その一方で、実質的な量のタンパク質を産生するのに十分な正常mRNAを存在させたままにする。

【0026】

別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、FUS pre-mRNAおよび／またはFUS mRNAのRNアーゼHによって媒介される分解を誘導する。

【0027】

別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、チオホスホラミデートモルホリノオリゴマー(TMO)キメラである。

【0028】

別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、TMOおよびホスホロチオエートDNAまたはDNAサブユニットを含むギャップマー設計を有するチオホスホラミデートモルホリノオリゴマー(TMO)キメラである。

【0029】

別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、ペプチド-チオホスホラミデートモルホリノオリゴマー(TMO)キメラコンジュゲートである。

【0030】

別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、配列番号1~12からなるリストから選択される。好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号2、4、5、8、または11である。

【0031】

本発明の別の態様によれば、FUS pre-mRNAおよびmRNAの選択された対立遺伝子の選択的なノックダウンを誘導する方法であって、(a)請求項1~14のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの1つまたは複数を提供するステップ；および(b)オリゴマー(複数可)を、標的核酸部位に結合させるステップを含む、方法が提供される。

【0032】

本発明の別の態様によれば、FUS遺伝子の病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための組成物であって、(a)本発明の第1の態様による1種または複数のアンチセンスオリゴヌクレオチド；ならびに(b)1種または複数の治療的に許容できる担体および／または希釈剤を含む組成物が提供される。

【0033】

本発明の別の態様によれば、FUS遺伝子の病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための医薬組成物であって、(a)本発明の第1の態様の1種または複数のアンチセンスオリゴヌクレオチド；ならびに(b)1種または複数の医薬的に許容される担体および／または希釈剤を含む、医薬組成物が提供される。

【0034】

本発明の別の態様によれば、FUS遺伝子の病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和する方法であって、有効量の本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法が提供される。

10

20

30

40

50

## 【0035】

一実施形態において、病原性バリエーションは、疾患に対する対象の感受性または素因を増加させる遺伝子変化である。別の実施形態において、疾患は、ALS、FTDまたはETからなる群から選択される。好ましくは、疾患は、ALSまたはFTDからなる群から選択される。好ましくは、疾患は、FUS-ALSまたはFUS-FTDからなる群から選択される。

## 【0036】

本発明の別の態様によれば、バイオマーカーによって同定された患者における、FUS遺伝子における病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための方法であって、(a) 患者がFUS抑制に応答する可能性がある、FUSタンパク質症に関連する疾患に関連するバイオマーカーの存在に関して、対象を試験するステップ；および(b) 対象がバイオマーカーを発現することが見出される場合、有効量の本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法が提供される。好ましくは、疾患は、ALSまたはFTDからなる群から選択される。好ましくは、バイオマーカーは、FUS遺伝子の病原性バリエーションである。

10

## 【0037】

本発明の別の態様によれば、対象における選択されたFUS対立遺伝子の発現を低減させる方法、および／または対象における自己調節によって引き起こされるFUSの過剰発現を低減させる方法であって、有効量の本発明の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法が提供される。

20

## 【0038】

本発明の別の態様によれば、(a) 対象における選択されたFUS対立遺伝子の発現を低減させる方法；および／または(b) 対象における自己調節によって引き起こされるFUSの過剰発現を低減させる方法であって、本発明の第1の態様による1種または複数のアンチセンスオリゴヌクレオチド；ならびに1種または複数の医薬的に許容される担体および／または希釈剤を含む医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む、方法が提供される。

## 【0039】

本発明の別の態様によれば、この発明の第1の態様による1種または複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む発現ベクターが提供される。

30

## 【0040】

本発明の別の態様によれば、この発明の第1の態様によるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む細胞が提供される。

## 【0041】

本発明の別の態様によれば、FUS遺伝子の病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための医薬を製造するための、この発明の第1の態様によるアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用が提供される。

## 【0042】

本発明の別の態様によれば、FUS遺伝子の病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための、この発明の第1の態様によるアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用が提供される。好ましくは、疾患は、ALSまたはFTDからなる群から選択される。

40

## 【0043】

本発明の別の態様によれば、対象における病原性FUSバリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するためのキットであって、その使用のための指示と共に、好適な容器中に詰められた、少なくともこの発明の第1の態様によるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、キットが提供される。

## 【0044】

本発明のさらなる特徴は、以下のそれらのいくつかの非限定的な実施形態の記載により詳細に説明される。この記載は、単に本発明を例示する目的のために含まれる。それは、

50

上記で詳述した本発明の広範な要約、開示または説明に対する限定として理解されるべきではない。

【0045】

以下の説明は、以下の添付の図面を参照しながら提供される。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】図1は、FUS CV標的化AONをトランスフェクトした各CVにおいてホモ接合型である線維芽細胞の細胞株におけるデンシトメトリーを用いたPCRおよびアガロースゲル電気泳動を介して測定されたFUS発現を示す（シリーズ1）。L3Kを使用して24時間、50 nMおよび12.5 nMでトランスフェクトされた細胞。（a）CV1を標的としたAON。（b）CV2を標的としたAON。（c）CV3を標的としたAON。エラーバーは、標準誤差である（ $n=2$ ）。

10

【0047】

【図2】図2は、ドロップレットデジタルPCRを用いて測定された、100 nMのFUS CV2を標的化したAONまたは対照との24時間のインキュベーション後の、CV2ヘテロ接合型線維芽細胞における所望の（非標的）対立遺伝子のパーセンテージを示す。追加のミスマッチの距離は、CVから離れた塩基の数を指し、ミスマッチのタイプは、AON中の塩基に続いて標的RNA中の塩基で表記される。エラーバーは、標準誤差である（ $n \geq 2$ ）。

20

【0048】

【図3】図3は、100 nMのFUS CV2を標的化したAONまたは対照でのトランスフェクションの24時間後の、CV2がヘテロ接合型の線維芽細胞の細胞における総FUS mRNA発現を示す。RT-PCR、アガロースゲル電気泳動およびデンシトメトリー分析を介して測定された。追加のミスマッチの距離は、CVから離れた塩基の数を指し、ミスマッチのタイプは、AON中の塩基に続いて標的RNA中の塩基で表記される。エラーバーは、標準誤差である（ $n=3$ ）。

【0049】

【図4】図4は、CV2を標的化したAONであるCV2bおよびCV2eでの、ウイング中にのみまたは全体にPS改変を有する2'-OメチルギャップマーAONでの、およびTMOギャップマーでのトランスフェクションの3日後の、CV2がヘテロ接合型の線維芽細胞における所望の対立遺伝子および総FUS発現のパーセンテージを示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0050】

詳細な説明

本発明は、AON療法を使用して、FUSタンパク質症（ALSおよびFTDを含む）に関連する疾患の症状のさらなる進行を緩和または減速するための予防または治療方法を提供する。より具体的には、本発明は、FUSプレmRNAまたはmRNAをコードする核酸分子を標的とする単離または精製されたAONであって、AONは、（a）上下限值を含む配列番号1～配列番号34またはそのバリエーションを含むリストから選択される核酸塩基配列、または（b）上下限值を含む配列番号1～配列番号34またはそのバリエーションが同様に結合する標的FUSプレmRNAまたはmRNA中の少なくとも1つまたは複数の連続する核酸塩基に相補的である核酸塩基配列を有し、（c）AONは、ヒトFUSまたはそのバリエーションの発現を阻害する、AONを提供する。

40

【0051】

便宜上、以下のセクションは、一般的に、本明細書において使用される用語の様々な意味を概説する。この議論に従って、本発明の組成物、医薬の使用および方法に関する一般的な態様が論じられ、それに続いて本発明の様々な実施形態の特性を実証する具体的な例およびどのようにそれらが採用できるかが論じられる。

【0052】

1. 定義

50

明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲で使用されるある特定の用語および語句の意味は、以下に提供される。当技術分野における用語の使用と本明細書で提供されるその定義との間に明らかな不一致がある場合、本明細書内に提供される定義が優勢であるものとする。

【0053】

当業者であれば、本明細書に記載される発明が、具体的に記載されたもの以外の変形形態や改変を許容することを理解する。本発明は、全てのこのような変形形態および改変を含む。本発明はまた、本明細書において個々にもしくは集合的に言及された、または示されたステップ、特徴、製剤および化合物の全て、ならびにステップもしくは特徴のありとあらゆる組合せまたはそれらのいずれか2つもしくはそれより多くを含む。

10

【0054】

本明細書で引用された各文書、参考文献、特許出願または特許は、参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に組み入れられ、これは、読者によって明細書の一部としてそれらが読まれ、考察されるべきであるということの意味する。本明細書で引用された文書、参考文献、特許出願または特許が本明細書において繰り返されないということは、単に簡潔さの理由のためである。しかしながら、引用された資料またはその資料に含有される情報はいずれも、共通の一般知識と理解されるべきではない。

【0055】

製造業者の指示、説明、製品の仕様書、および製品シートは、本明細書に記載された、または参照により本明細書に組み入れられるいずれかの文書に記載のいずれの製品についても、これによって参照により本明細書に組み入れ、本発明の実施で採用することができる。

20

【0056】

本発明は、本明細書に記載される具体的な実施形態のいずれによっても範囲が限定されないものとする。これらの実施形態は、単に例証の目的を意図しているにすぎない。機能的に同等な生成物、製剤および方法は明らかに、本明細書に記載される本発明の範囲内である。

【0057】

機能する例の場合以外、または別段の指示がない限り、本明細書において使用される成分の量または反応条件を表す全ての数は、全ての場合において用語「約」により修飾されていると理解されるべきである。用語「約」は、パーセンテージと関連して使用される場合、 $\pm 1\%$ を意味し得る。

30

【0058】

本明細書に記載される発明は、値（例えば、サイズ、濃度など）の1種または複数の範囲を含み得る。値の範囲は、範囲を定義する値、および範囲の境界を定義するその値に直接隣接する値と同じまたは実質的に同じ結果をもたらす範囲に隣接する値を含む、その範囲内の全ての値を含むと理解される。例えば、範囲の上限または下限における10%の変動は、全く適切であり得、本発明に包含されることを当業者は理解する。より具体的には、範囲の上限または下限における変動は、5%であるかまたは当技術分野において一般的に認識される通りかの、どちらがより大きい方となる。

40

【0059】

本出願において、単数形の使用は、特に別段の規定がない限り複数形も含む。本出願において、「または」の使用は、別段の指定がない限り「および／または」を意味する。さらに、用語「含むこと (including)」、加えて「含む (includes)」および「含まれる (included)」などの他の形態の使用は、非限定的である。また、「要素」または「成分」などの用語は、特に別段の規定がない限り、1つの単位を含む要素および成分と、1つより多くのサブユニットを含む要素および成分の両方を包含する。また、用語「部分」の使用も、ある部分の一部またはある部分の全体を含む場合がある。

【0060】

50

本明細書全体を通して、文脈がそれ以外であることを必要としている場合を除き、単語「含む (comprise)」または「含む (comprises)」または「含むこと (comprising)」などの変形形態は、述べられている整数または整数の群の包含を暗に示すが、他のいずれの整数も整数の群も排除されないことが理解される。

【0061】

用語「投与する」は、本明細書で使用される場合、所望の作用が生じるようにその所望の作用部位での組成物の少なくとも部分的な局在化をもたらす方法または経路によって対象に組成物を配置することを指す。本明細書に記載される化合物または組成物は、これらに限定されないが、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、気道（エアロゾル）、肺、鼻、直腸、および局所（頬側および舌下を含む）投与を含む経口経路または非経口経路を含む当技術分野において公知のあらゆる適切な経路によって投与されてもよい。

10

【0062】

用語「FUS 共通バリエーション」は、本明細書で使用される場合、FUS 遺伝子または FUS タンパク質におけるバリエーションを指す。好ましくは、変種は、一般的であり、ヒト集団で生じる。より好ましくは、変種は、ヒト集団で高頻度で生じる。

【0063】

本明細書において使用される選択された用語についての他の定義は、本発明の詳細な説明内で見出され、全体にわたり適用することができる。別段定義されない限り、本明細書において使用される全ての他の科学用語および技術用語は、本発明が属する分野の当業者に一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

20

【0064】

本発明の特徴は、以下の非限定的な説明および例を参照しながらここで論じられる。

【0065】

## 2. 実施形態

本発明の実施形態は、一般的に、FUS の発現を抑制する (suppress) ように特異的に設計された、改善されたアンチセンス化合物、およびその方法または使用に関する。FUS における病原性バリエーションは、ALS や FTD などの FUS タンパク質症に関連する疾患に参与している。

【0066】

理論に縛られることはないが、本発明は、病原性 FUS バリエーションに関してヘテロ接合型である患者において、病原性バリエーションを含有する FUS の発現を抑制することは、これらの患者の症状の進行を減速する、および／または生存を改善する効果を有し得ることを理解することに基づく。これはなぜなら、FUS 病原性変種は、細胞質内の FUS の誤った局在化、スプライシング欠陥、DNA 傷害をもたらす、FUS 自己調節を損なう可能性があるためである。病原性 FUS バリエーションは、ALS および FTD を含むいくつかの神経学的状態に関連がある。それゆえに、病原性バリエーションを含有する FUS 対立遺伝子の抑制は、症状の進行を減速させること、ならびに／または ALS および FTD を含む FUS 病原性バリエーションに関連する疾患に罹っている患者の生存率を改善することをもたらすという仮説が立てられる。

30

【0067】

### A. アンチセンスオリゴヌクレオチド

この発明は、FUS プレ mRNA および mRNA をコードする核酸分子を標的とする、1 種または複数の単離または精製された AON であって、AON は、上下限値を含む配列番号 1 ～ 配列番号 34（以下の表 1 および 2 に記載の通り）を含むリストから選択される核酸塩基配列を有し、AON は、ヒト FUS またはそのバリエーションの発現を阻害する、AON を提供する。一例において、AON は、チオホスホリアルミデートモルホリノオリゴマー (TMO) キメラ (ギャップマー)：モルホリノ 3'-チオホスホリアルミデートであるウイング、および 3' 末端に 2'-デオキシヌクレオシド塩基を有する 2'-デオキシヌクレオシド 3'-チオホスフェートであるギャップである。別の例において、AON は、2'-オ-メトキシエチルキメラ (ギャップマー) である。

40

50

## 【0068】

好ましくは、AONは、CV1(rs741810)、CV2(rs1052352)、およびCV3(rs4889537)からなる群から選択されるFUS共通バリエントを標的としている。

## 【0069】

より一般的には、本発明は、FUSプレmRNAまたはmRNAをコードする核酸分子を標的とする単離または精製されたアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、AONは、

a. 上下限値を含む配列番号1～配列番号34を含むリストから選択される核酸塩基配列、または

b. 上下限値を含む配列番号1～配列番号34が同様に結合する標的FUSプレmRNAまたはmRNA中の少なくとも1つまたは複数の連続する核酸塩基に相補的である配列核酸塩基配列

を有し、

c. AONは、ヒトFUSまたはそのバリエントの発現を阻害する、アンチセンスオリゴヌクレオチドを提供する。

## 【0070】

好ましくは、AONは、表1に提供されるFUS共通バリエント(FUS CV)を標的としている。

## 【表1-1】

表1-FUS CVを標的としたAONの配列

| AON ID | 配列番号 | AON座標             | AON配列 (5'から3')       |
|--------|------|-------------------|----------------------|
| 1      | 1    | FUS H3A(+96+115)  | GCCAUATCCTGAAGTGUCCG |
| 2      | 2    | FUS H3A(+100+119) | UCUGGCCATATCCTGAAGUG |
| 3      | 3    | FUS H3A(+103+122) | UGCUCTGGCCATATCCUGAA |
| 4      | 4    | FUS H3A(+96+115)  | GCCAUAGCCTGAAGTGUCCG |
| 5      | 5    | FUS H3A(+100+119) | UCUGGCCATAGCCTGAAGUG |
| 6      | 6    | FUS H3A(+103+122) | UGCUCTGGCCATAGCCUGAA |
| 7      | 7    | FUS H4A(+88+107)  | GCCAGGGTAGGAGGACUGCU |
| 8      | 8    | FUS H4A(+92+111)  | CAUAGCCAGGGTAGGAGGAC |
| 9      | 9    | FUS H4A(+95+114)  | GGCCATAGCCAGGGTAGGAG |
| 10     | 10   | FUS H4A(+88+107)  | GCCAGGATAGGAGGACUGCU |
| 11     | 11   | FUS H4A(+92+111)  | CAUAGCCAGGATAGGAGGAC |
| 12     | 12   | FUS H4A(+95+114)  | GGCCATAGCCAGGATAGGAG |

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

|    |    |                   |                      |
|----|----|-------------------|----------------------|
| 13 | 13 | FUS 15A(+797+816) | UGACCTCAAGCCCTCUGAGU |
| 14 | 14 | FUS 15A(+801+820) | UCAAUGACCTCAAGCCCUCU |
| 15 | 15 | FUS 15A(+804+823) | AUGUCAATGACCTCAAGCCC |
| 16 | 16 | FUS 15A(+797+816) | UGACCTGAAGCCCTCUGAGU |
| 17 | 17 | FUS 15A(+801+820) | UCAAUGACCTGAAGCCCUCU |
| 18 | 18 | FUS 15A(+804+823) | AUGUCAATGACCTGAAGCCC |

