

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6867945号  
(P6867945)

(45) 発行日 令和3年5月12日(2021.5.12)

(24) 登録日 令和3年4月13日(2021.4.13)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00 Z N A
C 12 N 15/113 (2010.01)	C 12 N 15/113 Z
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
	A 6 1 P 43/00 1 0 5

請求項の数 19 (全 153 頁)

(21) 出願番号	特願2017-518228 (P2017-518228)
(86) (22) 出願日	平成27年10月3日(2015.10.3)
(65) 公表番号	特表2017-536338 (P2017-536338A)
(43) 公表日	平成29年12月7日(2017.12.7)
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/053896
(87) 国際公開番号	W02016/054615
(87) 国際公開日	平成28年4月7日(2016.4.7)
審査請求日	平成30年10月1日(2018.10.1)
(31) 優先権主張番号	62/059,847
(32) 優先日	平成26年10月3日(2014.10.3)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	504278156 コールド スプリング ハーバー ラボラ トリーアメリカ合衆国 11724 ニューヨー ク、コールド スプリング ハーバー、ワ ン バングタウン ロード
(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
(74) 代理人	100106208 弁理士 宮前 徹
(74) 代理人	100120112 弁理士 中西 基晴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】核内遺伝子出力の標的とされた増強

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験体の細胞によって標的タンパク質または機能 RNA の発現を増加させるための薬剤の調製におけるアンチセンスオリゴマー (ASO) の使用であって、

発現を増加させるための方法は、被験体の細胞を、8 ~ 50 の核酸塩基から成る ASO と接触させることを含み；

該細胞は、保持されたイントロン含有プレ mRNA (RIC mRNA) を有し、該 RIC mRNA は、保持されたイントロン、5' スプライス部位に隣接しているエクソン、および 3' スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、ここで、RIC mRNA は、標的タンパク質または機能 RNA をコードし；

ASO は、RIC mRNA の標的とされた領域に結合し、該標的とされた領域は、(a) 保持されたイントロンの 5' スプライス部位に対する領域 + 6 から + 100 内；または (b) 保持されたイントロンの 3' スプライス部位に対する領域 - 16 から - 100 内の保持されたイントロン内にあり、

ASO は、保持されたイントロンを RIC mRNA から構成的にスプライシングさせ、それにより、被験体の細胞において、標的タンパク質または機能 RNA をコードする mRNA のレベルを増加させ、そして標的タンパク質または機能 RNA の発現を増加させ；

被験体は、標的タンパク質または標的機能 RNA のハプロ不全によって引き起こされる標的タンパク質または標的機能 RNA の量または活性の不足を特徴とする疾患または障害

10

20

を有し；

A S O は、標的機能 R N A または標的タンパク質をコードする遺伝子から転写されたプレ m R N A の選択的スプライシングを調節すること、又は標的タンパク質または標的機能 R N A をコードする遺伝子の変異から結果として生じる異常スプライシングを調節すること、のいずれによっても標的タンパク質または機能 R N A の量を増加させない、前記使用。

【請求項 2】

R I C プレ m R N A が、全長プレ m R N A の部分的スプライシングまたは野生型プレ m R N A の部分的スプライシングによって生成される、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

標的タンパク質または機能 R N A をコードする m R N A が、全長成熟 m R N A または野生型成熟 m R N A である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

生成される標的タンパク質が、全長タンパク質または野生型タンパク質である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 5】

アンチセンスオリゴマーが、ホスホロチオエート結合またはホスホジアミデート結合を含む骨格修飾を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 6】

アンチセンスオリゴマーが、ホスホロジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2' - O - メチル、2' - フルオロ、または2' - O - メトキシエチル部分を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 7】

アンチセンスオリゴマーが、少なくとも 1 つの修飾された糖部を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 8】

各糖部が、修飾された糖部である、請求項 7 に記載の使用。

【請求項 9】

アンチセンスオリゴマーが、標的タンパク質または標的機能 R N A をコードする R I C プレ m R N A の標的とされた領域に少なくとも 80 % 相補的である配列を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 10】

アンチセンスオリゴマーが、SEQ ID NO : 1 ~ 102 および 375 ~ 384 から成る群から選択される配列を含む R I C プレ m R N A の領域に結合する、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 11】

アンチセンスオリゴマーが、SEQ ID NO : 103 ~ 374 および 385 ~ 390 から成る群から選択される配列を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 12】

被験体が、標的タンパク質の量または活性の不足または標的機能 R N A の量または活性の不足によって引き起こされた疾患または障害を有し、該疾患または障害は、血栓性血小板減少性紫斑病、結節性硬化症、腎多囊胞病、家族性自律神経不全、X 型網膜色素変性症、X I 型網膜色素変性症、囊胞性線維症、網膜芽細胞腫、家族性大腸腺腫症、プロテイン S 欠乏症、サラセミア、および鎌型赤血球症から選択される、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 13】

標的タンパク質または標的機能 R N A および R I C プレ m R N A が、ADAMTS 1 3、TSC 1、PKD 1、IKB KAP、IMPDH 1、PRPF 31、CFTR、RB 1、HBG 1、HBG 2、および HBB から成る群から選択される遺伝子によってコードされる、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

5'スプライス部位に隣接しているエクソンの-3'eから-1'eおよび保持されたイントロンの+1から+6にあるヌクレオチドが、対応する野生型配列の対応する位置でのヌクレオチドと同一である、請求項1に記載の使用。

【請求項15】

保持されたイントロンの-15から-1および3'スプライス部位に隣接しているエクソンの+1'eにあるヌクレオチドが、対応する野生型配列の対応する位置でのヌクレオチドと同一である、請求項1に記載の使用。

【請求項16】

細胞が、エスクビボでアンチセンスオリゴマーと接触させられる、請求項1に記載の使用。

10

【請求項17】

アンチセンスオリゴマーが、硝子体内注射、髄腔内注射、腹膜腔内注射、皮下注射、または静脈内注射によって被験体に投与される、請求項1に記載の使用。

【請求項18】

アンチセンスオリゴマーが、医薬組成物としてさらに製剤される、請求項1に記載の使用。

【請求項19】

医薬組成物が、薬学的に許容可能な賦形剤または担体をさらに含む、請求項18に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

<相互参照>

本発明は、2014年10月3日に出願の、米国仮特許出願第62/059,847号の利益を主張し、これは引用によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

幾つかの遺伝子疾患は、ハプロ不全によって引き起こされ、該ハプロ不全では、1つのみの機能的な遺伝子のコピーがあり、単一のコピーが十分な遺伝子産物を生成しない。例えば、これは、遺伝子の1つのコピーが失われる、ヘミ接合体欠失によって引き起こされ得る。他の遺伝子疾患は、遺伝子産物を変更する変異によって引き起こされ、その結果、遺伝子産物は部分的な機能のみを有する。

30

【発明の概要】

【0003】

本明細書で記載されるように、アンチセンスオリゴマー(ASO)は、イントロン含有遺伝子のイントロン・スプライス部位で(野生型配列を利用する)構成的スプライシングを促進して、遺伝子産物の発現を増加させることによって、タンパク質の生成、または非タンパク質コード遺伝子の場合には機能RNAを増加させるために使用され得る。これらの方針を使用するために記載されているASOは、構成的スプライシングを促進して、変異から結果的に生じる異常スプライシングを訂正しない、あるいは構成的スプライシング(slicing)を促進して、選択的スプライシングを調節しない。それ故、本明細書に記載される方法は、遺伝子産物の減少された発現または不十分な活性から結果として生じる疾病を処置するために使用され得る。

40

【0004】

本明細書には、少なくとも1つの保持されたイントロンを含むpremRNA(RIC premRNA)によってコードされた標的タンパク質の細胞における発現を増加させる方法が記載され、保持されたイントロンは、他のイントロンの1つ以上が切り出された(sliced out)(除去された)ときに存在したままであるイントロンである。標的タンパク質の発現は、細胞質に統合して輸出され、標的タンパク質へと翻訳される成熟mRNAを生成するために、核内のpremRNAにおけるすべてのイントロンの完全なスプ

50

ライシング(除去)に依存する。イントロンの非効率的なスプライシング(除去)は、主として核内に蓄積する、および細胞質に輸出された場合に、標的タンパク質に翻訳されないように分解される、保持されたイントロン含有(R I C)プレmRNAを結果としてもたらす。本明細書の方法による記載されるアンチセンスオリゴマー(A S O)での処置は、プレmRNA転写物(1つ以上のイントロンを含むプレmRNA種)からの保持されたイントロンのスプライシングを促進し、mRNAの増加を結果としてもたらすことができ、これは、より高いレベルの標的タンパク質を提供するために翻訳される。

#### 【0005】

実施形態では、保持されたイントロン含有プレmRNA(R I C プレmRNA)を有している細胞によって標的タンパク質または機能RNAの発現を増加させる方法であり、該R I C プレmRNAは、保持されたイントロン、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソン、および保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、ここでR I C プレmRNAは、標的タンパク質または機能RNAをコードする。実施形態では、該方法は、細胞を、標的タンパク質または機能RNAをコードするR I C プレmRNAの標的とされた部分に相補的なA S Oと接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能RNAをコードするR I C プレmRNAから構成的に切り出され、それにより、細胞内で標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAのレベルを増加させ、標的タンパク質または機能RNAの発現を増加させる。実施形態では、細胞は、被験体内にあるか又は被験体に由来し、該方法は、被験体の細胞内の標的タンパク質または機能RNAの発現を増加させて被験体を処置する方法である。実施形態では、細胞は、標的タンパク質の量または活性の不足または機能RNAの量または活性の不足によって引き起こされた疾病を有する被験体内にあるか又は被験体に由来する。実施形態では、標的タンパク質または機能RNAは、被験体において量または活性が不足している標的タンパク質または機能RNAを機能的に増強または交換する、補償(compensating)タンパク質または補償機能RNAである。

#### 【0006】

実施形態では、標的タンパク質の量または活性の不足または機能RNAの量または活性の不足によって引き起こされた疾病は、A S Oが標的とされる保持されたイントロンの選択的スプライシングまたは異常スプライシングによって引き起こされた疾病ではない。実施形態では、標的タンパク質の量または活性の不足または機能RNAの量または活性の不足によって引き起こされた疾病は、標的タンパク質または機能RNAをコードするR I C プレmRNAの中の任意の保持されたイントロンの選択的スプライシングまたは異常スプライシングによって引き起こされる疾病ではない。

#### 【0007】

実施形態では、標的タンパク質の量の不足は、標的タンパク質のハプロ不全によって引き起こされ、ここで、被験体は、機能的な標的タンパク質をコードする第1の対立遺伝子、標的タンパク質が生成されない第2の対立遺伝子、または非機能性の標的タンパク質をコードする第2の対立遺伝子を有し、アンチセンスオリゴマーは、第1の対立遺伝子から転写されたR I C プレmRNAの標的とされた部分に結合する。