10

基準点（0）は、5'および3'スプライス部位の最初の塩基に設定される；したがって「+」は、エクソン内のヌクレオチド結合を指し、「-」は、イントロン内のヌクレオチド結合を示す。

【0071】

一例において、AONは、表2に提供されるFUS CV2の領域を標的とする。

【表 2】

20

表2 - FUS CV2を標的としたAONの配列-シリーズ2

| AON ID | 配列番号 | AON 座標             | AON 配列 (5'から3')      |
|--------|------|--------------------|----------------------|
| 19     | 19   | FUS H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCAGAGTAGGAGGAC |
| 20     | 20   | FUS H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCAGTGTAGGAGGAC |
| 21     | 21   | FUS H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCAAGGTAGGAGGAC |
| 22     | 22   | FUS H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCATGGTAGGAGGAC |
| 23     | 23   | FUS H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCAGGGTAAGAGGAC |
| 24     | 24   | FUS H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCAGGGTATGAGGAC |
| 25     | 25   | FUS H4A(+92+111)A1 | CAUAGCGAGGGTAGGAGGAC |
| 26     | 26   | FUS H4A(+92+111)A1 | CAUAGCAAGGGTAGGAGGAC |
| 27     | 27   | FUS H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCAGAATAGGAGGAC |
| 28     | 28   | FUS H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCAGTATAGGAGGAC |
| 29     | 29   | FUS H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCAAGATAGGAGGAC |
| 30     | 30   | FUS H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCATGATAGGAGGAC |
| 31     | 31   | FUS H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCAGGATAAGAGGAC |
| 32     | 32   | FUS H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCAGGATATGAGGAC |
| 33     | 33   | FUS H4A(+92+111)A2 | CAUAGCGAGGATAGGAGGAC |
| 34     | 34   | FUS H4A(+92+111)A2 | CAUAGCAAGGATAGGAGGAC |

30

40

50

基準点（０）は、５’および３’スプライス部位の最初の塩基に設定される；したがって「＋」は、エクソン内のヌクレオチド結合を指し、「－」は、イントロン内のヌクレオチド結合を示す。

【００７２】

本発明のＡＯＮのいずれにおいても、本明細書で提供される配列のウラシル（Ｕ）は、チミン（Ｔ）で置き換えられていてもよい。本発明のＡＯＮのいずれにおいても、本明細書で提供される配列のチミン（Ｔ）は、ウラシル（Ｕ）で置き換えられていてもよい。

【００７３】

本発明のある特定のＡＯＮは、ヒトＦＵＳプレｍＲＮＡおよびｍＲＮＡ内のエクソン３、４および１５内の好適な配列を補完するように設計される。好ましい実施形態において、本発明のＡＯＮは、ヒトＦＵＳプレｍＲＮＡおよび／またはｍＲＮＡのエクソン３または４内の好適な配列を補完するように設計される。さらに好ましい実施形態において、本発明のＡＯＮは、ＦＵＳ共通バリエーションの１つに関してヘテロ接合型である患者におけるプレｍＲＮＡおよび／またはｍＲＮＡの１つの対立遺伝子の発現を選択的にノックダウンするように設計される。さらに好ましい実施形態において、本発明のＡＯＮは、ＦＵＳプレｍＲＮＡおよび／またはＦＵＳ ｍＲＮＡのＲＮアーゼＨによって媒介される分解を誘導するように設計される。最も好ましくは、本発明のＡＯＮは、配列番号１～配列番号３４からなる群から選択される。

【００７４】

用語「アンチセンスオリゴマー」および「アンチセンス化合物」および「アンチセンスオリゴヌクレオチド」または「ＡＯＮ」は互換的に使用され、環状サブユニットの線状配列であって、それぞれが、サブユニット間結合によって結合された塩基対形成部分を担持し、ワトソン－クリック塩基対形成によって、塩基対形成部分を核酸（典型的にはＲＮＡ）中の標的配列にハイブリダイズさせて、標的配列内で核酸：オリゴマーのヘテロ二重鎖を形成する、環状サブユニットの線状配列を指す。環状サブユニットは、リボースまたは別のペントース糖に基づくか、または好ましい実施形態において、モルホリノ基に基づく（以下のモルホリノオリゴマーの説明を参照）。オリゴマーは、標的配列に対して正確な、または近い配列相補性を有していてもよい；オリゴマーの末端に近い配列における変動は、一般的に内部における変動より好ましい。また当技術分野において公知の他のアンチセンス剤のなかでも、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、および２’－Ｏ－メチルオリゴヌクレオチドも意図される。

【００７５】

用語「オリゴヌクレオチド」は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）またはリボ核酸（ＲＮＡ）などのポリヌクレオチドを含み、ＲＮＡは、調製されるかまたはＤＮＡ鋳型の転写により得られる。本発明によれば、核酸は、一本鎖もしくは二本鎖の、直鎖状の、または共有結合で環状に閉じた分子として存在し得る。

【００７６】

「単離された」は、材料であって、その天然状態でそれに通常付随する成分を実質的または本質的に含まない材料を意味する。例えば、「単離されたポリヌクレオチド」または「単離されたオリゴヌクレオチド」は、本明細書で使用される場合、天然に存在する状態でその両側にある配列から精製された、またはそれから取り出されたポリヌクレオチドを指す場合もあり、例えば、ゲノム中で断片に隣接する配列から取り出されたＤＮＡ断片を指す場合もある。用語「単離すること」は、それが細胞に関する場合、供給源である対象（例えば、ポリヌクレオチド反復疾患を有する対象）からの細胞（例えば、線維芽細胞、リンパ芽球）の精製を指す。ｍＲＮＡまたはタンパク質の文脈において、「単離すること」は、供給源、例えば細胞からのｍＲＮＡまたはタンパク質の回収を指す。

【００７７】

ＡＯＮは、それがハイブリダイズする標的配列「に向けられる」または「に対して標的化される」と言うことができる。ある特定の実施形態において、標的配列は、ポリアデニル化部位および周囲の領域を含む領域を含む。標的配列は、典型的には、ｍＲＮＡのＡＵ

10

20

30

40

50

G 開始コドン、翻訳抑制オリゴマー、またはプレプロセッシングされた (pre-processed) mRNA のスプライス部位、スプライス抑制オリゴマー (SSO) を含む領域である。スプライス部位の場合の標的配列としては、プレプロセッシングされた mRNA における正常なスプライスアクセプタージャンクションの下流に、その 5' 末端に 1 ~ 約 25 個の塩基対を有する mRNA 配列を挙げることができる。好ましい標的配列は、スプライス部位を含む、または全体がエクソンコード配列内に含有される、またはスプライスアクセプターもしくはドナー部位にわたる、プレプロセッシングされた mRNA のあらゆる領域である。オリゴマーは、より一般的には、それが上記の方式で標的の核酸に対して標的とされる場合、生物学的に関連した標的、例えばタンパク質、ウイルス、または細菌「に対して標的化される」と言われる。

10

#### 【0078】

「十分な長さ」または「十分な配列相補性」は、本明細書で使用される場合、標的 FUS プレ mRNA および／または FUS mRNA における少なくとも 1 個の、より典型的には 1 ~ 30 個の連続する核酸塩基に相補的である AON を指す。一部の実施形態において、十分な長さを有するアンチセンスとしては、標的 FUS プレ mRNA におけるおよび／または FUS mRNA における少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または 15 個の連続する核酸塩基が挙げられる。他の実施形態において、十分な長さを有するアンチセンスとしては、標的 FUS プレ mRNA におけるおよび／または FUS mRNA における少なくとも 16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 個の連続する核酸塩基が挙げられる。好ましくは、十分な長さを有するオリゴヌクレオチドは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 および 40 個のオリゴヌクレオチド、またはそれより多くのヌクレオチドを含む、長さが約 10 ~ 約 50 個のヌクレオチドである。一実施形態において、十分な長さを有するオリゴヌクレオチドは、長さが 10 ~ 約 30 個のヌクレオチドである。別の実施形態において、十分な長さを有するオリゴヌクレオチドは、長さが 15 ~ 約 25 個のヌクレオチドである。さらに別の実施形態において、十分な長さを有するオリゴヌクレオチドは、長さが、20 ~ 30、または 20 ~ 50 個のヌクレオチドである。さらに別の実施形態において、十分な長さを有するオリゴヌクレオチドは、長さが、22 ~ 28、25 ~ 28、24 ~ 29 または 25 ~ 30 個のヌクレオチドである。

20

30

#### 【0079】

ある特定の実施形態において、AON は、有効な方式で標的 RNA の領域（例えば、FUS プレ mRNA および／または mRNA）をブロックするために、標的 RNA と十分な配列相補性を有する。一部の他の実施形態において、標的 RNA は、標的 プレ mRNA（例えば、FUS プレ mRNA および／または mRNA）であり、本発明は、FUS プレ mRNA および／または FUS mRNA の RNアーゼ H によって媒介される分解を誘導する。

#### 【0080】

用語「相補的」または「相補性」は、本明細書で使用される場合、塩基対合則によって関連付けられたポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）に関して使用される。例えば、配列 5' - A - G - T - 3' は、配列 3' - T - C - A - 5' に相補的である。相補性は、「部分的」であってもよく、その場合、核酸の塩基の一部のみが、塩基対合則に従って一致している。または核酸間で「完全な」または「全体の」相補性であってもよい。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に対して有意な効果を有する。したがって、「相補体」配列は、本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチド配列が、標的 RNA または DNA 配列にいくつかの相補性を有することを指す。

40

#### 【0081】

本発明の目的のために、ヌクレオチド配列の相補体は、表されたヌクレオチド配列を有

50

する二本鎖DNAまたはRNA分子を形成することが可能であろうヌクレオチド配列であり、さらに、シャルガフの規則 ( $A < > T$ ;  $G < > C$ ;  $A < > U$ ) に従ってヌクレオチドをその相補的なヌクレオチドによって置き換え、5' から 3' 方向に、すなわち表されたヌクレオチド配列の逆方向に読み取ることによって、表されたヌクレオチド配列から得ることができるヌクレオチド配列である。これはまた、DNA/RNAの合成アナログ（例えば、2' F-AANAオリゴ）も含む。

#### 【0082】

用語「相同性」または「同一性」は、相補性の程度を指す。オリゴヌクレオチド配列と、標的RNAまたはDNAの相補体配列との間に部分的な相同性または完全な配列同一性が存在していてもよい。部分的に同一な配列は、標的RNAまたはDNAに少なくとも部分的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであって、部分的なヘテロ二重鎖の形成と、標的RNAまたはDNAの部分的な、または全体の分解をもたらす。完全に同一な配列は、標的RNAまたはDNAに完全にハイブリッドする (hybrid) オリゴヌクレオチドであって、完全なヘテロ二重鎖の形成と、標的RNAまたはDNAの部分的な、または全体の分解をもたらす。

10

#### 【0083】

ある特定の実施形態において、AONは、標的配列に100%相補的であってもよいし、またはオリゴヌクレオチドと標的配列との間に形成されたヘテロ二重鎖が、*in vivo*で起こり得る細胞のヌクレアーゼの作用および他の分解様式に耐えるのに十分に安定である限り、ミスマッチを含んでいてもよく、例えばバリエーションを受け入れるためにミスマッチを含んでいてもよい。したがって、ある特定のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドと標的配列との間に、約または少なくとも約70%の配列相補性、例えば、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列相補性を有していてもよい。

20

#### 【0084】

ミスマッチは、存在する場合、典型的には、ハイブリッド二重鎖の末端領域に向かって、中央の領域と比べて不安定さが低くなる。許容されるミスマッチの数は、二重鎖安定性のよく理解されている原理に従って、オリゴヌクレオチドの長さ、二重鎖中のG:C塩基対のパーセンテージ、および二重鎖中のミスマッチの位置に依存すると予想される。このようなAONは、必ずしも標的配列に100%相補的ではないが、標的プレRNAに結合する切断因子がモジュレートされるように、標的配列に安定して特異的に結合するのに効果的である。

30

#### 【0085】

AONと標的配列との間に形成された二重鎖の安定性は、結合 $T_m$ と、細胞の酵素による切断に対する二重鎖の感受性との相関である。相補配列RNAに対するオリゴヌクレオチドの $T_m$ は、従来の方法、例えば、Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, (1985), 107-108によって記載されている方法によって、またはMiyada C. G. and Wallace R. B., (1987), *Methods Enzymol.* 154, 94-107に記載されたように測定することができる。ある特定の実施形態において、AONは、相補配列RNAに対して、体温より高い、好ましくは約45℃または50℃より高い結合 $T_m$ を有し得る。60~80℃の範囲内の $T_m$ またはそれより高い $T_m$ も含まれる。

40

#### 【0086】

バリエーションのさらなる例としては、配列番号X~Yのいずれかの全長にわたり、約または少なくとも約70%の配列同一性または相同性、例えば、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性ま

50

たは相同性を有する A O N が挙げられる。

【 0 0 8 7 】

好ましい実施形態において、本発明の A O N は、ヒト F U S プレ m R N A のエクソン 3 および 4 内の好適な配列を補完し、転写物の R N アーゼ H によって媒介される分解を誘導するように設計される。

【 0 0 8 8 】

本発明のある特定の A O N は、ヒト F U S プレ m R N A ならびに／または m R N A 内のエクソン 3、4 および 15 内の好適な配列を補完するように設計される。好ましい実施形態において、本発明の A O N は、ヒト F U S プレ m R N A のエクソン 3 および 4 内の好適な配列を補完するように設計される。さらに好ましい実施形態において、本発明の A O N は、プレ m R N A および／または m R N A の 1 つの対立遺伝子の発現を選択的にノックダウンするように設計され、ここで、患者は、F U S 共通バリエーションに関してヘテロ接合型である。さらに好ましい実施形態において、本発明の A O N は、F U S プレ m R N A および／または F U S m R N A の R N アーゼ H によって媒介される分解を誘導するように設計される。最も好ましくは、本発明の A O N は、配列番号 1 ～ 配列番号 34 からなる群から選択される。

【 0 0 8 9 】

A O N は、好ましくは、表 1 または表 2 に提供されるものから選択される。例えば、本発明で使用される A O N は、配列番号 1 ～ 34 を含むリストから選択される。最も好ましくは、A O N は、配列番号 1 ～ 12 を含むリストから選択される。より好ましくは、A O N は、配列番号 2、4、5、8 および 11 を含むリストから選択される。

【 0 0 9 0 】

#### B. 使用方法

本発明は、さらに、F U S の発現を阻害する方法であって、

(a) 本明細書に記載される A O N の 1 種または複数を提供するステップ、および

(b) オリゴマー（複数可）を、標的核酸部位に結合させるステップ

を含む、方法を提供する。

【 0 0 9 1 】

より具体的には、A O N は、表 1 または表 2 に記載のものから選択され得る。配列は、好ましくは、配列番号配列番号 (SEQ ID Nos: SEQ ID NO:) 1 ～ 配列番号 34 のいずれか 1 つまたは複数、およびそれらの組合せまたはカクテルからなる群から選択される。これには、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でこのような配列にハイブリダイズできる配列、それに相補的な配列、改変された塩基、改変された主鎖、および F U S 遺伝子転写物における R N A プロセッシング活性を有するかまたはモジュレートするそれらの機能的な短縮化 (truncation) または伸長を含有する配列が挙げられる。

【 0 0 9 2 】

好ましくは、本発明で使用される A O N は、配列番号 1 ～ 12 を含むリストから選択される。最も好ましくは、A O N は、配列番号 2、4、5、8 および 11 を含むリストから選択される。

【 0 0 9 3 】

好ましい一実施形態において、本発明の方法で使用される A O N は、F U S プレ m R N A および／または m R N A の R N アーゼ H によって媒介される分解を誘導する。

【 0 0 9 4 】

(1) F U S 発現を低減させるように設計された A O N (配列番号 1 ～ 34) を組み合わせた治療戦略は、病原性 F U S 変種の影響を低減させる。一態様において、本発明は、病原性 F U S バリエーションに関連する疾患に罹っている対象における F U S タンパク質症または疾患を緩和するための手段を提供することを目的とする。

【 0 0 9 5 】

標的配列および選択的なハイブリダイゼーション

オリゴマーおよび D N A、c D N A または R N A は、各分子における十分な数の対応す

る位置が互いに水素結合できるヌクレオチドによって占められている場合、互いに相補的である。したがって、「特異的にハイブリダイズ可能な」および「相補的」は、オリゴマーと、DNA、cDNAまたはRNA標的との間で安定で特異的な結合が生じるように十分な程度の相補性または対形成を示すのに使用される用語である。当技術分野において、AONの配列は、特異的にハイブリダイズ可能にするのに必ずしもその標的配列のそれに100%相補的でなくてもよいことが理解される。AONは、化合物の標的DNAまたはRNA分子への結合が、標的DNAまたはRNA生成物の正常な機能に干渉し、特異的な結合が望ましい条件下で、すなわち、*in vivo*のアッセイまたは治療的処置のケースでは、生理学的条件下で、さらに、*in vitro*のアッセイのケースでは、アッセイが実行される条件下で、AONの非標的配列への非特異的な結合を回避するのに十分な程度の相補性がある場合、特異的にハイブリダイズ可能である。

10

#### 【0096】

選択的なハイブリダイゼーションは、低い、中程度の、または高いストリンジェンシー条件下であってもよいが、好ましくは高いストリンジェンシー下である。当業者は、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーが、塩基組成、相補鎖の長さ、およびハイブリダイズする核酸間のヌクレオチド塩基ミスマッチの数に加えて、塩濃度、温度、または有機溶媒のような条件の影響を受けることを認識している。ストリンジェントな温度条件は、一般的に、30℃を超える温度、典型的には37℃を超える温度、好ましくは45℃を超える温度、好ましくは少なくとも50℃、典型的には60℃～80℃またはそれより高い温度を含む。ストリンジェントな塩条件は、通常は1000mM未満、典型的には500mM未満、好ましくは200mM未満である。しかしながら、パラメーターの組合せは、あらゆる単一のパラメーターの尺度より一層重要である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例は、65℃および0.1×SSC（1×SSC=0.15MのNaCl、0.015Mのクエン酸ナトリウムpH7.0）である。したがって、本発明のAONは、表1または表2に提供される配列に選択的にハイブリダイズするオリゴマーを含んでいてもよい。

20

#### 【0097】

$T_m$ は、所与のイオン強度およびpHで、標的配列の50%が相補的なポリヌクレオチドにハイブリダイズする温度である。このようなハイブリダイゼーションは、AONが標的配列に対して「ほぼ」または「実質的な」相補性を有する場合に、加えて正確な相補性を有する場合に起こり得る。

30

#### 【0098】

典型的には、一続きの少なくとも約14個のヌクレオチドにわたり、アンチセンスオリゴマーのヌクレオチドと、少なくとも約55%の同一性がある場合、好ましくは少なくとも約65%、より好ましくは少なくとも約75%、最も好ましくは少なくとも約90%、95%、98%または99%の同一性がある場合、選択的なハイブリダイゼーションが生じる。相同性比較の長さは、記載される通り、より長いストレッチにわたっていてもよく、ある特定の実施形態において、多くの場合、一続きの少なくとも約9個のヌクレオチド、一般的には少なくとも12個のヌクレオチド、より一般的には少なくとも約20個にわたり、多くの場合、少なくとも約21、22、23もしくは24個のヌクレオチド、少なくとも約25、26、27もしくは28個のヌクレオチド、少なくとも約29、30、31もしくは32個のヌクレオチド、少なくとも約36個、またはそれより多くのヌクレオチドにわたる。

40

#### 【0099】

したがって、一部の実施形態において、本発明のAON配列は、本明細書における配列表に示される配列と、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも86、87、88、89または90%の相同性を有する。より好ましくは、少なくとも91、92、93、94、または95%、より好ましくは少なくとも96、97、98%または99%の相同性がある。一般的に、アンチセンスオリゴマーの長さが短いほど、選択的なハイブリダイゼーションを達成するのに必要な相同性はよ

50

り大きくなる。その結果として、本発明の A O N が約 30 個未満のヌクレオチドからなる場合、同一性のパーセンテージは、本明細書における配列表に記載の A O N と比較して、75%より大きく、好ましくは 85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95%、96、97、98%または99%より大きいことが好ましい。ヌクレオチドの相同性比較は、G C G W i s c o n s i n B e s t f i t プログラムまたは G A P (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395)などの配列比較プログラムによって実行することができる。このようにして、本明細書において引用されたものと類似した、または実質的に異なる長さの配列は、アライメントへのギャップの挿入によって比較することができ、このようなギャップは、例えば G A P によって使用される比較アルゴリズムによって決定される。

10

#### 【0100】

本発明の A O N は、標的配列との相同性が低減した領域、および標的配列との正確な相同性を有する領域を有していてもよい。オリゴマーが、その全長にわたり正確な相同性を有することは必ずしも必要ではない。例えば、オリゴマーは、標的配列に同一な少なくとも4または5個の塩基の連続的なストレッチ、好ましくは標的配列に同一な少なくとも6または7個の塩基の連続的なストレッチ、より好ましくは標的配列に同一な少なくとも8または9個の塩基の連続的なストレッチを有していてもよい。オリゴマーは、標的配列に同一な、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25または26個の塩基のストレッチを有していてもよい。オリゴマー配列の残りのストレッチは、標的配列と断続的に同一であってもよく；例えば、残りの配列は、同一な塩基、それに続いて非同質な塩基、それに続いて同一な塩基を有していてもよい。あるいは（または同様に）、オリゴマー配列は、完全より低い相同性のストレッチが散在する、同一な配列の数個のストレッチ（例えば3、4、5または6個の塩基）を有していてもよい。このような配列ミスマッチは、好ましくは切断改変活性の損失が全くないかまたはほとんどない。

20

#### 【0101】

##### 生理学的な応答

一態様において、本発明の方法は、対象における生理学的な応答を誘導する。好ましくは、本方法は、選択された F U S 対立遺伝子の発現を低減させる。

30

#### 【0102】

用語「モジュレートする (modulate)」または「モジュレートする (modulates)」は、必要に応じて定義された量および／または統計学的に有意な量で、1種または複数の定量可能なパラメータを「増加させる」または「減少させる」ことを含む。用語「増加させる」もしくは「増加させること」、「強化する」もしくは「強化すること」、または「刺激する」もしくは「刺激すること」は、一般的に、細胞または対象において、A O N なしまたは対照化合物のいずれかによって引き起こされる応答と比べてより大きい生理学的な応答（すなわち、下流の効果）を生じるかまたは引き起こす1つまたは複数の A O N または複数の組成物の能力を指す。

#### 【0103】

「強化する」もしくは「強化すること」、または「増加させる」もしくは「増加させること」、または「刺激する」もしくは「刺激すること」は、一般的に、細胞または対象において、アンチセンス化合物なしまたは対照化合物のいずれかによって引き起こされる応答と比較してより大きい生理学的な応答（すなわち、下流の効果）を生じるかまたは引き起こす1つまたは複数のアンチセンス化合物または複数の組成物の能力を指す。「増加された」または「強化された」量は、典型的には、「統計学的に有意な」量であり、アンチセンス化合物なし（薬剤の非存在）または対照化合物によって生じた量の、1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50倍、またはそれより高い倍数（例えば、500、1000倍）（それらの間の、および1を超える全ての整数および小数点を含む）、例えば、1.5、1.6、1.7、1.8など）の増加を挙げることができる。

40

50

## 【0104】

用語「減少させること」または「減少させる」は、一般的に、細胞または対象において、AONなしまたは対照化合物のいずれかによって引き起こされる応答と比べて低減した生理学的な応答（すなわち、下流の効果）を生じさせるかまたは引き起こす1つまたは複数のAONまたは複数の組成物の能力を指す。用語「低減させる」または「阻害する」は、一般的に、診断分野において慣例的な技術に従って測定した場合、関連する生理学的応答または細胞の応答、例えば本明細書に記載される疾患または状態の症状を「減少させる」ための1種または複数の本発明のアンチセンス化合物の能力に関する場合がある。関連する生理学的応答または細胞の応答（*in vivo*または*in vitro*）は、当業者にとって明らかであり、FUS関連の状態の症状または病状の低減を挙げることができる。応答における「減少」は、アンチセンス化合物なしまたは対照組成物によって生じた応答と比較して統計学的に有意であり得、それらの間の全ての整数を含む、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の減少を挙げることができる。

10

## 【0105】

関連する生理学的応答または細胞の応答（*in vivo*または*in vitro*）は、当業者にとって明らかであり、FUS発現の量の減少を挙げることができる。「増加した」または「強化された」量は、典型的には、統計学的に有意な量であり、AONなし（薬剤の非存在）または対照化合物によって生じた量の、1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50倍、またはそれより高い倍数（例えば、500、1000倍）（それらの間の、および1を超える全ての整数および小数点を含み、例えば、1.5、1.6、1.7、1.8）の増加を挙げることができる。用語「低減させる」または「阻害する」は、一般的に、診断分野において慣例的な技術に従って測定した場合、関連する生理学的応答または細胞の応答、例えば本明細書に記載される疾患または状態の症状を「減少させる」1種または複数のAONまたは組成物の能力に関する場合がある。関連する生理学的応答または細胞の応答（*in vivo*または*in vitro*）は、当業者にとって明らかであり、FUSタンパク質症に関連する疾患、例えばALS、FTLD、ADの症状または病状の低減を挙げることができる。応答を「減少させる」は、AONなしまたは対照組成物によって生じた応答と比較して統計学的に有意であってもよく、それらの間の全ての整数を含む、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の減少を挙げることができる。

20

30

## 【0106】

## 改変されたAON

一部の実施形態において、AONは、天然に存在する核酸分子の化学組成を有し、すなわち、AONは、改変されたまたは置換された塩基も、糖も、サブユニット間結合も含まない。

40

## 【0107】

好ましい実施形態において、本発明のAONは、天然に存在しない核酸分子、または「オリゴヌクレオチドアナログ」である。例えば、天然に存在しない核酸は、1種または複数の非天然の塩基、糖、および／またはサブユニット間結合、例えば、天然に存在する核酸分子で見出されるものと比べて改変または置換された塩基、糖、および／または結合を含んでいてもよい。例示的な改変は、以下に記載される。一部の実施形態において、天然に存在しない核酸は、1つより多くのタイプの改変、例えば、糖および塩基の改変、糖および結合の改変、塩基および結合の改変、または塩基、糖、および結合の改変を含む。例えば、一部の実施形態において、AONは、非天然の（例えば、改変または置換された）

50

塩基を含有する。一部の実施形態において、AONは、非天然の（例えば、改変または置換された）糖を含有する。一部の実施形態において、AONは、非天然の（例えば、改変または置換された）サブユニット間結合を含有する。一部の実施形態において、AONは、1つより多くのタイプの改変または置換、例えば、非天然の塩基および／または非天然の糖、および／または非天然のサブユニット間結合を含有する。

#### 【0108】

したがって、(i) 改変された主鎖構造、例えば、天然に存在するオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドで見出される標準的なホスホジエステル結合以外の主鎖、ならびに／または(ii) 改変された糖部分、例えば、リボースもしくはデオキシリボース部分ではなくモルホリノ部分を有する天然に存在しないAONが挙げられる。オリゴヌクレオチドアナログは、ワトソン-クリック塩基対形成によって標準的なポリヌクレオチド塩基への水素結合が可能な塩基を支持し、この場合、アナログ主鎖は、オリゴヌクレオチドアナログ分子と標準的なポリヌクレオチド（例えば、一本鎖RNAまたは一本鎖DNA）中の塩基との間に配列特異的な様式でこのような水素結合を許容する方式で塩基を提示する。好ましいアナログは、実質的に非荷電性の、リンを含有する主鎖を有するものである。

#### 【0109】

AONを産生するための1つの方法は、2'ヒドロキシリボース位置のメチル化であり、ホスホロチオエート主鎖の取り込みは、表面的にRNAに似ているがヌクレアーゼ分解に対する耐性ははるかに高い分子を産生するが、本発明の当業者は、本発明の目的において使用できる好適な主鎖の他の形態を認識している。

#### 【0110】

アンチセンスオリゴマーとの二重鎖形成中のプレmRNA／mRNAの分解を回避するために、本方法で使用するAONは、内因性RNAアーゼHによる切断を最小化または防止するように適合することができる。RNAアーゼHを活性化しないアンチセンス分子は、公知の技術に従って作製することができる（例えば、米国特許第5,149,797号を参照）。このようなアンチセンス分子は、デオキシリボヌクレオチド配列またはリボヌクレオチド配列であってもよく、オリゴヌクレオチドをその一員として含有する二重鎖分子へのRNAアーゼHの結合を立体的に妨害または防止するあらゆる構造的な改変を単に含み、このような構造的な改変は、二重鎖形成を実質的に妨げたりまたは崩壊させたりしない。二重鎖形成に関与するオリゴヌクレオチドの部分は、それらへのRNAアーゼH結合に関与する部分と実質的に異なるため、RNAアーゼHを活性化しない多数のアンチセンス分子が利用可能である。細胞内、またはRNAアーゼHを含有する粗製抽出物においてか のいずれかで非メチル化オリゴマーによるRNAの処理はプレmRNA：AON二重鎖の分解をもたらすため、この特性はとても好ましい。このような分解を迂回できるかまたは誘導しない改変されたAONのあらゆる形態が、本発明の方法で使用する ことができる。ヌクレアーゼ耐性は、部分的に不飽和の脂肪族炭化水素鎖、ならびにカルボン酸基、エステル基、およびアルコール基などの1個または複数の極性または電荷を有する基を含むように本発明のAONを改変することによって達成することができる。

#### 【0111】

RNAと二重鎖になるときに細胞RNAアーゼHによって切断されないAONの例は、2'-O-メチル誘導体である。このような2'-O-メチル-オリゴリボヌクレオチドは、細胞環境および動物組織において安定であり、それらのRNAとの二重鎖は、それらのリボ対応物またはデオキシリボ対応物より高いTm値を有する。あるいは、本発明のヌクレアーゼ耐性AONは、最後の3'末端のヌクレオチドの少なくとも1つがフッ素化されていてもよい。さらなる代替として、本発明のヌクレアーゼ耐性AONは、最後の3'末端ヌクレオチド塩基の少なくとも2つの間を結合するホスホロチオエート結合を有し、好ましくは、最後の4つの3'末端ヌクレオチド塩基の間を結合するホスホロチオエート結合を有する。

#### 【0112】

減少したRNA切断はまた、代替のオリゴヌクレオチド化学で達成することもできる（

例えば、米国特許第5,149,797号を参照)。例えば、AONは、チオホスホルアミデートモルホリノオリゴマー(TMO)キメラ、ホスホルアミデートまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(PMO); PMO-X; PPMO; ペプチド核酸(PNA); ロックド核酸(LNA)およびアルファ-L-LNAなどの誘導体、2'-アミノLNA、4'-メチルLNAおよび4'-O-メチルLNA; エチレン架橋核酸(ENA)およびその誘導体; ホスホロチオエートオリゴマー; トリシクロ-DNAオリゴマー(tcDNA); トリシクロホスホロチオエートオリゴマー; 2'-O-メチル改変オリゴマー(2'-Ome); 2'-O-メトキシエチル(2'-MOE); 2'-フルオロ、2'-フルオロアラビノ(FANA); アンロックド核酸(UNA); ヘキシトール核酸(HNA); シクロヘキセニル核酸(CeNA); 2'-アミノ(2'-NH<sub>2</sub>); 2'-O-エチレンアミン、またはミックスマーとして、もしくはギャップマーとしての前述のもののあらゆる組合せを含むリストから選択することができる。PMOの主要な利益は、増加した安全性プロファイルである。PMOの中性電荷のために、PMOは、タンパク質相互作用を受けにくくなり、血小板活性化および免疫活性化を低減させる。これもまた、ヌクレアーゼによる分解を低減させる。これらはまた、DMD患者においても5年より長くにわたり安全に使用されてきた。

#### 【0113】

一態様において、本発明の改変されたAONは、ペプチドにコンジュゲートされていてもよい。好ましくは、AONは、PTMOであり、すなわち、アミド、マレイミドまたはクリックケミストリーを介して(好ましくは銅非含有のクリックケミストリーを使用して、例えばシクロオクチン結合を介した銅非含有のクリックケミストリーを使用して)ペプチド部分に化学的にコンジュゲートしたTMOオリゴヌクレオチドであり、好適なリンカー、例えば切断可能な、またはpH感受性リンカーを含む。ペプチド部分は、3'または5'末端のいずれかを介して結合されていてもよい。最も好ましくは、ペプチド部分は、細胞を通り抜け核に到達するAONの能力を改善することが可能なペプチドである。例えば、ペプチド部分は、アルギニンリッチなペプチド、カチオン性ペプチドおよび/または生物的に多様な微生物のゲノムに由来するペプチドのライブラリーから選択されるペプチドであってもよい(Hoffman et al., Sci Rep, 8, 1, 12538)。ペプチドは、非天然のアミノ酸および/または化学的に改変されたアミノ酸を含有していてもよい、または含有していなくてもよい。

#### 【0114】

細胞透過性ペプチドは、細胞内取り込みおよび核局在化を強化するために、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーに付加されている。Jearawiriyapaisarn et al. (2008), Mol. Ther., 16(9), 1624-1629で示されるように、様々な細胞透過性ペプチドが、取り込みの効率および標的組織特異性に影響を与えることが示されている。用語「細胞透過性ペプチド」および「CPP」は互換的に使用され、カチオン性細胞透過性ペプチドを指し、これはまた、輸送ペプチド、キャリアペプチド、またはペプチド形質導入ドメインとも呼ばれる。ペプチドは、本明細書で示した通り、所与の細胞培養物集団の細胞の100%内における細胞透過を誘導する能力を有し、全身投与されると、in vivoにおいて複数の組織内での巨大分子の転移を可能にする。ペプチドはまた、組織または臓器への局所送達後に細胞内取り込みを強化することも可能である。