#### 【0008】

他の実施形態では、被験体は、標的タンパク質の量または機能の不足から結果として生じる常染色体劣性遺伝疾患によって引き起こされた疾病を有し、ここで被験体は、a)第1の変異対立遺伝子であって、そこから、i)標的タンパク質が野生型対立遺伝子からの生成と比較して低下したレベルで生成される、ii)標的タンパク質が等価な野生型タンパク質と比較して低下した機能を有する形態で生成される、またはiii)標的タンパク質が生成されない、第1の変異対立遺伝子、および第2の変異対立遺伝子であって、そこから、b) i)標的タンパク質が野生型対立遺伝子からの生成と比較して低下したレベルで生成される、ii)標的タンパク質が等価な野生型タンパク質と比較して低下した機能を有する形態で生成される。またはiii)標的タンパク質が生成されない、第2の変異

10

20

30

40

50

対立遺伝子を含み、ここで R I C プレ m R N A は、第 1 の対立遺伝子及び / 又は第 2 の対立遺伝子から転写される。実施形態では、標的タンパク質は、低下したレベル、および等価な野生型タンパク質と比較して低下した機能を有する形態の両方で生成される。

【 0 0 0 9 】

実施形態では、標的タンパク質は、等価な野生型タンパク質と比較して低下した機能を有する形態で生成される。他の実施形態では、標的タンパク質は、等価な野生型タンパク質と比較して完全に機能的である形態で生成される。

【 0 0 1 0 】

実施形態では、機能 R N A の量の不足は、機能 R N A のハプロ不全によって引き起こされ、ここで被験体は、機能的である機能 R N A をコードする第 1 の対立遺伝子、機能 R N A が生成されない第 2 の対立遺伝子、または非機能性である機能 R N A をコードする第 2 の対立遺伝子を有し、アンチセンスオリゴマーは、第 1 の対立遺伝子から転写された R I C プレ m R N A の標的とされた部分に結合する。

10

【 0 0 1 1 】

他の実施形態では、被験体は、機能 R N A の量または機能の不足から結果として生じる常染色体劣性遺伝疾患によって引き起こされた疾病を有し、ここで被験体は、 a ) i ) 機能 R N A が野生型対立遺伝子からの生成と比較して低下したレベルで生成される、 i i ) 機能 R N A が等価な野生型タンパク質と比較して低下した機能を有する形態で生成される。または i i i ) 機能 R N A が生成されない、第 1 の変異対立遺伝子、および b ) i ) 機能 R N A が野生型対立遺伝子からの生成と比較して低下したレベルで生成される、 i i ) 機能 R N A が等価な野生型タンパク質と比較して低下した機能を有する形態で生成される。または i i i ) 機能 R N A が生成されない、第 2 の変異対立遺伝子を含み、ここで、 R I C プレ m R N A は、第 1 の対立遺伝子及び / 又は第 2 の対立遺伝子から転写される。実施形態では、機能 R N A は、低下したレベル、および等価な野生型機能 R N A と比較して、低下した機能を有する形態の両方で生成される。

20

【 0 0 1 2 】

実施形態では、機能 R N A は、等価な野生型タンパク質と比較して低下した機能を有する形態で生成される。他の実施形態では、機能 R N A は、等価な野生型タンパク質と比較し、完全に機能的である形態で生成される。

【 0 0 1 3 】

30

実施形態では、 R I C プレ m R N A の標的とされた部分は、保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に対する領域 + 6 から、保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対する領域 - 1 6 内の保持されたイントロンにある。実施形態では、 R I C プレ m R N A の標的とされた部分は、保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に対する領域 + 6 から + 1 0 0 内の保持されたイントロン内；または保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に対する領域 - 1 6 から - 1 0 0 内の保持されたイントロンにある。実施形態では、 R I C プレ m R N A の標的とされた部分は、保持されたイントロンの 5 ' スプライス部位に隣接しているエクソンにおける領域 + 2 e から - 4 e 内；または保持されたイントロンの 3 ' スプライス部位に隣接しているエクソンにおける領域 + 2 e から - 4 e 内にある。

40

【 0 0 1 4 】

実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、機能 R N A または標的タンパク質をコードする遺伝子から転写されたプレ m R N A の選択的スプライシングを調節することにより標的タンパク質または機能 R N A の量を増加させない。実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能 R N A をコードする遺伝子の変異から結果として生じる異常スプライシングを調節することにより標的タンパク質または機能 R N A の量を増加させない。

【 0 0 1 5 】

実施形態では、 R I C プレ m R N A は、全長プレ m R N A の部分的スプライシングまたは野生型プレ m R N A の部分的スプライシングによって生成された。実施形態では、標

50

的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAは、全長成熟mRNAまたは野生型成熟mRNAである。実施形態では、生成された標的タンパク質は、全長タンパク質または野生型タンパク質である。実施形態では、生成された機能RNAは、全長機能RNAまたは野生型機能RNAである。