#### 【0115】

送達効能をさらに改善するために、上記の改変ヌクレオチドは、糖または核酸塩基部分に、脂肪酸/脂質/コレステロール/アミノ酸/炭水化物/多糖類/ナノ粒子などをコンジュゲートさせることが多い。これらのコンジュゲートしたヌクレオチド誘導体も、AONを構築してエクソンスキッピングを誘導するのに使用することができる。ヒトFUS遺伝子転写物のアンチセンスオリゴマーによって誘導されたオルタナティブスプライシングは、ホスホロチオエート主鎖に、オリゴリボヌクレオチド、PNA、2'-Omeまたは2'-MOE改変塩基を使用することができる。2'-Ome AONは、カチオン性リブプレックスとして送達される場合、in vitroにおけるその効率的な取り込みのた

めにオリゴ設計に使用されるが、これらの化合物はヌクレアーゼ分解を受けやすく、*invivo*または臨床適用にとって理想的とみなされない。本発明のAONを生成するのに代替の化学が使用される場合、本明細書で提供される配列のウラシル（U）は、チミン（T）で置き換えられていてもよい。

#### 【0116】

例えば、このようなアンチセンス分子は、ヌクレオチド間の架橋を形成するリン酸残基の少なくとも1つまたは全てが、改変されたリン酸、例えばメチルホスホネート、メチルホスホロチオエート、ホスホロモルホリデート、ホスホロピペラジデートおよびホスホルアミデート（phosphoramidate）であるオリゴヌクレオチドであってもよい。例えば、ヌクレオチド間の架橋を形成するリン酸残基は一つ置きに、記載される通りに改変されていてもよい。別の非限定的な例において、このようなアンチセンス分子は、ヌクレオチドの少なくとも1つまたは全てが、2'低級アルキル部分（例えば、C1～C4の、直鎖または分岐鎖、飽和または不飽和のアルキル、例えばメチル、エチル、エテニル、プロピル、1-プロペニル、2-プロペニル、およびイソプロピル）を含有する分子である。例えば、ヌクレオチドの一つ置きが、記載される通りに改変されていてもよい。

10

#### 【0117】

この発明において有用なAONの具体的な例としては、改変された主鎖または非天然のサブユニット間結合を含有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。

#### 【0118】

改変された主鎖を有するオリゴヌクレオチドとしては、主鎖中にリン原子を保持するもの、および主鎖中にリン原子を有さないものが挙げられる。ヌクレオシド間の主鎖中にリン原子を有さない改変されたオリゴヌクレオチドはまた、オリゴヌクレオシドとみなすこともできる。

20

#### 【0119】

他のアンチセンス分子において、糖とヌクレオシド間結合の両方、すなわちヌクレオチド単位の主鎖は、新規の基で置き換えられる。塩基単位は、適切な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。1つのこのようなオリゴマー化合物である、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されているオリゴヌクレオチド模倣物は、ペプチド核酸（PNA）と称される。PNA化合物において、オリゴヌクレオチドの糖主鎖は、アミドを含有する主鎖、具体的にはアミノエチルグリシン主鎖で置き換えられている。核酸塩基は保持され、主鎖のアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合する。

30

#### 【0120】

改変されたオリゴヌクレオチドはまた、1つまたは複数の置換された糖部分を含有していてもよい。オリゴヌクレオチドはまた、核酸塩基（当技術分野では単に「塩基」と称されることが多い）の改変または置換も含んでいてもよい。改変または置換された塩基を含有するオリゴヌクレオチドとしては、核酸中で最も一般的に見出される1種または複数のプリン塩基またはピリミジン塩基があまり一般的ではないまたは非天然の塩基で置き換えられているオリゴヌクレオチドが挙げられる。

#### 【0121】

プリン塩基は、イミダゾール環に縮合したピリミジン環を含み；アデニンおよびグアニンは、核酸中で最も一般的に見出される2つのプリン核酸塩基である。これらは、N<sup>6</sup>-メチルアデニン、N<sup>2</sup>-メチルグアニン、ヒポキサンチン、および7-メチルグアニンを含むがこれらに限定されない、他の天然に存在するプリンで置換されていてもよい。

40

#### 【0122】

ピリミジン塩基は、6員のピリミジン環を含み；シトシン、ウラシル、およびチミンは、核酸中で最も一般的に見出されるピリミジン塩基である。これらは、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、プソイドウラシル、および4-チオウラシルを含むがこれらに限定されない、他の天然に存在するピリミジンで置換されていてもよい。一実施形態において、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチドは、ウラシルの代わりにチミ

50

ン塩基を含有する。

【0123】

他の改変または置換された塩基としては、これらに限定されないが、2, 6-ジアミノプリン、オロチン酸、アグマチジン、リシジン、2-チオピリミジン（例えば2-チオウラシル、2-チオチミン）、G-クランプおよびその誘導体、5-置換ピリミジン（例えば5-ハロウラシル、5-プロピニルウラシル、5-プロピニルシトシン、5-アミノメチルウラシル、5-ヒドロキシメチルウラシル、5-アミノメチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、Super T）、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、7-アザ-2, 6-ジアミノプリン、8-アザ-7-デアザグアニン、8-アザ-7-デアザアデニン、8-アザ-7-デアザ-2, 6-ジアミノプリン、Super G、Super A、およびN<sub>4</sub>-エチルシトシン、もしくはその誘導体；N<sub>2</sub>-シクロペンチルグアニン（cPent-G）、N<sub>2</sub>-シクロペンチル-2-アミノプリン（cPent-A P）、およびN<sub>2</sub>-プロピル-2-アミノプリン（Pr-A P）、プソイドウラシルもしくはその誘導体；ならびに縮重塩基もしくはユニバーサル塩基、2, 6-ジフルオロトレンもしくは脱塩基部位のような非存在塩基（例えば1-デオキシリボース、1, 2-ジデオキシリボース、1-デオキシ-2-O-メチルリボース；または環酸素が窒素で置き換えられたピロリジン誘導体（アザリボース））が挙げられる。Super A、Super GおよびSuper Tの誘導体の例は、米国特許第6, 683, 173号（Epoch Biosciences）に見出すことができる。cPent-G、cPent-A PおよびPr-A Pは、siRNAに取り込まれると免疫刺激性作用を低減させることが示された（Peacock H. et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200）。プソイドウラシルは、ウラシルの天然に存在する異性化バージョンであり、これは、ウリジンの場合のような規則的なN-配糖体というよりC-配糖体である。プソイドウリジンを含む合成mRNAは、ウリジンを含むmPvNAと比較して改善された安全性プロファイルを有する場合がある（WO2009127230を参照）。

10

20

【0124】

ある特定の改変または置換された核酸塩基は、本発明のAONの結合親和性を増加させるのに特に有用である。これらの例としては、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンを含む、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジンならびにN-2、N-6およびO-6置換プリンが挙げられる。5-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖の安定性を0.6~1.2℃増加させることが示されており、これが現在のところ好ましい塩基置換であり、さらにより具体的には、2'-O-メトキシエチル糖改変と組み合わせた場合、好ましい塩基置換である。

30

【0125】

一部の実施形態において、改変または置換された核酸塩基は、AONの精製を容易にするために有用である。例えば、ある特定の実施形態において、AONは、3個またはそれより多くの（例えば、3、4、5、6またはそれより多くの）連続したグアニン塩基を含有していてもよい。ある特定のAONにおいて、一連の3個またはそれより多くの連続したグアニン塩基は、オリゴヌクレオチドの凝集を生じさせる可能性があり、精製を複雑にする。このようなAONにおいて、連続したグアニンの1つまたは複数は、イノシンで置換してもよい。一連の3個またはそれより多くの連続したグアニン塩基における1個または複数のグアニンのイノシンでの置換は、AONの凝集を低減させることができ、それによって精製を容易にする。

40

【0126】

一実施形態において、AONの別の改変は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分布または細胞内取り込みを強化する1種もしくは複数の部分またはコンジュゲートをオリゴヌクレオチドに化学的に結合することを含む。このような部分としては、これらに限定されないが、脂質部分、例えば、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、例えば、ヘキシル-5-トリチルチオール、チオコレステロール、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基、リン脂質、例えば、ジヘキサデシル-rac-グリセロールも

50

しくはトリエチルアンモニウム 1, 2-ジ-*O*-ヘキサデシル-*rac*-2,6-glycerol-3-*H*-ホスホネート、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖、またはアダマンタン酢酸、パルミチル部分、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノカルボニルオキシコレステロール部分が挙げられる。

【0127】

必ずしも所与の化合物における全ての位置について均一に改変される必要はなく、実際に、前述の改変の1つより多くが、単一の化合物中に取り込まれていてもよいし、またはさらにはオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオシドに取り込まれていてもよい。本発明はまた、キメラ化合物である AON も含む。「キメラ」アンチセンス化合物または「キメラ」は、この発明の文脈において、それぞれ少なくとも1つの単量体単位で、すなわちオリゴヌクレオチド化合物のケースではヌクレオチドで構成された2つまたはそれより多くの化学的に別個の領域を含有するアンチセンス分子、具体的にはオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的には、オリゴヌクレオチドが、ヌクレアーゼ分解に対する抵抗の増加に、細胞内取り込みの増加を付与するように改変された少なくとも1つの領域と、標的核酸に対する結合親和性の増加のための追加の領域とを含有する。

10

【0128】

本発明に従って使用されるアンチセンス分子は、都合よく、さらに慣例的に、周知の固相合成技術によって作製することができる。このような合成のための装置は、例えば、Applied Biosystems (Foster City, Calif.) を含むいくつかの業者によって販売されている。改変された固体支持体上にオリゴヌクレオチドを合成するための1つの方法は、米国特許第 4, 458, 066 号に記載されている。

20

【0129】

別の非限定的な例において、このような AON は、ヌクレオチドの少なくとも1つ、または全てが、2' 低級アルキル部分（例えば、 $C_1 \sim C_4$  の直鎖または分岐鎖の、飽和または不飽和のアルキル、例えばメチル、エチル、エテニル、プロピル、1-プロペニル、2-プロペニル、およびイソプロピルなど）を含有する分子である。例えば、ヌクレオチドの一つ置きが、記載される通りに改変されていてもよい。

【0130】

上記の AON は本発明の AON の好ましい形態であるが、本発明は、以下に記載されるようなオリゴマー模倣物を含むがこれに限定されない、他のオリゴマーアンチセンス分子が挙げられる。

30

【0131】

改変されたオリゴマーはまた、1つまたは複数の置換された糖部分を含有していてもよい。オリゴマーはまた、核酸塩基（当技術分野では単に「塩基」と称されることが多い）の改変または置換も含んでいてもよい。ある特定の核酸塩基が、本発明のオリゴマー化合物の結合親和性を増加させるために特に有用である。これらとしては、2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシルおよび5-プロピニルシトシンを含む、5-置換ピリミジン、6-アザピリミジン、ならびに N-2、N-6 および O-6 置換プリンが挙げられる。5-メチルシトシン置換は、さらにより具体的には 2'-*O*-メトキシエチル糖改変と組み合わせた場合、核酸二重鎖の安定性を 0.6 ~ 1.2 °C 増加させることが示されている。一実施形態において、オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのピリミジン塩基は、5-置換ピリミジン塩基を含み、この場合、ピリミジン塩基は、シトシン、チミンおよびウラシルからなる群から選択される。一実施形態において、5-置換ピリミジン塩基は、5-メチルシトシンである。別の実施形態において、オリゴヌクレオチドの少なくとも1つのプリン塩基は、N-2、N-6 置換プリン塩基を含む。一実施形態において、N-2、N-6 置換プリン塩基は、2, 6-ジアミノプリンである。

40

【0132】

一実施形態において、AON は、単独で、または別の改変、例えば 2'-*O*-メトキシエチル糖改変と組み合わせて、1つまたは複数の 5-メチルシトシン置換を含む。さらに別の実施形態において、AON は、単独で、または別の改変と組み合わせて、1つまたは

50

複数の 2, 6-ジアミノプリン置換を含む。

#### 【0133】

一部の実施形態において、AONは、1つまたは複数の部分、例えばポリエチレングリコール部分、あるいはAONの活性、細胞分布、または細胞内取り込みを強化するアルギニンリッチな細胞透過性ペプチドなどのコンジュゲートと化学的に結合される。例示的な実施形態の一つにおいて、アルギニンリッチなポリペプチドは、そのN末端またはC末端残基で共有結合により、アンチセンス化合物の3'または5'末端にカップリングされる。また例示的な実施形態において、アンチセンス化合物は、モルホリノサブユニットと、1つのサブユニットのモルホリノの窒素を隣接するサブユニットの5'の環外の炭素に繋ぐリン含有サブユニット間結合とでも構成される。

10

#### 【0134】

別の態様において、本発明は、上記のAON、例えば配列番号1~34のAONを取り込む発現ベクターを提供する。一部の実施形態において、発現ベクターは、改変レトロウイルスまたは非レトロウイルスベクター、例えばアデノ随伴ウイルスベクターである。

#### 【0135】

AONの活性を測定するためのアッセイ

AONおよびそのバリエーションの活性は、当技術分野における慣例的な技術に従ってアッセイすることができる。例えば、調査されたRNAおよびタンパク質のアイソフォームの形態および発現レベルは、転写された核酸またはタンパク質のアイソフォームおよび／または発現を検出するための様々な周知の方法のいずれかによって評価することができる。このような方法の非限定的な例としては、RNAのアイソフォームのRT-PCRとそれに続くPCR産物のサイズ分離、核酸ハイブリダイゼーション方法、例えば、ノーザンブロットおよび／または核酸アレイの使用；細胞の内部のRNA転写物を検出するための蛍光インサイチュハイブリダイゼーション；核酸増幅方法；タンパク質の検出のための免疫学的な方法；タンパク質精製方法；およびタンパク質の機能または活性アッセイが挙げられる。

20

#### 【0136】

RNA発現レベルは、細胞、組織または生物からRNA/cDNA（すなわち、転写されたポリヌクレオチド）を調製することによって、さらに、RNA/cDNAを、アッセイされる核酸またはその断片の相補体である参照ポリヌクレオチドとハイブリダイズすることによって評価することができる。cDNAは、必要に応じて、相補的なポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの前に、様々なポリメラーゼ連鎖反応または*in vitro*の転写方法のいずれかを使用して増幅してもよい；好ましくは、cDNAは、増幅されない。1種または複数の転写物の発現はまた、定量PCRを使用して検出して、転写物の発現のレベルを評価することもできる。

30

#### 【0137】

AONを製造する方法

本発明に従って使用されるAONは、固相合成の周知の技術を介して都合よく作製することができる。このような合成のための装置は、例えば、Applied Biosystems (Foster City, Calif.)などのいくつかの業者によって販売されている。改変された固体支持体上にオリゴマーを合成するための1つの方法は、米国特許第4,458,066号に記載されている。

40

#### 【0138】

当技術分野において公知のこのような合成のための他のあらゆる手段が、加えて、またはあるいは採用することができる。ホスホロチオエートやアルキル化された誘導体などのオリゴマーを調製するために、類似の技術を使用することが周知である。1つのこのような自動化された実施形態において、ジエチルホスホロアミダイトが発発材料として使用され、Beaucage, et al., (1981) Tetrahedron Letters, 22:1859-1862によって記載される通りに合成することができる。

#### 【0139】

50

本発明のAONは、*in vitro*で合成され、生物学的な起源のアンチセンス組成物も、*in vivo*におけるアンチセンスオリゴマーの合成を指示するように設計された遺伝子ベクター構築物も含まない。本発明の分子はまた、取り込み、分布および／または吸収において助けになるように、例えば、リポソーム、受容体標的化分子、経口、直腸、局所用製剤または他の製剤のように、他の分子、分子構造物または化合物の混合物と混合されていてもよいし、それらと共に封入されていてもよいし、それらとコンジュゲートされていてもよいし、またはそれ以外の方法でそれらと関連付けられていてもよい。

【0140】

ベクター

また、本発明のオリゴマーFUS-標的化配列を発現することが可能なベクター送達系も挙げられ、例えば、本明細書に記載される配列番号1～34のいずれか1つまたは複数を含むポリヌクレオチド配列を発現するベクターである。

【0141】

「ベクター」または「核酸構築物」は、ポリヌクレオチドを挿入またはクローニングできるポリヌクレオチド分子、好ましくはDNA分子、例えばプラスミド、バクテリオファージ、酵母またはウイルス由来のものを意味する。ベクターは、好ましくは、1つまたは複数の固有な制限部位を含有し、標的細胞もしくは組織またはそれらの前駆細胞もしくは組織などの規定の宿主細胞において自律複製が可能であるか、またはクローニングされた配列が複製可能になるように規定の宿主のゲノムとの統合が可能である。

【0142】

したがって、ベクターは、自律複製型ベクター、すなわち染色体外の実体として存在し、その複製が染色体の複製から独立しているベクター、例えば、直鎖状または閉環プラスミド、染色体外のエLEMENT、ミニ染色体、または人工染色体であってもよい。ベクターは、自己複製を確実にするためのあらゆる手段を含有していてもよい。あるいは、ベクターは、宿主細胞に導入されたら、ゲノムに組み込まれ、それが組み込まれた染色体（複数可）と共に複製されるものであってもよい。