【0016】

実施形態では、アンチセンスオリゴマーと接触された細胞において生成された標的タンパク質または機能RNAをコードする、mRNAの合計量または成熟mRNAの合計量は、対照細胞において生成された標的タンパク質または機能RNAをコードする、mRNAの合計量または成熟mRNAの合計量と比較して、約1.1倍から約10倍、約1.5倍から約10倍、約2倍から約10倍、約3倍から約10倍、約4倍から約10倍、約1.1倍から約5倍、約1.1倍から約6倍、約1.1倍から約7倍、約1.1倍から約8倍、約1.1倍から約9倍、約2倍から約5倍、約2倍から約6倍、約2倍から約7倍、約2倍から約8倍、約2倍から約9倍、約3倍から約6倍、約3倍から約7倍、約3倍から約8倍、約3倍から約9倍、約4倍から約7倍、約4倍から約8倍、約4倍から約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍、増加される。

【0017】

実施形態では、アンチセンスオリゴマーと接触された細胞において生成された標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAの合計量は、対照細胞において生成された標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAの合計量と比較して、約1.1倍から約10倍、約1.5倍から約10倍、約2倍から約10倍、約3倍から約10倍、約4倍から約10倍、約1.1倍から約5倍、約1.1倍から約6倍、約1.1倍から約7倍、約1.1倍から約8倍、約1.1倍から約9倍、約2倍から約5倍、約2倍から約6倍、約2倍から約7倍、約2倍から約8倍、約2倍から約9倍、約3倍から約6倍、約3倍から約7倍、約3倍から約8倍、約3倍から約9倍、約4倍から約7倍、約4倍から約8倍、約4倍から約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍、増加される。

【0018】

実施形態では、アンチセンスオリゴマーと接触された細胞において生成された標的タンパク質または機能RNAをコードする成熟mRNAの合計量は、対照細胞において生成された標的タンパク質または機能RNAをコードする成熟mRNAの合計量と比較して、約1.1倍から約10倍、約1.5倍から約10倍、約2倍から約10倍、約3倍から約10倍、約4倍から約10倍、約1.1倍から約5倍、約1.1倍から約6倍、約1.1倍から約7倍、約1.1倍から約8倍、約1.1倍から約9倍、約2倍から約5倍、約2倍から約6倍、約2倍から約7倍、約2倍から約8倍、約2倍から約9倍、約3倍から約6倍、約3倍から約7倍、約3倍から約8倍、約3倍から約9倍、4倍から約7倍、約4倍から約8倍、約4倍から約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍、増加される。

【0019】

実施形態では、アンチセンスオリゴマーと接触された細胞によって生成された標的タンパク質または機能RNAの合計量は、対照細胞によって生成された標的タンパク質または機能RNAの量と比較して、約1.1倍から約10倍、約1.5倍から約10倍、約2倍から約10倍、約3倍から約10倍、約4倍から約10倍、約1.1倍から約5倍、約1.1倍から約6倍、約1.1倍から約7倍、約1.1倍から約8倍、約1.1倍から約9倍、約2倍から約5倍、約2倍から約6倍、約2倍から約7倍、約2倍から約8倍、約2倍から約9倍、約3倍から約6倍、約3倍から約7倍、約3倍から約8倍、約3倍から約9倍、約4倍から約7倍、約4倍から約8倍、約4倍から約9倍、少なくとも約1.1倍、

10

20

30

40

50

少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍、増加される。

【0020】

実施形態では、該方法は、R I C プレmRNAを有する細胞を、ホスホロチオエート結合またはホスホジアミデート結合を含む骨格修飾 (backbone modification) を含むアンチセンスオリゴマーと接触させる工程を含む。実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホジアミデートモルホリノ (PMO)、ロックド核酸 (LNA)、ペプチド核酸 (PNA)、2'-O-メチル、2'-フルオロ、または2'-O-メトキシエチル部分を含む。実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、少なくとも1つの修飾された糖部を含む。関連する実施形態では、各糖部は、修飾された糖部である。

【0021】

実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、8～50の核酸塩基から成る。実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、8～40の核酸塩基、8～35の核酸塩基、8～30の核酸塩基、8～25の核酸塩基、8～20の核酸塩基、8～15の核酸塩基、9～50の核酸塩基、9～40の核酸塩基、9～35の核酸塩基、9～30の核酸塩基、9～25の核酸塩基、9～20の核酸塩基、9～15の核酸塩基、10～50の核酸塩基、10～40の核酸塩基、10～35の核酸塩基、10～30の核酸塩基、10～25の核酸塩基、10～20の核酸塩基、10～15の核酸塩基、11～50の核酸塩基、11～40の核酸塩基、11～35核酸塩基、11～30核酸塩基、11～25核酸塩基、11～20核酸塩基、11～15核酸塩基、12～50核酸塩基、12～40核酸塩基、12～35核酸塩基、12～30核酸塩基、12～25核酸塩基、12～20核酸塩基、または12～15核酸塩基から成る。実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、タンパク質をコードするR I C プレmRNAの標的とされた部分に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相補的である。

【0022】

前の方法のいずれかにおいて、細胞は、標的タンパク質または機能RNAをコードする遺伝子から転写されたR I C プレmRNAの集団を含むことができ、ここで、R I C プレmRNAの集団は、2つ以上の保持されたイントロンを含み、アンチセンスオリゴマーは、R I C プレmRNAの集団において最も豊富な保持されたイントロンに結合する。これらの実施形態では、最も豊富な保持されたイントロンへのアンチセンスオリゴマーの結合は、標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAを生成するために、R I C プレmRNAの集団からの2つ以上の保持されたイントロンのスプライシングを誘発することができる。