【0143】

C. 処置方法

本発明のAONはまた、疾患の処置の目的のために利用することができる予防剤または治療剤としても使用することができる。したがって、一実施形態において、本発明は、医薬的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と混合された、治療有効量での、FUSプレmRNAおよびmRNAにおける選択された標的に結合して、本明細書に記載されるFUSの発現を低減させるAONを提供する。

【0144】

病原性FUSバリエントは、FUSの細胞質内の誤った局在化、スプライシング欠陥、DNA傷害、細胞ストレス応答の変更をもたらす得る。理論に縛られることはないが、この発明のAONの投与を介して病原性バリエントを含有するFUS mRNAの発現を減少させることは、FUSの細胞質内凝集および他のFUS関連の病状の低減をもたらすことができる。

【0145】

「有効量」または「治療有効量」は、所望の治療作用を生じさせるのに有効な、単回用量または一連の用量の一部のいずれかとして哺乳動物対象に投与されるアンチセンスオリゴマーなどの治療化合物の量を指す。

【0146】

それゆえに本発明は、FUS病原性バリエントに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための医薬、予防、または治療用組成物であって、

a) 1種または複数の本明細書に記載されるAON、ならびに

b) 1種または複数の医薬的に許容される担体および／または希釈剤

を含む組成物を提供する。

【0147】

10

20

30

40

50

好ましくは、FUS 病原性バリエーションに関連する疾患は、ALS または FTD である。

【0148】

また、FUS タンパク質症に関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための方法であって、有効量の本明細書に記載される 1 種もしくは複数の AON または 1 種もしくは複数の AON を含む医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法も提供される。

【0149】

また、FUS-ALS または FUS-FTD の作用を処置する、防止する、または緩和するための方法であって、有効量の本明細書に記載される 1 種もしくは複数の AON または 1 種もしくは複数の AON を含む医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法も提供される。

10

【0150】

本発明の方法は、FUS タンパク質症に関連する疾患およびそれらの症状を処置する、防止する、またはその進行を減速させるための追加の処置と組み合わせて投与することができる。追加の処置は、FUS タンパク質症に関連する疾患に関連する他の標的に向けられた AON を含んでいてもよい。例えば、追加の処置は、SOD1 に方向付けられる AON を含んでいてもよい。

【0151】

さらなる態様において、遺伝子バイオマーカーまたは他のバイオマーカーは、本発明の AON を介して FUS 抑制によく応答する可能性が最も高い患者を同定するのに使用することができる。ALS 疾患のリスクに関連する遺伝子の構造的な変種が、ALS 遺伝子および周囲の遺伝子領域内で同定された。これらの変種は、この発明の方法に応答する可能性がある患者を同定するための遺伝子バイオマーカーとして使用することができる。非遺伝子バイオマーカーも、この発明の方法に応答する可能性がある患者を同定するために使用することができる。

20

【0152】

本発明は、バイオマーカーによって同定された対象における ALS、FTD の作用を処置する、防止する、または緩和するための方法であって、

a) FUS 抑制に応答する可能性がある ALS 患者に関連するバイオマーカーの存在に関して、対象を試験するステップ；および

30

b) 対象がバイオマーカーを発現することが見出される場合、有効量の本明細書に記載される 1 種もしくは複数の AON または 1 種もしくは複数の AON を含む医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。

【0153】

また、FUS 病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための本明細書に記載される精製および単離された AON の使用も本明細書で提供される。

【0154】

また、ALS、FTD の作用を処置する、防止する、または緩和するための本明細書に記載される精製および単離された AON の使用も本明細書で提供される。

40

【0155】

好ましくは、本発明で使用される AON は、表 1 または 2 に提供される AON のリストから選択されるか、またはより好ましくは、配列番号 1 ~ 12 から選択される。

【0156】

本発明はまた、(1) 病原性変種を含有する FUS 対立遺伝子 (配列番号 1 ~ 34) の発現を低減させて、FUS 病原性バリエーションに関連する疾患の影響を低減させるように設計された AON の組合せを含む処置の方法も提供する。一実施形態において、本発明は、FUS-ALS または FUS-FTD に関連する疾患に罹っている対象における FUS タンパク質症を緩和するための手段を提供することを目的とする。

50

## 【0157】

組成物は、約1 nM～1000 μMの本発明の所望のアンチセンスオリゴマー（複数可）のそれぞれを含んでいてもよい。好ましくは、組成物は、約1 μM～500 μM、10 μM～500 μM、50 μM～750 μM、10 μM～500 μM、1 μM～100 μM、1 μM～50 μM、好ましくは25 μM～100 μMの本発明のアンチセンスオリゴマー（複数可）のそれぞれを含んでいてもよい。組成物はまた、好ましくは、約1 nM～500 nM、10 nM～500 nM、50 nM～750 nM、10 nM～500 nM、1 nM～100 nM、1 nM～50 nM、最も好ましくは50 nM～100 nMの本発明のアンチセンスオリゴマー（複数可）のそれぞれを含んでいてもよい。

## 【0158】

組成物は、約1 nM、2 nM、3 nM、4 nM、5 nM、6 nM、7 nM、8 nM、9 nM、10 nM、20 nM、50 nM、75 nM、100 nM、150 nM、200 nM、250 nM、300 nM、350 nM、400 nM、450 nM、500 nM、550 nM、600 nM、650 nM、700 nM、750 nM、800 nM、850 nM、900 nM、950 nMまたは1000 nMの本発明の所望のアンチセンスオリゴマー（複数可）のそれぞれを含んでいてもよい。

## 【0159】

本発明はさらに、対象への送達に好適な形態での、FUS病原性変種に関連する疾患または病状の症状の予防的または治療的処置、防止または緩和に役立つように適合させた1種または複数のAONを提供する。

## 【0160】

語句「医薬的に許容される」は、生理学的に許容され、典型的には、対象に投与したときにアレルギー性反応または同様に好ましくない反応、例えば胃の不調などを引き起こさない分子実体および組成物を指す。用語「担体」は、化合物が共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。このような医薬用担体は、滅菌された液体、例えば水および、石油、動物性、植物性または合成由来の油を含む油、例えば落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などであってもよい。担体として、具体的には注射用液剤のために、好ましくは水または食塩液ならびに水性デキストロースおよびグリセロール溶液が採用される。好適な医薬用担体は、Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990)に記載されている。

## 【0161】

1種または複数のAONを含む医薬組成物は、処置レジメンの範囲内で対象に投与することができる。例えば、医薬組成物は、1時間毎、毎日3回、毎日2回、毎日1回、2日毎に1回、3日毎に1回、毎週1回、2週毎に1回、毎月1回、2ヶ月毎に1回、6ヶ月毎に1回、および毎年1回、投与することができる。適切なレジメンは、処置しようとする状態の性質に基づき当業者によって決定することができる。

## 【0162】

## D. 医薬の製造

一実施形態において、本発明は、FUS病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための医薬を製造するための、FUS RNA中の選択された標的に結合するAONの使用を提供する。したがって、FUS病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための医薬を製造するための、本明細書に記載される1種または複数のAONの使用が提供される。好ましくは、疾患は、ALSまたはFTDである。

## 【0163】

本発明は、FUS病原性バリエーションに関連する疾患に関連する疾患（a disease associated with a disease associated with）の作用を処置する、防止する、または緩和するための医薬を製造するための、本明細書に記載される（according as described herein）精製および単離されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を提供する。

## 【0164】

本発明はまた、ALSまたはFTDの作用を処置する、防止する、または緩和するための医薬を製造するための、本明細書に記載される精製および単離されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用も提供する。

## 【0165】

また、FUS抑制に応答する可能性がある患者に関連するバイオマーカーを発現する対象における、FUS病原性バリエーションに関連する疾患の作用を処置する、防止する、または緩和するための医薬を製造するための、本明細書に記載される1種または複数のAONの使用も提供される。

## 【0166】

好ましくは、医薬を製造するために使用されるAONは、表1または2に提供されるAONのリストから選択されるか、またはより好ましくは、配列番号1~12から選択される。好ましくは、AONは、配列番号2、4、5、8および11である。

## 【0167】

## E. 医薬組成物

本発明の一形態において、医薬的に許容される希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント、および／または担体と共に、治療有効量の1種または複数の本発明のAONを含む医薬組成物が提供される。このような組成物は、様々な緩衝液内容物（例えば、トリスHCl、酢酸塩、リン酸塩）、pHおよびイオン強度の希釈剤、ならびに洗浄剤および可溶化剤（例えば、Tween（登録商標）80、Polysorbate 80）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、保存剤（例えば、チメロサル（Thimersol）、ベンジルアルコール）ならびに増量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）などの添加剤を含む。材料は、例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸などのポリマー化合物の微粒子調製物に取り込まれていてもよいし、またはリポソームに取り込まれていてもよい。ヒアルロン酸（Hyaluronic acid）も使用することができる。このような組成物は、全身の状態、安定性、in vivoにおける放出速度、ならびに存在しているタンパク質および誘導体のin vivoにおけるクリアランスの速度に影響を与える可能性がある。例えば、参照により本明細書に組み入れられるMartin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) pages 1435-1712を参照されたい。組成物は、液体形態で調製されてもよいし、または乾燥粉末の形態であってもよいし、例えば凍結乾燥形態であってもよい。

## 【0168】

本発明により提供される医薬組成物は、当技術分野において公知のあらゆる手段によって投与できることが理解される。好ましくは、投与のための医薬組成物は、注射によって、経口的に、局所的に、または肺もしくは鼻の経路によって投与される。AONは、より好ましくは、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内または皮下の投与経路によって送達される。適切な経路は、処置下の対象の状態にとって適切にように当業者によって決定することができる。血管または血管外の循環、血液またはリンパ系、および脳脊髄液が、AONを導入することができる一部の非限定的な部位である。直接のCNS送達を採用されてよく、例えば、脳室内または髄腔内投与が投与経路として使用されてよい。

## 【0169】

局所投与のための製剤としては、本開示のオリゴマーが、脂質、リポソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート剤および界面活性剤などの局所送達剤と混和されているものが挙げられる。脂質およびリポソームとしては、中性（例えば、ジオレオイルホスファチジルDOPEエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルコリンDMP C、ジステアロイルホスファチジル（distearolyphosphatidyl）コリン）、陰性（例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロールDMP G）およびカチオン性（例えば、ジオレオイルテトラメチルアミノプロピルDOTAPおよびジオレオイルホスファチジルエタノールアミンDOTMA）が挙げられる。局所または他の投与の場合、本開示のオ

10

20

30

40

50

リゴマーは、リボソーム内に封入されていてもよいし、またはそれとの、特にカチオン性リボソームとの複合体を形成していてもよい。あるいは、オリゴマーは、脂質と、特にカチオン脂質と複合体化されていてもよい。脂肪酸およびエステル、それらの医薬的に許容される塩、ならびにそれらの使用は、1999年5月20日に出願された米国特許第6,287,860号および／または米国特許出願第09/315,298号にさらに記載されている。

#### 【0170】

ある特定の実施形態において、本開示のAONは、経皮による方法によって送達することができる（例えば、例えばエマルジョンにAONを取り込むことを介してなされ、このようなAONは、必要に応じてリボソームに詰め込まれる）。このような経皮およびエマル

10

#### 【0171】

本明細書に記載されるAONはまた、埋め込み可能なデバイスを介して送達することもできる。このようなデバイスの設計は、例えば米国特許第6,969,400号に記載される、例えば合成インプラント設計を用いる、当技術分野で認識されているプロセスである。

#### 【0172】

経口投与のための組成物および製剤としては、散剤または顆粒剤、マイクロ粒子剤、ナノ粒子剤、水または非水性媒体中の懸濁剤または液剤、カプセル剤、ゲルカプセル剤、サシェ、錠剤またはミニ錠剤が挙げられる。増粘剤、矯味矯臭剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤または結合剤が望ましい場合もある。経口製剤は、本開示のオリゴマーが1種または複数の浸透促進剤、界面活性剤およびキレート化剤と併せて投与されるものである。界面活性剤としては、脂肪酸および／またはそのエステルもしくは塩、胆汁酸および／またはその塩が挙げられる。胆汁酸／塩および脂肪酸ならびにそれらの使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載されている。一部の実施形態において、本開示は、浸透促進剤の組合せ、例えば胆汁酸／塩と組合せた脂肪酸／塩を提供する。例示的な組合せは、ラウリン酸、カプリン酸およびUDCAのナトリウム塩である。さらなる浸透促進剤としては、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-20-セチルエーテルが挙げられる。本開示のオリゴマーは、噴霧された乾燥粒子を含む顆粒形態で、経口で送達されてもよいし、または複合体化されてマイクロ粒子またはナノ粒子を形成してもよい。オリゴマー複合体化剤およびその使用は、米国特許第6,287,860号にさらに記載されている。オリゴマーおよびその調製物のための経口製剤は、1999年5月20日に出願されたUS6,887,906、09/315,298および／またはUS20030027780で詳細に記載される。

20

30

#### 【0173】

非経口、髄腔内または脳室内投与のための組成物および製剤としては、滅菌水溶液を挙げることができる。これは、バッファー、希釈剤、ならびにこれらに限定されないが、浸透促進剤、担体化合物および他の医薬的に許容される担体または賦形剤などの他の好適な添加剤も含有していてもよい。

40

#### 【0174】

治療上有用な量のAONの送達は、これまでに公開された方法によって達成することができる。例えば、AONの細胞内送達は、AONと有効量のブロックコポリマーとの混和物を含む組成物を介していてもよい。この方法の例は、米国特許出願US20040248833に記載されている。AONの核への他の送達方法は、Mann CJ et al. (2001) Proc, Natl. Acad. Science, 98(1) 42-47、およびGebbski et al. (2003) Human Molecular Genetics, 12(15): 1801-1811に記載されている。裸のDNAとしての、または脂質担体へ複合体化されるかのいずれかの発現ベクターによって細胞に核酸分子を導入するための方法は、US6,806,084に記載されている。

50

## 【0175】

ある特定の実施形態において、本発明のAONおよびそれを含む治療用組成物は、経皮による方法によって送達することができる（例えば、AONを、例えばエマルジョンに取り込むことにより、このようなAONは、必要に応じてリポソームに詰め込まれる）。このような経皮およびエマルジョン／リポソームによって媒介される送達方法は、当技術分野におけるAONの送達に関して記載されており、例えば米国特許第6,965,025号に記載されている。

## 【0176】

コロイド分散系中のAONを送達することが望ましい場合がある。コロイド分散系としては、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームまたはリポソーム配合物を含む脂質ベースの系が挙げられる。これらのコロイド分散系は、治療用医薬組成物の製造に使用することができる。

10

## 【0177】

リポソームは、人工膜小胞であり、これは、*in vitro*および*in vivo*における送達媒体として有用である。これらの配合物は、正味のカチオン性、アニオン性、または中性電荷特徴を有していてもよく、*in vitro*、*in vivo*および*ex vivo*の送達方法にとって有用な特徴を有する。大型単層小胞は、大きい巨大分子を含む水性緩衝液を実質的なパーセンテージで封入できることが示されている。RNAおよびDNAは、水性内部内に封入され、生物学的に活性な形態で細胞に送達され得る（Fraleigh, et al., 1981, Trends Biochem. Sci., 6, 77）。

20

## 【0178】

リポソームが効率的な遺伝子移入媒体であるために、以下の特徴が存在するべきである：（1）その生物学的活性を弱めずに高い効率で目的のAONを封入していること；（2）非標的細胞と比較して標的細胞に優先的に実質的に結合していること；（3）高い効率での標的細胞の細胞質への小胞の水性内容物の送達；および（4）遺伝情報の正確で有効な発現（Mannino, et al., 1988 Biotechniques, 6, 682）。リポソームの組成は、通常、リン脂質、特に高い相転移温度のリン脂質と、通常、ステロイド、特にコレステロールとの組合せである。他のリン脂質または他の脂質も使用してよい。リポソームの物理特性は、pH、イオン強度、および2価カチオンの存在に依存する。カチオン性リポソームは、正に荷電したリポソームであり、これは、負に荷電したDNA分子と相互作用して安定な複合体を形成すると考えられる。pH感受性であるかまたは負に荷電したリポソームは、それと複合体化するというよりDNAを取り込むと考えられる。カチオン性および非カチオン性リポソームはどちらも、DNAを細胞に送達するのに使用されてきた。

30

## 【0179】

リポソームとしてはまた、「立体的に安定化された」リポソームも挙げられ、この用語は、本明細書で使用される場合、リポソームに取り込まれると、このような特殊化した脂質が欠如したリポソームと比べて循環中の寿命の強化をもたらす1種または複数の特殊化した脂質を含むリポソームを指す。立体的に安定化されたリポソームの例は、リポソームの小胞形成脂質部分の一部が1つまたは複数の糖脂質を含むものか、または1種または複数の親水性ポリマー、例えばポリエチレングリコール（PEG）部分で誘導体化されているものである。リポソームおよびその使用は、US 6,287,860にさらに記載されている。