【0023】

他の実施形態では、細胞は、標的タンパク質または機能RNAをコードする遺伝子から転写されたR I C プレmRNAの集団を含み、ここで、R I C プレmRNAの集団は、2つ以上の保持されたイントロンを含み、アンチセンスオリゴマーは、R I C プレmRNAの集団において2番目に豊富な保持されたイントロンに結合する。これらの実施形態では、2番目に豊富な保持されたイントロンへのアンチセンスオリゴマーの結合は、標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAを生成するために、R I C プレmRNAの集団からの2つ以上の保持されたイントロンのスプライシングを誘発することができる。

【0024】

前の方法では、疾患は疾患または障害であり得る。これらの実施形態では、疾患または障害は、以下から選択され得る：血栓性血小板減少性紫斑病、結節性硬化症、腎多囊胞病、家族性自律神経不全、X型網膜色素変性症、X I型網膜色素変性症、囊胞性線維症、網膜芽細胞腫、家族性大腸腺腫症、プロテインS欠乏症、サラセミア、および鎌型赤血球

症。関連する実施形態では、標的タンパク質およびR I C プレm R N Aは、以下から選択される遺伝子によってコードされる：ADAMTS13、TSC1、PKD1、IKB KAP、IMPDH1、PRPF31、CFTR、RB1、APC、PROS1、NEDD4L、HBG1、HBG2、およびHBB。実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、SEQ ID NO：1-102から選択されるR I C プレm R N Aの一部に結合することができる。

【0025】

実施形態では、前の方法はいずれも、タンパク質発現を評価する工程をさらに含む。

【0026】

幾つかの実施形態では、被験体はヒトである。他の実施形態では、被験体はヒト以外の動物である。実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、被験体の硝子体内注射、髄腔内注射、腹膜腔内注射、皮下注射、または静脈内注射によって投与される。実施形態では、細胞はエスクビボにある。

10

【0027】

実施形態では、5'スプライス部位に隣接しているエクソンの-3eから-1eおよび保持されたイントロンの+1から+6での9つのヌクレオチドは、対応する野生型配列と同一である。実施形態では、保持されたイントロンの-15から-1および3'スプライス部位に隣接しているエクソンの+1eでの16のヌクレオチドは、対応する野生型配列と同一である。

【0028】

20

本明細書には、本明細書で記載されるような方法に使用されるアンチセンスオリゴマーを含む組成物が記載される。また、アンチセンスオリゴマーおよび賦形剤を含む医薬組成物が記載される。実施形態では、アンチセンスオリゴマーを含む組成物は、不足したタンパク質または不足した機能R N Aに関係する被験体の疾患を処置するために、細胞によって標的タンパク質または機能R N Aの発現を増加させる方法における使用を意図しており、ここで、不足したタンパク質または不足した機能R N Aは、被験体において量または活性が不足しており、アンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能R N Aをコードする保持されたイントロン含有プレm R N A (R I C プレm R N A)の構成的スプライシングを増強させ、ここで標的タンパク質は、(a)不足したタンパク質；または(b)被験体において不足したタンパク質を機能的に増強または交換する、補償タンパク質を含み、および機能R N Aは、(a)不足したR N A；または(b)被験体において不足した機能R N Aを機能的に増強または交換する、補償機能R N Aであり、ここで、R I C プレm R N Aは、保持されたイントロン、5'スプライス部位に隣接しているエクソン、および3'スプライス部位に隣接しているエクソンを含み、ここで、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能R N AをコードするR I C プレm R N Aから切り出され、それによって、被験体において標的タンパク質または機能R N Aの生成または活性を増加させる。

30

【0029】

実施形態では、アンチセンスオリゴマーを含む組成物は、被験体において標的タンパク質または機能R N Aに関係する疾患または障害を処置する方法における使用を意図しており、該方法は、被験体の細胞によって標的タンパク質または機能R N Aの発現を増加させる工程を含み、ここで細胞は、保持されたイントロン、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソン、および保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソンを含む、保持されたイントロン含有プレm R N A (R I C プレm R N A)を有し、R I C プレm R N Aは、標的タンパク質または機能R N Aをコードし、該方法はまた、細胞をアンチセンスオリゴマーと接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能R N AをコードするR I C プレm R N A転写物から構成的に切り出され、それにより、被験体の細胞において、標的タンパク質または機能R N Aをコードするm R N Aのレベルを増加させ、標的タンパク質または機能R N Aの発現を増加させる。

40

50

## 【0030】

実施形態では、アンチセンスオリゴマーを含む組成物は、標的タンパク質または機能RNAの量または活性の不足から結果として生じる被験体の疾病を処置する方法における使用を意図している。実施形態では、疾病は、疾患または障害である。実施形態では、疾患または障害は、以下から選択される：血栓性血小板減少性紫斑病、結節性硬化症、腎多囊胞病、家族性自律神経不全、X型網膜色素変性症、XⅠ型網膜色素変性症、囊胞性線維症、網膜芽細胞腫、家族性大腸腺腫症、プロテインS欠乏症、サラセミア、および鎌型赤血球症。実施形態では、組成物は、標的タンパク質およびRICプレmRNAが以下から選択される遺伝子によってコードされる方法における使用を意図している。ADAMTS13、TSC1、PKD1、IKBKAP、IMPDH1、PRPF31、CFTR、RB1、APC、PROS1、NEDD4L、HBG1、HBG2、およびHBB。10