40

## 【0180】

AONは、当技術分野で認識されている技術（例えば、トランスフェクション、電気穿孔、融合、リポソーム、コロイド状のポリマー粒子およびウイルスおよび非ウイルスベクター、加えて当技術分野において公知の他の手段）を使用して細胞に導入することができる。選択される送達方法は、少なくとも処置しようとする細胞および細胞の位置に依存し、当業者には明らかである。例えば、局在化は、リポソームを方向付けるために表面上に

50

特異的なマーカーを有するリポソーム、標的細胞を含有する組織への直接注射、特異的な受容体によって媒介される取り込みなどによって達成することができる。

【0181】

当技術分野で公知の通り、AONは、例えば、リポソームによって媒介される取り込み、脂質コンジュゲート、ポリリジンによって媒介される取り込み、ナノ粒子によって媒介される取り込み、および受容体によって媒介されるエンドサイトーシスを含む方法、加えて、追加のエンドサイトーシスではない送達様式、例えばマイクロインジェクション、透過処理（例えば、ストレプトリジン-O透過処理、アニオン性ペプチド透過処理）、電気穿孔、ならびに当技術分野において公知の様々な非侵襲的なエンドサイトーシスではない送達方法（その全体が参照により組み入れられるDokka and Rojanasakul, Advanced Drug Delivery Reviews 44, 35-49を参照）を使用して送達することができる。

10

【0182】

AONはまた、他の医薬的に許容される担体または希釈剤と組み合わせて、医薬組成物を生産してもよい。好適な担体および希釈剤としては、等張食塩液、例えばリン酸緩衝食塩水が挙げられる。組成物は、非経口、筋肉内、静脈内、皮下、眼球内、経口、または経皮投与のために製剤化されてもよい。

【0183】

記載される投与経路は単なるガイドとして意図されるにすぎず、熟練した技術者であれば、いずれの特定の動物および状態に対しても最適な投与経路およびあらゆる投与量を容易に決定することができる。

20

【0184】

*in vitro*と*in vivo*の両方において細胞に機能的な新しい遺伝物質を導入するための複数のアプローチが試みられてきた（Friedmann (1989) Science, 244, 1275-1280）。これらのアプローチとしては、改変レトロウイルスへの発現させる遺伝子の組み込み（Friedmann (1989)前掲; Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18), suppl.: 5074S-5079S）; 非レトロウイルスベクターへの組み込み（Rosenfeld, et al. (1992) Cell, 68, 143-155; Rosenfeld, et al. (1991) Science, 252, 431-434）; またはリポソームを介した異種プロモーター-エンハンサーエレメントに結合された導入遺伝子の送達（Friedmann (1989)、前掲; Brigham, et al. (1989) Am. J. Med. Sci., 298, 278-281; Nabel, et al. (1990) Science, 249, 1285-1288; Hazinski, et al. (1991) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4:206-209; およびWang and Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84, 7851-7855）; リガンド特異的なカチオンベースの輸送系へのカップリング（Wu and Wu (1988) J. Biol. Chem., 263, 14621-14624）または裸のDNA、発現ベクターの使用（Nabel et al. (1990)、前掲）; Wolff et al. (1990) Science, 247, 1465-1468）が挙げられる。組織への導入遺伝子の直接注射は、発現の局在化のみを生じる（Rosenfeld (1992)前掲; Rosenfeld et al. (1991)前掲; Brigham et al. (1989)前掲; Nabel (1990)前掲; およびHazinski et al. (1991)前掲）。Brigham et al. group ((1989) Am. J. Med. Sci. 298, 278-281およびClinical Research (1991) 39 (要約))は、DNAリポソーム複合体の静脈内または気管内投与のいずれかの後のマウス肺のみの*in vivo*でのトランスフェクションを報告している。ヒトの遺伝子治療手順の総論論文の例は、Anderson, (1992) Science 256, 808-813; Barteau et al. (2008), Curr Gene Ther., 8(5), 313-23; Mueller et al. (2008). Clin Rev Allergy Immunol., 35(3), 164-78; Li et al. (2006) Gene Ther., 13(18), 1313-9; Simoes et al. (2005) Expert Opin Drug Deliv., 2(2), 237-54である。

30

40

【0185】

本発明のAONは、ヒトを含む動物に投与されると、生物学的に活性な代謝産物または

50

その残留物を提供すること（直接的または間接的に）が可能な、あらゆる医薬的に許容される塩、エステル、またはこのようなエステルの塩、または他のあらゆる化合物を包含する。したがって、一例として、本開示はまた、本発明の化合物のプロドラッグおよび医薬的に許容される塩、このようなプロドラッグの医薬的に許容される塩、ならびに他の生物学的に同等なものも対象にする。

#### 【0186】

用語「医薬的に許容される塩」は、本発明の化合物の生理学的および医薬的に許容される塩：すなわち、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、それに望ましくない毒物学的作用を付与しない塩を指す。オリゴマーの場合、医薬的に許容される塩の好ましい例としては、これらに限定されないが、（a）ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウムなどのカチオン、スペルミンおよびスペルミジンなどのポリアミンなどと形成された塩；（b）例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸などの無機酸と形成された酸付加塩；（c）例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、タンニン酸、パルミチン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ポリガラクトロン酸などの有機酸と形成された塩；ならびに（d）元素のアニオン、例えば塩素、臭素、およびヨウ素から形成された塩が挙げられる。本発明の医薬組成物は、局所または全身性の処置のどちらが望ましいかに応じて、さらに処置しようとする領域に応じて、いくつかの方法で投与することができる。投与は、局所であってもよいし（眼および粘膜、加えて直腸送達を含む）、例えば、粉末またはエアロゾルの吸入または通気（ネブライザー、気管内、鼻腔内、表皮および経皮によるなど）による肺であってもよいし、経口または非経口投与であってもよい。非経口投与としては、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注射または輸注；または頭蓋内、例えば、髄腔内もしくは脳室内投与が挙げられる。経口投与の場合、少なくとも1つの2'-O-メトキシエチル改変を有するオリゴマーが特に有用であると考えられる。好ましくは、AONは、皮下または静脈内経路を介して送達される。

#### 【0187】

本発明の医薬製剤は、単位剤形で都合よく提供することができ、これは、医薬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る。このような技術は、活性成分を医薬用担体（複数可）または賦形剤（複数可）と会合させるステップを含む。一般的に、製剤は、活性成分を液体担体もしくは微粉化した固体担体またはその両方と均一にかつ密接に会合させ、次いで必要に応じて生成物を成形することによって調製される。

#### 【0188】

以下の実施例は、単なる例示であると解釈されるものとし、本開示の残りの部分をいかなるようにも限定しない。これらの実施例は、単に本発明を例示する目的のために含まれる。これらは、上記で詳述した本発明の広範な要約、開示または説明に対する限定として理解されるべきではない。さらなる推敲なしで、当業者であれば前述の説明を使用して本発明を最大限利用できると考えられる。前述のおよび以下の実施例において、全ての温度は、未補正のセルシウス度で記載され；別段の指定がない限り、全ての部分（part）およびパーセンテージは重量による。

#### 【実施例】

#### 【0189】

##### （実施例1）

#### 実験戦略

#### 背景

集団中で高頻度で発生するFUS遺伝子における共通バリエント（CV）の選択が選択された戦略が採用された。各CVにつき、AONは、各対立遺伝子への選択性を最大化するように最適化することができる。CVを標的とした対立遺伝子特異的なAON治療によって好適になるように、患者は、選択されたCVのうち1つに関してヘテロ接合型である必要があるはずである。FUSにおいて病原性バリエントが確認された患者のDNAを配

列決定して、FUS遺伝子中の選択されたCVにおけるその遺伝子型を決定することができた。ロングリードシーケンシングまたは他の方法を利用して、そのヘテロ接合型CVに関連してその病原性バリエーションが遭遇する対立遺伝子を決定することができた。次いで、病原性バリエーションを含む対立遺伝子を選択的にノックダウンすることになる適切なCV標的化AONを患者のために選択することができた。これは、ほんの一握りのAONのうち1つが、FUS-ALSまたはFUS-FTD患者の大部分を処置するのに適用可能である可能性があるということの意味することにある。CVの1つに関してヘテロ接合型ではないものには、両方の対立遺伝子を等しくノックダウンする代替のFUS標的化AON処置を提供することができた。

【0190】

FUS共通バリエーション分析

【0191】

ほとんどの共通タイプのバリエーションは、ゲノム中に単一の塩基の変化が存在する一塩基多型（SNP）である。イントロンではなくFUSのエクソン内に配置されているCVを選択することで、スクリーニングに使用された細胞株における分析をより簡単にした（これは、病原性FUSバリエーションを含むしない）。

【0192】

FUSにおける共通バリエーションを、1000人ゲノムプロジェクトからのデータを使用して分析した。FUS遺伝子のエクソン領域中に3つのCVが存在した。エクソン3中の同義のバリエーション（CV1）、エクソン4中の同義のバリエーション（CV2）およびエクソン15の3'非翻訳領域中のSNP（CV3）。表3において、rs数、ヌクレオチド、マイナー対立遺伝子頻度、および各バリエーションに関してヘテロ接合型であるデータセット中の人の比率を見ることができる。

【0193】

【表3】

表3: 1000人ゲノムプロジェクトのデータセットからの共通のFUSのエクソンバリエーションに関してヘテロ接合型の集団の特徴および比率。

MAFは1000人ゲノムデータセットにおけるマイナー対立遺伝子頻度である。

MAF(最大)は、1000人ゲノムフェーズ3、ESPおよびgnomADを含む任意の集団において報告された最大のマイナー対立遺伝子頻度である。

|     | RS数       | Loc   | Var | タイプ | MAF<br>(全て) | MAF<br>最大 | Het %<br>(全て) |
|-----|-----------|-------|-----|-----|-------------|-----------|---------------|
| CV1 | rs741810  | エクソン3 | C/A | syn | 0.28        | 0.49      | 32.8          |
| CV2 | rs1052352 | エクソン4 | C/T | syn | 0.47        | 0.49      | 41.6          |
| CV3 | rs4889537 | 3'UTR | G/C | SNP | 0.28        | 0.49      | 33.2          |

【0194】

1000人ゲノムデータセット中の個体のそれぞれの遺伝子型を、SPSSを使用して分析して、選択されたFUS CVのうち1または2に関してヘテロ接合型であった各集団中の人の比率を決定した。全ての集団が、CV1またはCV3ではなくCV2に関してヘテロ接合型である人のより高い比率を有していた。欧州人、米国人およびアジア人の集団では、差は小さかったが、アフリカ人の集団では、CV1およびCV3のマイナー対立遺伝子頻度がより一層小さいため、大きい差があった。全ての3つのバリエーションは互いに連鎖不平衡（LD）の状態であるが、CV1およびCV3は、どちらかとCV2の場合より、より高いLDの状態であった。これは、どちらか単独を標的化することと比較して、

CV1とCV3の両方を標的化する場合の集団の追加のカバー率に関してほとんど利益がないことを意味する。CV1またはCV3のいずれかに加えてCV2を標的化することは、少なくとも1つのバリエーションに関してヘテロ接合型であった集団の比率を10.6%にまで増加させた(表4)。

【0195】

【表4】

表4: 少なくとも1つのFUS CVに関してヘテロ接合型である集団のパーセンテージおよび2つの共通バリエーションを組み合わせることによる追加の集団カバー率(1000人ゲノムフェーズ3からのデータ)。

|      |      |      |      |        |        |        | 追加のカバー率 |      |      |
|------|------|------|------|--------|--------|--------|---------|------|------|
|      | CV1  | CV2  | CV3  | CV 1+3 | CV 2+1 | CV 2+3 | 1+3     | 2+1  | 2+3  |
| 全て   | 32.8 | 41.6 | 33.2 | 33.3   | 46.5   | 46.9   | 0.5     | 4.9  | 5.3  |
| 欧州   | 42.9 | 45.9 | 42.7 | 42.9   | 56.5   | 56.5   | 0       | 10.6 | 10.6 |
| アメリカ | 45.8 | 49.9 | 45.8 | 45.8   | 57.9   | 57.9   | 0       | 8    | 8    |
| アジア  | 41.1 | 41.4 | 41.6 | 41.6   | 42.9   | 43.1   | 0.5     | 1.5  | 1.7  |
| アフリカ | 5.3  | 34.2 | 6.7  | 6.8    | 38.8   | 39.5   | 1.5     | 4.6  | 5.3  |

10

20

【0196】

(実施例2)

#### シリーズ1のギャップマーの設計

ギャップマーの第1のラウンドを、1つの対立遺伝子に対して完全な相補性を有し、他の対立遺伝子に対して単一のミスマッチを有する3つのFUS CVのそれぞれを標的化するように設計した。2'-O-メチルのいずれかの側で5塩基のウイングに挟まれた10塩基のDNAコアからなるギャップマーは、ホスホロチオエート主鎖を有するRNA塩基を改変する。各CVにつき6つのAONを設計した；3つは、祖先の対立遺伝子に完全に相補的であり、3つは、マイナー対立遺伝子に完全に相補的であった。3つのギャップマーは、5'末端からコアの2、6または9位でCVがDNAコア内に配置される位置において異なっていた。表5において、AON座標および配列を見ることができる。対立遺伝子選択性のための対照として作用するように、スクランブル対照ギャップマーを使用し(配列番号35: ACCUUA TCCA ATAGCGCCUC)、加えてエクソン3の別の領域を標的としたギャップマーを使用した(表6)。AONの学名は、Mann, C.J., et al., Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy. The Journal of Gene Medicine, 2002. 4(6): p. 644-654によって記載されたものに基づいており、これには、種、遺伝子、エクソン番号、アクセプターまたはドナー標的化およびアニーリング座標が記載され、ここで、本明細書に記載される通り、「-」は、イントロンの位置を示し、「+」は、スプライス部位からのエクソンの位置を特定する。AONを、TriLink Biotechnologies, Inc (San Diego, CA, USA) または ChemGenes Corporation (Wilmington, MA, USA) に注文した。

30

40

【0197】

50

## 【表 5】

表5: FUS CV 標的化 AON の配列および特性。

| AON ID | 配列番号 | 名称   | 標的対立遺伝子 | AON 座標            | AON 配列 (5'から3')      |
|--------|------|------|---------|-------------------|----------------------|
| 1      | 1    | CV1a | A       | FUS H3A(+96+115)  | GCCAUATCCTGAAGTGUCCG |
| 2      | 2    | CV1b | A       | FUS H3A(+100+119) | UCUGGCCATATCCTGAAGUG |
| 3      | 3    | CV1c | A       | FUS H3A(+103+122) | UGCUCTGGCCATATCCUGAA |
| 4      | 4    | CV1d | C       | FUS H3A(+96+115)  | GCCAUAGCCTGAAGTGUCCG |
| 5      | 5    | CV1e | C       | FUS H3A(+100+119) | UCUGGCCATAGCCTGAAGUG |
| 6      | 6    | CV1f | C       | FUS H3A(+103+122) | UGCUCTGGCCATAGCCUGAA |
| 7      | 7    | CV2a | C       | FUS H4A(+88+107)  | GCCAGGGTAGGAGGACUGCU |
| 8      | 8    | CV2b | C       | FUS H4A(+92+111)  | CAUAGCCAGGGTAGGAGGAC |
| 9      | 9    | CV2c | C       | FUS H4A(+95+114)  | GGCCATAGCCAGGGTAGGAG |
| 10     | 10   | Cv2d | T       | FUS H4A(+88+107)  | GCCAGGATAGGAGGACUGCU |
| 11     | 11   | CV2e | T       | FUS H4A(+92+111)  | CAUAGCCAGGATAGGAGGAC |
| 12     | 12   | CV2f | T       | FUS H4A(+95+114)  | GGCCATAGCCAGGATAGGAG |
| 13     | 13   | CV3a | G       | FUS 15A(+797+816) | UGACCTCAAGCCCTCUGAGU |
| 14     | 14   | CV3b | G       | FUS 15A(+801+820) | UCAAUGACCTCAAGCCCUCU |
| 15     | 15   | CV3c | G       | FUS 15A(+804+823) | AUGUCAATGACCTCAAGCCC |
| 16     | 16   | CV3d | C       | FUS 15A(+797+816) | UGACCTGAAGCCCTCUGAGU |
| 17     | 17   | CV3e | C       | FUS 15A(+801+820) | UCAAUGACCTGAAGCCCUCU |
| 18     | 18   | CV3f | C       | FUS 15A(+804+823) | AUGUCAATGACCTGAAGCCC |

10

20

## 【0198】

## 【表 6】

表6: 対照配列

| AON ID | 配列番号 | 名称    | 標的対立遺伝子  | AON 座標          | AON 配列 (5'から3')      |
|--------|------|-------|----------|-----------------|----------------------|
| 35     | 35   | CVscr | スクランブル対照 | N/A             | ACCUUATCCAATAGCGCCUC |
| 36     | 36   | ns対照  | 両方       | FUS H3A(+62+81) | CCACUGTAACTCTGCUUJCC |