## 【0031】

実施形態では、組成物のアンチセンスオリゴマーは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する領域+6から、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する領域-16内の保持されたイントロンにある、RICプレmRNAの一部を標的とする。20 実施形態では、組成物のアンチセンスオリゴマーは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する領域+6から+100、または保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する領域-16から-100内の保持されたイントロンにある、RICプレmRNAの一部を標的とする。実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、少なくとも1つの保持されたイントロンの5'スプライス部位の下流にある約100のヌクレオチドから、少なくとも1つの保持されたイントロンの3'スプライス部位の上流にある約100のヌクレオチドの領域内にある、RICプレmRNAの一部を標的とする。実施形態では、RICプレmRNAの標的とされた部分は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける+2eから-4eの領域、または保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける+2eから-4eの領域内にある。

## 【0032】

実施形態では、組成物のアンチセンスオリゴマーまたは本明細書に記載される方法に使用されるようなアンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能RNAをコードする遺伝子から転写されたプレmRNAの選択的スプライシングを調節することにより標的タンパク質または機能RNAの量を増加させない。30 実施形態では、組成物のアンチセンスオリゴマーまたは本明細書に記載される方法に使用されるようなアンチセンスオリゴマーは、標的タンパク質または機能RNAをコードする遺伝子の変異から結果として生じる異常スプライシングを調節することにより標的タンパク質または機能RNAの量を増加させない。

## 【0033】

実施形態では、RICプレmRNAは、全長プレmRNAまたは野生型プレmRNAから部分的スプライシングによって生成された。実施形態では、標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAは、全長成熟mRNAまたは野生型成熟mRNAである。40 実施形態では、生成される標的タンパク質は、全長タンパク質または野生型タンパク質である。実施形態では、生成される機能RNAは、全長機能RNAまたは野生型機能RNAである。

## 【0034】

実施形態では、保持されたイントロンは、律速の(rate-limiting)イントロンである。実施形態では、保持されたイントロンは、前記RICプレmRNAにおいて最も豊富なイントロンである。実施形態では、保持されたイントロンは、前記RICプレmRNAにおいて2番目に豊富なイントロンである。

## 【0035】

実施形態では、組成物のアンチセンスオリゴマーまたは本明細書に記載される方法に使用されるようなアンチセンスオリゴマーは、ホスホロチオエート結合またはホスホロジア50

ミデート結合を含む骨格修飾を含む。実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0036】

実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、ホスホジアミデートモルホリノ、ロックド核酸、ペプチド核酸、2'-O-メチル、2'-フルオロ、または2'-O-メトキシエチル部分を含む。実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、少なくとも1つの修飾された糖部を含む。関連する実施形態では、各糖部は、修飾された糖部である。

【0037】

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

【0038】

実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、タンパク質をコードするRICプレmRNAの標的とされた部分に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相補的である。実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、SEQ ID NO:1-102から選択されるRICプレmRNAの一部に結合する。

【0039】

実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、賦形剤を含む医薬組成物に含まれる。

【0040】

本明細書には、各々がRICプレmRNAの標的部位にハイブリダイズする1セットのアンチセンスオリゴマーの中から、標的タンパク質または機能RNAをコードするRICプレmRNAからの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘発することによって、標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAの量を増加させるアンチセンスオリゴマーを同定する方法が記載され、ここで、RICプレmRNAは、少なくとも1つの保持されたイントロンを含み、該セットのアンチセンスオリゴマーは、1～5のヌクレオチドごとに敷き詰められ(tiled)、および該セットのアンチセンスオリゴマーは、少なくとも1つの保持されたイントロンの5'スプライス部位の上流の約100のヌクレオチドから、少なくとも1つの保持されたイントロンの5'スプライス部位の下流の約100のヌクレオチド、または少なくとも1つの保持されたイントロンの3'スプライス部位の上流の約100のヌクレオチドから、少なくとも1つの保持されたイントロンの3'スプライス部位の下流の約100のヌクレオチドである、配列内のRICプレmRNAにハイブリダイズし、該方法は、a)該セットの第1のアンチセンスオリゴマーをRICプレmRNAを含む細胞に送達する工程；b)RICプレmRNAの量を測定し、第1のアンチセンスオリゴマーが送達された細胞中で標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAの量を測定する工程；c)RICプレmRNAの量を測定し、対照細胞中で標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAの量を測定する工程；およびd)RICプレmRNAと、工程b)およびc)で測定された標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAの量とを比較する工程、を含み、ここで、第1のアンチセンスオリゴマーは、RICプレmRNAの量の観察された減少、および対照細胞と比較した第1のアンチセンスオリゴマーが送達された細胞における標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAの量の観察された増加に基づいて、RICプレ

10

20

30

40

50

mRNAから少なくとも1つの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘発することによって、標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAの量を増加させるアンチセンスオリゴマーとして同定され、該方法はまた、RICプレmRNAからの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘発することによって細胞中の遺伝子からmRNAの量を増加させるアンチセンスオリゴマーを同定するために必要に応じて、該セットのアンチセンスオリゴマーにおいて追加のアンチセンスオリゴマーを用いて、工程a)からd)を繰り返す工程を含む。