30

## 【0199】

材料および方法

## 【0200】

スクリーニングのための細胞株の選択

## 【0201】

40

数種のヒト線維芽細胞の細胞株をサンガーシーケンシングを使用して配列決定して、3つのFUS CVにおけるそれらの遺伝子型を決定した。CVにおけるそれらの遺伝子型において異なっていた3つの細胞株を、スクリーニングでの使用のために選択した。表7において、FUS CVにおける各細胞株の遺伝子型を見ることができる。各細胞株に、一連の濃度で、FUS CVを標的としたギャップマーをトランスフェクトし、トランスフェクションの24時間後にRNAを収集した。RT-PCRを使用してFUS RNAレベルを測定し、アガロースゲル電気泳動を使用して可視化し、ハウスキーピング遺伝子としてTBPを使用したデンシトメトリ分析 (densitometric analysis) を介して定量した。

## 【0202】

50

## 【表 7】

表7: CV標的化ギャップマーをスクリーニングするのに使用されたヒト線維芽細胞の細胞株のFUS CVにおける遺伝子型。

| 細胞株   | CV1 | CV2 | CV3 |
|-------|-----|-----|-----|
| Hom 1 | C/C | T/T | G/G |
| Hom 2 | A/A | C/C | C/C |
| Het   | C/A | C/T | G/C |

## 【0203】

10

線維芽細胞のトランスフェクション

## 【0204】

正常ヒト皮膚線維芽細胞を、確立された技術に従って、トランスフェクションの前に、15,000個の細胞を10% FBS DMEM中の24ウェルプレートに播種し、37℃で24時間インキュベートして繁殖させた。全てのAONを、リポフェクタミン 3000（トランスフェクション体積1ml当たり3μl）（Life Technologies、Melbourne、Australia）を製造業者のプロトコールに従って使用してトランスフェクトし、AONをトランスフェクトした細胞を24時間インキュベートした。

## 【0205】

20

転写物の分析

## 【0206】

RNAを、DNアーゼ処理を含むMagMAX-96トータルRNA単離キット（Life Technologies）を製造業者の指示に従って使用して抽出した。RT-PCRを、One-step Superscript III RT-PCRキットをPlatinum Taqポリメラーゼ（Life Technologies）と共に製造業者の指示に従って使用して実行した。55℃で30分、94℃で2分、それに続いて94℃で30秒、58℃で30秒および68℃で1分を22サイクルの温度プロファイルで、FUSのエクソン1～6（配列番号37フォワード：GTACTCAGCGGTGTTGGAAC、配列番号38：リバーズ：CCACTACTCATGGAGGATTG）にわたり、生成物を増幅した。該当する場合、以下のプライマー（配列番号39：フォワード：AGCGCAAGGGTTTCTGGTTT、リバーズ：配列番号40：GGAGTCAATGGGGGAGGGATA）を使用して、結果を、エクソン2～3にわたり増幅した関係のないハウスキーピング対照遺伝子（TBP）の転写物レベルに正規化した。

30

## 【0207】

PCR産物を、トリス-酢酸-EDTA緩衝液中の2%アガロースゲルで分画し、画像をゲルドキュメンテーションシステム（Vilber Lourmat、Eberhardzell、Germany）で取得した。デンシトメトリー分析を、Image Jを使用して行った。転写物ノックダウンのパーセンテージを、ハウスキーピング遺伝子に対する正規化および対照の処理したまたは未処理の試料との比較によって決定した。

40

## 【0208】

（実施例3）

シリーズ1のCV1を標的としたギャップマーのスクリーニングの結果

線維芽細胞の細胞株（Hom1およびHom2）を、2つの独立した実験で、50nMおよび12.5nMの濃度で、CV1を標的としたAON（配列番号1～6）またはスクランブル対照（CVscr）（配列番号35）および各対立遺伝子において同一なエクソン3中の領域を標的とした選択性対照（ns対照（nsCtrl））（配列番号36）を含む対照配列で処理し、24時間後に収集した。FUS CV1を標的としたギャップマーで処理した両方の細胞株は、低減したFUS mRNAの発現を示した。A対立遺伝子に100%の相補性を有する全てのギャップマー（配列番号1～3）は、CV位置でホモ

50

接合型 A である細胞株において、ホモ接合型 C である細胞株における場合より大きい F U S のノックダウンを誘導した。同様に、C 対立遺伝子に 100% の相補性を有する全てのギャップマー（配列番号 4～6）は、ホモ接合型 C 細胞株において、ホモ接合型 A 細胞株における場合より大きい F U S ノックダウンを誘導した（図 1 a）。全ての C V を標的としたギャップマーで用量応答を見ることができ、F U S 発現は、50 nM で処理した場合、12.5 nM で処理した場合より少なかった。注目すべきことに、選択性のための対照として作用する S N P を含まない F U S 転写物の領域を標的とした対照ギャップマー（n s 対照）（配列番号 36）は、両方の実験において、ホモ接合型 C 細胞株において、ホモ接合型 A 細胞株より大きいノックダウンを引き起こした。これは、ホモ接合型 A 細胞株（H o m 2）の低減したトランスフェクション効率、または関与する細胞プロセスのいずれかの速度もしくは効率における細胞株間の差のいずれかを示すことができた。

10

#### 【0209】

C V 1 b（配列番号 2）は、50 nM の 2 つのホモ接合型細胞株における F U S 発現間で最大の差を生じる A 対立遺伝子に対して最大の選択性を示し、ホモ接合型 A 細胞株は、未処理対照細胞で見られたレベルの 14% を発現し、ホモ接合型 C 細胞株は 44% を発現した。また C V 1 a（配列番号 1）も、A 対立遺伝子に対してある程度の選択性を示した。C V 1 c（配列番号 3）で処理した細胞は、両方の細胞株で類似のレベルの F U S を発現した。

#### 【0210】

C 対立遺伝子を標的とした A O N は、より小さい対立遺伝子間の識別を示し、A O N C V 1 e（配列番号 5）および C V 1 f（配列番号 6）は、両方の細胞株で類似した程度に F U S をノックダウンした。C V 1 d（配列番号 4）は、50 nM におけるホモ接合型 A 細胞株における未処理対照レベルの 32%、およびホモ接合型 C 細胞株における 14% で、細胞株間で F U S 発現における最大の差を示した。しかしながらこれは、n s 対照（配列番号 36）処理細胞における F U S レベルが、未処理対照レベルの 24% および 8% であると測定されたことから、真の選択性をまったく示していない可能性がある。

20

#### 【0211】

##### （実施例 4）

シリーズ 1 の C V 2 を標的としたギャップマーのスクリーニング

線維芽細胞の細胞株（H o m 1 および H o m 2）を、2 つの独立した実験で、50 nM および 12.5 nM の濃度で、C V 2 を標的とした A O N（配列番号 7～12）または対照配列（配列番号 35 および 36）で処理し、24 時間後に収集した。F U S 発現を分析した。これは、図 2 b において見ることができる。全ての C V 2 を標的としたギャップマーで用量応答を見ることができ、F U S 発現は、50 nM で処理した場合、12.5 nM で処理した場合より少なかった。C 対立遺伝子に 100% の相補性を有するギャップマー（配列番号 7～9）について、C V 2 b（配列番号 8）は、2 つの実験において、ホモ接合型細胞株間で F U S 発現レベルにおいて最大の差を示し、F U S は、ホモ接合型 C 細胞株では 50 nM で対照レベルの 21% に低減し、ホモ接合型 T 細胞株では 58% にだけ低減した。C V 2 c（配列番号 9）はまた、C 対立遺伝子に対してもある程度の選択性を示し、ホモ接合型 C 細胞株においてより大きいノックダウンを示した。対照的に C V 2 a（配列番号 7）で処理した細胞は、ホモ接合型 T 細胞株において、わずかにより大きい F U S ノックダウンを生じた。これは、T 対立遺伝子に対して何らかの選択性があったことを示さないが、ここでも n s 対照で処理した細胞において 2 つの細胞株間で F U S ノックダウンレベルで差があったことから、結果を解釈するときにそれを考慮に入れることが必要である。T 対立遺伝子を標的としたギャップマーのなかでも、C V 2 e（配列番号 5）が、ホモ接合型細胞株間で発現における最大の差を示した。この差は、C V 2 d（配列番号 10）および C V 2 f（配列番号 12）の場合よりほんのわずか低かった。

30

40

#### 【0212】

##### （実施例 5）

シリーズ 1 の C V 3 を標的としたギャップマーのスクリーニング

50

線維芽細胞の細胞株（H o m 1 および H o m 2）を、2つの独立した実験で、50 nM および 12.5 nM の濃度で、C V 3 を標的とした A O N（配列番号 13～18）または対照配列（配列番号 35 および 36）で処理し、24 時間後に収集した。C V 3 を標的としたギャップマーは、C V 1 および C V 2 を標的とした A O で見られたのと同じ程度に F U S 発現を低減させず、いくつかはスクランブル対照で処理された細胞で見られたものより大きいノックダウンを示さなかった。発現は、実質的に、エクソン 3 を標的とした対照オリゴ（n s 対照）（配列番号 36）に関する以前の実験の場合と類似したレベルにノックダウンされたことから、これは不良なトランスフェクション効率に起因するものではないことが示される。n s 対照オリゴ（配列番号 36）を除いて、ほとんどの処理にわたり明白な用量応答は見られなかった。さらに、C V 1 および C V 2 で見られたように、トランスフェクトされたギャップマーに 100% の相補性を有するホモ接合型細胞株において、発現レベルが低下する傾向はなかった。

10

【0213】

（実施例 6）

追加のミスマッチを有する C V 2 シリーズ 2 のギャップマーの設計

ギャップマーの第 2 のシリーズを設計して、C V 2 を標的とした。ギャップマーの第 1 のシリーズからのデータは、中心に配置されたミスマッチが対立遺伝子間の選択性を改善したことを示した。C V 2 b（配列番号 8）を、C 対立遺伝子を標的とするように選択し、C V 2 e（配列番号 11）を T 対立遺伝子を標的とするように選択し、ギャップマーの第 2 のシリーズを、これらの配列の周辺に余分なミスマッチを付加して設計した。これらの 2 つの A O N は、単一塩基変化が 5' 末端からの 10 の位置のうち 6 つの位置で分子の DNA ギャップの中央に配置されたこと以外は同一である。

20

【0214】

追加のミスマッチの付加

【0215】

ミスマッチした塩基対は、ワトソン・クリック塩基対合則（グアニン-シトシンおよびアデニン-チミン）に従っていないものである。ミスマッチは、それが非相補的なピリミジン/プリン塩基によって形成される場合、形質導入と定義される。プリン/プリンまたはピリミジン/ピリミジン対によって形成されるものは、トランスバージョンである（Modrich, P., DNA MISMATCH CORRECTION. Annual Review of Biochemistry, 1987. 56(1): p. 435-466）。ミスマッチは、特にプリントランスバージョンのケースにおいて、核酸二重鎖の構造および安定性において主要な変更を生じさせることができる（Rossetti, G., et al., The structural impact of DNA mismatches. Nucleic Acids Research, 2015. 43(8): p. 4309-4321）。DNA は通常、ワトソンおよびクリックによって記載された塩基対合モデルで水素結合によって一緒に保持された二本鎖形成による二重鎖（double stranded duplex）で存在しており、これが最も安定な構造であるにもかかわらず、ゆらぎが起こる。DNA ブリージング（DNA breathing）は、二重鎖の融解温度未満での立体構造または熱的なゆらぎに起因する核酸塩基対の一時的な開口を指す。これは、より低い安定性の一時的な構造の形成をもたらす。これは、DNA 二重鎖内部に配置された鑄型をコードする DNA への、ポリメラーゼおよび他の DNA 調節タンパク質のアクセスを可能にする重要なメカニズムである（Phelps, C., et al., Single-molecule FRET and linear dichroism studies of DNA breathing and helicase binding at replication fork junctions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. 110(43): p. 17320-17325）。NMR 分光法および分子動力学シミュレーションを使用して、正規の塩基対および DNA ミスマッチのそれぞれにつき、ブリージングの構造的な変更および頻度が特徴付けられた。正規の塩基対のブリージングの性質は相対的に低く、C/G については < 0.2%、A/T については < 3% であると測定された。これは、ミスマッチした塩基対によって大きく変化する可能性があり、一部のもの、例えば C/C は約 1% の低

30

40

50

いブリージング性質を有する。対照的に G / G および A / A は、> 40 % のブリージング性質を有し、他のミスマッチはその間のどこかにある (Rossetti et al. を参照)。

【0216】

一部のケースにおいて、DNA / RNA ヘテロ二重鎖における単一のミスマッチは、RNアーゼHによる切断において数倍の減少をもたらし得る (Giles, R.V., et al., Single base discrimination for ribonuclease H-dependent antisense effects within intact human leukaemia cells. *Nucleic Acids Research*, 1995. 23(6): p. 954-961)。RNアーゼHによる切断の単一ミスマッチの識別は、SNPの性質および周囲のヌクレオチドに高度に依存する。特異的な対立遺伝子を標的とするように設計されたギャップマーにおける余分なミスマッチの付加は、一部のケースにおいて、2つの対立遺伝子間の区別を増強させ得る。他のケースにおいてこれは起こらず、逆の作用を見ることさえあり得る (Magner, D., et al., Influence of mismatched and bulged nucleotides on SNP-preferential RNase H cleavage of RNA-antisense gapmer heteroduplexes. *Scientific Reports*, 2017. 7(1): p. 12532)。DNAウィンドウ内のミスマッチの位置、および別のミスマッチの位置との関係における前記位置もまた、RNアーゼH活性に影響する場合がある。

10

【0217】

CV2を同じ位置のままにし、余分なミスマッチを付加することで、8つの新しいAONを各FUS対立遺伝子 (配列番号19~34) を標的とするように設計した。様々な位置で (CV2から1、2、3または4塩基離れた)、さらに、許容されるはずであるブリージングの量 (高いまたは低い) に基づくミスマッチについて選択された異なるヌクレオチドを用いて、ミスマッチを付加した。表8において、AON配列および特性を見ることができる。

20

【0218】

30

40

50

【表 8】

表8: FUS CV2を標的とするAONの配列および特性-シリーズ2。

| AON ID | 配列番号 | 名称    | 標的対立遺伝子 | AON 座標                | AON 配列 (5'から3')        | MMからの距離 | MM  | ミスマッチタイプ           |
|--------|------|-------|---------|-----------------------|------------------------|---------|-----|--------------------|
| 19     | 19   | CV2b1 | C       | FUS<br>H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCAGAGTAGGAGGAC   | 1 塩基    | A/C | 形質導入               |
| 20     | 20   | CV2b2 | C       | FUS<br>H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCAGTGTAGGAGGAC   | 1 塩基    | T/C | ピリミジン<br>トランスバージョン |
| 21     | 21   | CV2b3 | C       | FUS<br>H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCAGGTAGGAGGAC    | 2 塩基    | A/C | 形質導入               |
| 22     | 22   | CV2b4 | C       | FUS<br>H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCATGTAGGAGGAC    | 2 塩基    | T/C | ピリミジン<br>トランスバージョン |
| 23     | 23   | CV2b5 | C       | FUS<br>H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCAGGGTATAGGAGGAC | 3 塩基    | A/C | 形質導入               |
| 24     | 24   | CV2b6 | C       | FUS<br>H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCAGGGTATGAGGAC   | 3 塩基    | T/C | ピリミジン<br>トランスバージョン |
| 25     | 25   | CV2b7 | C       | FUS<br>H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCAGGGTAGGAGGAC   | 4 塩基    | G/G | プリン<br>トランスバージョン   |
| 26     | 26   | CV2b8 | C       | FUS<br>H4A(+92+111)A1 | CAUAGCCAGGGTAGGAGGAC   | 4 塩基    | G/A | プリン<br>トランスバージョン   |
| 27     | 27   | CV2e1 | T       | FUS<br>H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCAGATAGGAGGAC    | 1 塩基    | A/C | 形質導入               |
| 28     | 28   | CV2e2 | T       | FUS<br>H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCAGTATAGGAGGAC   | 1 塩基    | T/C | ピリミジン<br>トランスバージョン |
| 29     | 29   | CV2e3 | T       | FUS<br>H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCAGGATAGGAGGAC   | 2 塩基    | A/C | 形質導入               |
| 30     | 30   | CV2e4 | T       | FUS<br>H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCAGGATAGGAGGAC   | 2 塩基    | T/C | ピリミジン<br>トランスバージョン |
| 31     | 31   | CV2e5 | T       | FUS<br>H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCAGGATAGGAGGAC   | 3 塩基    | A/C | 形質導入               |
| 32     | 32   | CV2e6 | T       | FUS<br>H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCAGGATATGAGGAC   | 3 塩基    | T/C | ピリミジン<br>トランスバージョン |
| 33     | 33   | CV2e7 | T       | FUS<br>H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCAGGATAGGAGGAC   | 4 塩基    | G/G | プリン<br>トランスバージョン   |
| 34     | 34   | CV2e8 | T       | FUS<br>H4A(+92+111)A2 | CAUAGCCAGGATAGGAGGAC   | 4 塩基    | G/A | プリン<br>トランスバージョン   |