【0041】

本明細書にはまた、疾病を処置するためのアンチセンスオリゴマー(ASO)を同定する方法が記載され、ここで該疾病は遺伝子産物の不十分な生成から結果として生じ、該方法は、該疾病を有する被験体から細胞の核内の少なくとも1つのRICプレmRNAの存在を同定する工程を含み、ここで、RICプレmRNAは、少なくとも1つの保持されたイントロンを含み、遺伝子産物をコードする遺伝子から転写され、および成熟mRNAに完全に切り出されたときの同定されたRICプレmRNAは、完全に機能的または部分的に機能的である形態で遺伝子産物をコードし、該方法はまた、a)各々が少なくとも1つのRICプレmRNAの標的部位にハイブリダイズする1セットのASOを調製する工程であって、該セットのアンチセンスオリゴマーが、1~5のヌクレオチドごとに敷き詰められ、該セットのASOが、少なくとも1つの保持されたイントロンの5'スプライス部位の上流の約100のヌクレオチドから、少なくとも1つの保持されたイントロンの5'スプライス部位の下流の約100のヌクレオチド、または少なくとも1つの保持されたイントロンの3'スプライス部位の上流の約100のヌクレオチドから、少なくとも1つの保持されたイントロンの3'スプライス部位の下流の約100のヌクレオチドである、少なくとも1つの配列内のRICプレmRNAにハイブリダイズする、工程；b)該セットのASOにおける第1のASOを少なくとも1つのRICプレmRNAを含む細胞に送達する工程；c)RICプレmRNAの量を測定し、第1のアンチセンスオリゴマーが送達された細胞における遺伝子産物をコードするmRNAの量を測定する工程；d)RICプレmRNAの量を測定し、対照細胞における遺伝子産物をコードするmRNAの量を測定する工程；およびe)工程c)およびd)で得られた値を比較する工程、を含み；ここで、第1のアンチセンスオリゴマーは、RICプレmRNAの量の観察された減少、および対照細胞と比較した第1のアンチセンスオリゴマーが送達された細胞における遺伝子産物をコードするmRNAの量の観察された増加に基づいて、RICプレmRNAから少なくとも1つの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘発することによって、遺伝子産物をコードするmRNAの量を増加させるアンチセンスオリゴマーとして同定され、該方法はまた、RICプレmRNAからの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘発することによって細胞中の遺伝子から遺伝子産物をコードするmRNAの量を増加させるアンチセンスオリゴマーを同定するために必要に応じて、該セットのアンチセンスオリゴマーにおいて追加のアンチセンスオリゴマーを用いて、工程a)からe)を繰り返す工程；さらに、細胞によって生成された遺伝子産物の量を増加させる能力に関して、RICプレmRNAからの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘発することによって、細胞における遺伝子産物をコードするmRNAの量を増加させる、そのようなアンチセンスオリゴマーを試験する工程を含む。

【0042】

<参照による組み込み>

本明細書で挙げられるすべての出願、特許、特許出願は、個々の出願、特許、特許出願がそれぞれ引用によって組み込まれるように具体的且つ個別に示される程度まで、引用によって本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0043】

添付の図面は、一定の比率の縮尺で描かれるように意図されていない。図面は、単に例示であり、本開示の実施には必要とされない。明瞭さの目的で、すべての図面において

10

20

30

40

50

、すべての構成要素が標識付けされてはいない。

【0044】

【図1】図1は、典型的な保持されたイントロン含有(R I C)プレmRNA転写物の略図を示す。5'スプライス部位コンセンサス配列は、-3eから-1eおよび+1から+6(「e」と標識された数字はエクソンであり、標識されていない数字はイントロンである)まで下線を引かれた文字(文字はヌクレオチドである;大文字:エクソン部分、および小文字:イントロン部分)で示されている。3'スプライス部位コンセンサス配列は、-15から-1および+1e(「e」と標識された数字はエクソンであり、標識されていない数字はイントロンである)まで下線を引かれた文字(文字はヌクレオチドである;大文字:エクソン部分、および小文字:イントロン部分)で示されている。ASOスクリーニングのためのイントロン標的部位は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+6(左の矢印)から、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-16(右の矢印)までのヌクレオチドを含む。実施形態では、ASOスクリーニングのためのイントロン標的部位は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する+6から+100のヌクレオチド、および保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する-16から-100のヌクレオチドを含む。エクソン標的部位は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける+2eから-4eのヌクレオチド、および保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける+2eから-4eのヌクレオチドを含む。「n」または「N」は、あらゆるヌクレオチドを示し、「y」はピリミジンを示す。示される配列は、哺乳動物のスプライス部位のためのコンセンサス配列を表わし、個々のイントロンおよびエクソンは、あらゆる位置でコンセンサス配列と一致する必要はない。

【図2A】図2Aは、核内遺伝子出力の標的とされた増強(Targeted Augmentation of Nuclear Gene Output)(TANGO)のアプローチの略図を示す。図2Aは、核と細胞質の区画に分割された細胞を示す。核内では、エクソン(長方形)およびイントロン(接続線)から成る標的遺伝子のプレmRNA転写は、mRNAを生成するためにスプライシングを受け、このmRNAは、細胞質に輸出され、標的タンパク質へと翻訳される。この標的遺伝子に関して、イントロン1のスプライシングは非効率的であり、保持されたイントロン含有(R I C)プレmRNAは、主として核に蓄積し、細胞質に輸出されない場合、分解されて、標的タンパク質は生成されない。

【図2B】図2Bは、核内遺伝子出力の標的とされた増強(TANGO)のアプローチの略図を示す。図2Bは、核と細胞質の区画に分割された同じ細胞の例を示す。アンチセンスオリゴマー(ASO)による処置は、イントロン1のスプライシングを促進し、mRNAの増加を結果としてもたらし、mRNAは、順に、より高いレベルの標的タンパク質へと翻訳される。