## 【0219】

## (実施例7)

シリーズ2のCV2を標的としたギャップマーのスクリーニング

CV2でヘテロ接合型であるヒト線維芽細胞の細胞株をスクリーニングに使用した。AONのサブセットを使用して、最大の選択性を付与する濃度およびタイムポイントが、100nMの濃度でのトランスフェクションの24時間後であったことを決定した。複数の実験で、ドロップレットデジタルPCRを使用して、処理された細胞に存在する各対立遺伝子の比率を、この濃度およびタイムポイントで定量した。ドロップレットデジタルPCR分析を、BioRad QX200システムおよびOne-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probesを使用して行った。エクソン4中のフォワードプライマー、およびエクソン4/5ジャンクションと交差するリバースプライマー（配列番号41：フォワード：CTATGGAACCTCAGTCAACTCC、配列番号42：リバース：GAACCTGCTACCGTAACCTTCC）を用いて、50℃で50分、95℃で10分、それに続いて95℃で30秒および55℃で1分を40サイクル、最後に98℃で10分の温度プロファイルで、プライマーがFUSを増幅した。CV2にTを含有する転写物の定量を、Hexフルオロフォアおよびアイオワブラックエンチャーを含むプローブ（プローブ1：CCTCCT+AT+C+CTGGCT）を使用して検出した。CV2にCを含有する転写物の定量を、FAMフルオロフォアおよびアイオワブラックエンチャーを含むプローブ（プローブ2：CTCCT+AC+C+CTGGCTA）を使用して検出した。プローブを、Integrated DNA Technologiesから購入した。FUS CV2における各対立遺伝子に関してホモ接合型の細胞株からのRNAを用いて対照を行い、各プローブについて他の対立遺伝子からのシグナルがないことを確認した。

## 【0220】

AON CV2b（配列番号8）で24時間処理された細胞において（C対立遺伝子に対して100%の相補性、およびT対立遺伝子に対して1つのミスマッチ）、FUS転写物の72%が、CVにおいてTを含有する対立遺伝子のものであった（図2）。CV2b1およびCV2b2（配列番号19および20）で処理した細胞に存在するT対立遺伝子の比率は、73.3および73.7%とわずかに高いだけであった。追加のミスマッチを有するAOの一部（CV2b3、CV2b7およびCV2b8）（配列番号21、25、26）は、配列番号8で処理された細胞と比較して、対立遺伝子選択的ノックダウンの有意な減少をもたらし、T対立遺伝子は、転写物の66.7、63.5および63.1%であると測定された。

10

## 【0221】

AON CV2e（配列番号11）で処理された細胞において（T対立遺伝子に対して100%の相補性、およびC対立遺伝子に対して1つのミスマッチ）、FUS転写物の81.1%が、C対立遺伝子のものであった（図2）。追加のミスマッチの全てが、C対立遺伝子転写物の比率を、CV2e8（配列番号34）での場合の66.1%から、CV2e5（配列番号31）での場合の72.5%の範囲に低減させた。

## 【0222】

RT-PCRを使用し、アガロースゲル電気泳動とそれに続くデンシトメトリー分析により、100nMで24時間のインキュベーション後の総FUS発現を定量した（図3）。その標的対立遺伝子に対して完全な相補性を有し、非標的対立遺伝子からのミスマッチが1つのみのAON（配列番号8および11）の場合、総FUSレベルは、対照で処理した細胞（AONが存在しないトランスフェクション試薬で処理した）で見られたレベルの31%および23%であった。追加のミスマッチが付加された場合、総FUSレベルは、対照レベルの71%~130%の範囲であった。FUSが、そのタンパク質レベルによって自己調節されるため、AON媒介ノックダウンに応答して上方調節がなされ得る。

20

## （実施例8）

## CV2標的化AONの化学的な比較

CV2を標的化したAON CV2bおよびCV2eを、全体にわたりPS改変を有する2'-O-メチルギャップマーとして合成し、さらに、チオホスホルアミデートモルホリノオリゴマー（TMO）キメラ（ギャップマー）：5塩基のモルホリノ3'-チオホスホルアミデートウイング、3'末端に2'-デオキシヌクレオシド塩基を有する10塩基の2'-デオキシヌクレオシド3'-チオホスフェートギャップとして合成し、CV2に関してヘテロ接合型であるヒト線維芽細胞の細胞株での3つの実験で試験した。細胞を、リポフェクタミン 3000を25nMおよび10nMの濃度で使用してトランスフェクトした。トランスフェクションの3日後に細胞を収集し、ddPCRおよびRT-PCRならびにアガロースゲル電気泳動によってFUS転写物を分析した。25nMでT対立遺伝子の発現を低減させるように標的化されたCV2e（TMOギャップマー）でトランスフェクトされた細胞において、3日後の転写物の86%は、C対立遺伝子のものであった（図4a）。25nMでC対立遺伝子の発現を低減させるように標的化されたCV2b（TMOギャップマー）でトランスフェクトされた細胞において、3日後の転写物の78%は、T対立遺伝子のものであった（図4b）。所望の対立遺伝子の転写物の比率は、細胞に2'-O-メチルギャップマーAONをトランスフェクトした場合に、有意により低かった。25nMにおけるAON CV2eでの3日間の処理後の総FUS発現は対照レベルの62%であったことから（図4c）、C対立遺伝子の全体的な発現は、L3Kで処理された対照細胞の場合のレベルと比較してわずかに増加したが、T対立遺伝子の発現は、対照におけるレベルのおよそ17%に低減したことが示される（図4d）。10nMでのAON CV2bを用いた3日間の処理後の総FUS発現が対照レベルの61%であったことから（図4c）、T対立遺伝子の全体的な発現が、L3Kで処理された対照細胞の93%にのみわずかに低減されたが、C対立遺伝子の発現は、対照におけるレベルのおよそ29%に低減したことが示される（図4d）。

30

40

50

## 配列表

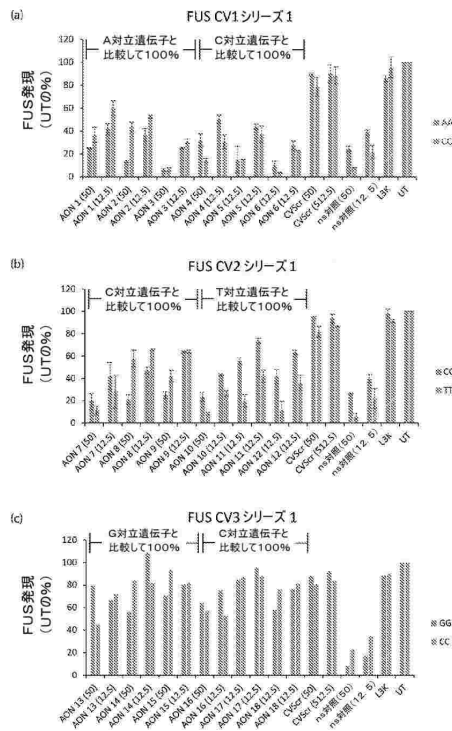
出願人がウラシル塩基およびチミン塩基の両方を含む配列（例えば本発明の配列の多く）を入力することを防ぐWIPOの配列表ソフトウェアの制限により、配列中の全てのウラシル塩基をチミン塩基に変換して配列表を利用可能にし、WIPOの配列表ソフトウェアに入力し、分子タイプを「DNA」として分類した。しかしながら、本明細書の本体における配列と、および配列表ファイルに列挙された配列の間で情報において差がある場合、本明細書の本体は、本発明に関する配列および情報についてのマスター参照である。

。

【図面】

【図 1】

Figure 1





## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                    | International application No.<br>PCT/AU2023/050067                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><b>C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7115 (2006.01) A61K 31/712 (2006.01) A61K 31/7125 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| PATENW, CAPLUS, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS: Keywords: FUS, FUS1, ANTISENSE, AON, MORPHOLINO, PATHOGENIC ALLELE and like terms. GENOMEQUEST: SEQ ID NOs: 2, 4, 5, 8, 11 @ 80-100%, STN REGISTRY: SEQ ID NOs: 2, 4, 5, 8, 11. CPC/IPC: C12N15/113, ESPACENET, GOOGLE SCHOLAR and INTERNAL DATABASES: Applicant and Inventors names.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No.                                                                                                                        |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Documents are listed in the continuation of Box C                                  |                                                                                                                                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"D" document cited by the applicant in the international application<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                    |                                                                                                                                              |
| Date of the actual completion of the international search<br>21 April 2023                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                    | Date of mailing of the international search report<br>21 April 2023                                                                          |
| Name and mailing address of the ISA/AU<br><br>AUSTRALIAN PATENT OFFICE<br>PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA<br>Email address: pct@ipaustralia.gov.au                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                    | Authorised officer<br><br>Cara Mortimer<br>AUSTRALIAN PATENT OFFICE<br>(ISO 9001 Quality Certified Service)<br>Telephone No. +61 2 6283 2661 |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  | International application No.<br>PCT/AU2023/050067 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------------------------|
| <b>Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |                                                    |
| <p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13<i>ter</i>.1(a)).</p> <p><input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.</p> <p>3. Additional comments:</p> |  |                                                    |

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/AU2023/050067

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**See Supplemental Box for Details**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
**1-34 (in part): SEQ ID NOs: 2, 4, 5, 8 and 11.**

**Remark on Protest**

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

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | International application No.<br><b>PCT/AU2023/050067</b> |
| <b>Supplemental Box</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                           |
| <p><b>Continuation of: Box III</b></p> <p>This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.</p> <p>This Authority has found that there are different inventions based on the following features:</p> <p>Inventions 1-34. Claims 1-34 (all in-part) relate to antisense oligonucleotides (AONs) targeted to a nucleic acid molecule encoding FUS pre-mRNA, wherein the AON inhibits FUS expression of at least one FUS allele, and wherein said AON is selected from SEQ ID NO 1-30 or a variant thereof, wherein each AON represents a separate invention.</p> <p>In the above group of claims the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is the use of AONs that target FUS pre-mRNA and inhibits the expression of at least one FUS allele.</p> <p>However, this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in the documents below, each of which exemplify AONs that target FUS pre-mRNA and inhibit the expression of at least one FUS allele.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Korobeynikov, V.A., et al. Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis. Nature Medicine 28, 104–116 (JANUARY 24 2022). <a href="https://doi.org/10.1038/s41591-021-01615-z">https://doi.org/10.1038/s41591-021-01615-z</a></li> <li>• WO 2020/243292 A1 (IONIS PHARMACEUTICALS INC) 03 December 2020</li> </ul> <p>In light of these documents this common feature cannot be a special technical feature. Therefore, there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a posteriori</i>.</p> <p>The AONs of SEQ ID NOs: 2, 4, 5, 8, and 11 appear to be preferred sequences appear to be the embodiments most favoured by the applicants. The instant search and examination has been established in respect of these SEQ ID NOs only, in spite of their constituting 6 different inventions.</p> |                                                           |
| Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2019)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                           |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | International application No. |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| C (Continuation).           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | PCT/AU2023/050067             |
| Category*                   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Relevant to claim No.         |
| X                           | WO 2020/243292 A1 (IONIS PHARMACEUTICALS, INC.) 03 December 2020, SEQ ID NO: 401 shares 90% sequence identity (over query) with instant SEQ ID NO: 2 and 95% sequence identity with instant SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 248 shares 95% sequence identity with instant SEQ ID NO: 4.<br>Title, abstract, tables 4-6, page 33 lines 10-25, page 37 lines 6-24, page 42 lines 4-14, claims 14-34, 47-70.                                                                                                 | 1-8, 10-13, 17-28, 30-33      |
| X                           | Korobeynikov, V.A., et al. Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis. <i>Nature Medicine</i> 28, 104-116 (JANUARY 24 2022). <a href="https://doi.org/10.1038/s41591-021-01615-z">https://doi.org/10.1038/s41591-021-01615-z</a><br>Title, abstract, section 'ION363 (Jacifusen) drug', figures 4-5, page 155 right hand side paragraph 3.                                                                                   | 1-6, 17-28, 30-33             |
| X                           | Zhou, Y, et al. ALS-associated FUS mutations result in compromised FUS alternative splicing and autoregulation. <i>PLoS genetics</i> 9.10 (2013): e1003895.<br><a href="https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003895">https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003895</a><br>Title, abstract, last two paragraphs of section 'Splicing reporter minigene assay'.                                                                                                                                      | 1, 7-8, 30                    |
| X                           | US 2005/0244851 A1 (BLUME, J.E. et al.) 03 November 2005<br>Title, SEQ ID NO: 26634 which shares 100% identity (by query) with instant SEQ ID NO: 4.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 1-9, 14-15                    |
| X                           | US 2014/0349938 A1 (REED, R. et al. ) 27 November 2014<br>Title, abstract, paragraphs [0074], [0084-0085].                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 1, 29-30                      |
| X                           | Kim, S. H, et al. Amyotrophic lateral sclerosis-associated proteins TDP-43 and FUS/TLS function in a common biochemical complex to co-regulate HDAC6 mRNA. <i>Journal of Biological Chemistry</i> 285.44 (2010): 34097-34105.<br><a href="https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154831">https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154831</a><br>Title, abstract, section 'Cell Culture and Transfections'.                                                                                                       | 1, 30                         |
| X                           | van Blitterswijk, M, et al. Characterization of FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis using RNA-Seq. <i>PloS one</i> 8.4 (2013): e60788.<br><a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060788">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060788</a><br>Title, abstract, section 'Cell Culture'.                                                                                                                                                                                           | 1, 30                         |
| X                           | Ishigaki, S, et al. Altered tau isoform ratio caused by loss of FUS and SFPQ function leads to FTL-like phenotypes. <i>Cell reports</i> 18.5 (2017): 1118-1131.<br><a href="https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.013">https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.013</a><br>Title, abstract, section 'MOs'.                                                                                                                                                                                      | 1, 30                         |
| X                           | Dichmann, D. S., et al. fus/TLS orchestrates splicing of developmental regulators during gastrulation. <i>Genes &amp; development</i> 26.12 (2012): 1351-1363.<br><a href="http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.187278.112">http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.187278.112</a><br>Title, abstract, section 'Adeno-Associated Virus'.                                                                                                                                                | 1, 29-30                      |
| A                           | Mejzini, R. et al. Investigating antisense oligonucleotide therapeutics for amyotrophic lateral sclerosis. <i>Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration</i> 20. Supplement 1, (2019): 220-221. Abstract Number: TST-07. Meeting Information: 30th International Symposium on ALS/MND. Perth, WA, Australia. DECEMBER 04 2019 - DECEMBER 06 2019. <a href="https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1646995">https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1646995</a><br>Entire document. | 1-34                          |
| Y                           | Klim, J. R., et al. Antisense oligonucleotide therapies for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Existing and emerging targets. <i>The International Journal of Biochemistry &amp; Cell Biology</i> 110 (2019): 149-153. <a href="https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.03.009">https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.03.009</a><br>Title, abstract, section 3.1                                                                                                                                         | 16                            |

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                           |                                                                                    | International application No. |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                    | PCT/AU2023/050067             |
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No.         |
|                                                       |                                                                                    |                               |
|                                                       |                                                                                    |                               |
|                                                       |                                                                                    |                               |
|                                                       |                                                                                    |                               |
|                                                       |                                                                                    |                               |
|                                                       |                                                                                    |                               |
| Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)            |                                                                                    |                               |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/AU2023/050067             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
| WO 2020/243292 A1                                                                                                                                                                                                                                                     | 03 December 2020 | WO 2020243292 A1              | 03 Dec 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3976791 A1                 | 06 Apr 2022      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | TW 202111123 A                | 16 Mar 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2022243203 A1              | 04 Aug 2022      |
| US 2005/0244851 A1                                                                                                                                                                                                                                                    | 03 November 2005 | US 2005244851 A1              | 03 Nov 2005      |
| US 2014/0349938 A1                                                                                                                                                                                                                                                    | 27 November 2014 | US 2014349938 A1              | 27 Nov 2014      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2012167086 A2              | 06 Dec 2012      |
| <b>End of Annex</b>                                                                                                                                                                                                                                                   |                  |                               |                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                               |                  |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.<br>Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                               |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

## テーマコード (参考)

**C 1 2 N** 5/10 (2006.01)  
**A 6 1 K** 31/7088(2006.01)  
**A 6 1 P** 21/00 (2006.01)  
**A 6 1 P** 25/00 (2006.01)  
**A 6 1 P** 25/28 (2006.01)  
**A 6 1 P** 25/14 (2006.01)

**C 1 2 N** 5/10  
**A 6 1 K** 31/7088  
**A 6 1 P** 21/00  
**A 6 1 P** 25/00  
**A 6 1 P** 25/28  
**A 6 1 P** 25/14

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 メイジニ, リタ

オーストラリア国 6 1 6 4 ウェスタン オーストラリア, ヤングバップ, ラークスパー クロス 2

(72)発明者 アッカーリー, パトリック アンソニー

オーストラリア国 6 0 2 7 ウェスタン オーストラリア, マラルー, ダンピアー アベニュー 1 3 6

(72)発明者 フリン, ローレン ルイーズ

オーストラリア国 6 0 1 8 ウェスタン オーストラリア, カリーニャップ, ロックリフ アベニュー 9

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA23 CA44  
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA02 ZA15  
ZA94 ZC41