【図3】図3は、7-エクソン/6-イントロン遺伝子の、実施例1に記載されるような、RT-PCRを使用する、イントロン保持のためのスクリーニングの例の略図を示す。番号が付けられた長方形は、イントロンを示す線によって接続されたエクソンを示す。アーチ形の矢印はスプライシング事象を示す。短い横棒は、イントロン保持を評価するために使用されるプライマー対を示す。フォワードプライマーは「F」で示され、リバースプライマーは「R」で示され、つまりF1とR1、F2とR2、F3とR3、F4とR4、F5とR5、およびF6とR6が対である。イントロンは、そのようなイントロンが存在し、隣接したイントロンが切り出される(除去される)ことが観察されるときに、保持されたイントロンとして同定される。

【図4】図4は、7-エクソン/6-イントロン遺伝子の、実施例2に記載されるように、RT-PCRを使用してイントロン保持を確認するためのスクリーニングの例の略図を示す。番号が付けられた長方形は、イントロンを示す線によって接続されたエクソンを示す。アーチ形の矢印はスプライシング事象を示す。短い横棒は、イントロン保持を評価するために使用されるプライマー対を示す。フォワードプライマーは「F」で示され、リバ

ースプライマーは、「R 1」、「R 2」、または「R 3」で標識される。イントロンは、そのようなイントロンが存在し、1つ以上の隣接したイントロンが切り出される（除去される）ことが観察されるときに、保持されたイントロンとして確認される。

【図5】図5は、イントロン除去効率を判定するための典型的なRNase保護アッセイ(RPA)の略図を示す。

【図6A】図6Aは、実施例1に記載されるような、PRPF31およびRB1の遺伝子におけるイントロン保持事象の同定を示す。図6Aは、PRPF31遺伝子の略図を示し、番号が付けられた長方形はエクソンを示し、イントロンは介在線(*intervening lines*)を示す。フォワード('F')また、リバース('R')プライマーは、短線によって示されている。下記は、PRPF31におけるイントロン保持事象に対応するRT-PCR産物を示す代表的なゲルである。RT-PCR産物は、1.5%のエチジウムプロマイド染色したアガロースゲル中で分離された。上のゲルはHeLa細胞の核画分からの産物に対応し、下のゲルは293T細胞からの核画分からの産物に対応する。アスタリスクは、イントロン保持事象のための正しい産物(サイズによる)を示す。

【図6B】図6Bは、実施例1に記載されるような、PRPF31およびRB1の遺伝子におけるイントロン保持事象の同定を示す。図6Bは、RB1遺伝子の略図を示し、番号が付けられた長方形はエクソンを示し、イントロンは介在線を示す。下記は、RB1におけるイントロン保持事象に対応するHeLa核抽出物からのRT-PCR産物を示す代表的なゲルである。RT-PCR産物は、1.5%のエチジウムプロマイド染色したアガロースゲル中で分離された。

【図6C】図6Cは、実施例1に記載されるような、PRPF31およびRB1の遺伝子におけるイントロン保持事象の同定を示す。図6Cは、RB1におけるイントロン保持事象に対応する293T細胞核抽出物からのRT-PCR産物の代表的なゲルを示す。

【図6D】図6Dは、実施例1に記載されるような、PRPF31およびRB1の遺伝子におけるイントロン保持事象の同定を示す。図6Dは、PRPF31およびRB1におけるイントロン保持事象に対応するARPE-19細胞核抽出物からのRT-PCR産物の代表的なゲルを示す。RT-PCR産物は、1.5%のエチジウムプロマイド染色したアガロースゲル中で分離された。

【図6E】図6Eは、実施例1に記載されるような、PRPF31およびRB1の遺伝子におけるイントロン保持事象の同定を示す。図6Eは、PRPF31およびRB1におけるイントロン保持事象に対応するARPE-19細胞の細胞性抽出物からのRT-PCR産物の代表的なゲルを示す。IVS:介在配列(イントロン)。

【図7A】図7Aは、実施例2に記載されるような、PRPF31およびRB1の遺伝子におけるイントロン保持事象の同定を示す。図7Aは、PRPF31におけるイントロン保持事象に対応するRT-PCR産物の代表的なゲルを示す。ARPE-19細胞核抽出物からのRT-PCR産物は、1.5%のエチジウムプロマイド染色したアガロースゲル中で分離された。

【図7B】図7Bは、実施例2に記載されるような、PRPF31およびRB1の遺伝子におけるイントロン保持事象の同定を示す。図7Bは、RB1におけるイントロン保持事象に対応するRT-PCR産物の代表的なゲルを示す。ARPE-19細胞核抽出物からのRT-PCR産物は、1.5%のエチジウムプロマイド染色したアガロースゲル中で分離された。アスタリスクは、示されたプライマー対を使用する、イントロン保持事象のための正しい産物(サイズによる)を示す。IVS:介在配列(イントロン)。

【図8A】図8Aは、実施例3に記載されるような、スプライス部位の変異誘発を介してスプライシング効率を促進することによる遺伝子発現の増加を示す。図8Aは、エクソンを示す番号が付けられた長方形を含む、HBBレポーター遺伝子の略図を示す。実際のHBBスプライス部位配列は、イントロン-エクソンの境界を印して示される。アスタリスクで示されるスプライス部位配列内のヌクレオチドは、スプライス部位配列をコンセンサス配列(HBBスプライス部位の直下の配列)にもたらすための部位特異的変異誘発によって誘導されたヌクレオチド置換の場所を示す。A:IVS1 5'スプライス部位変異

10

20

30

40

50

体、B : I V S 1 3' スプライス部位変異体、C : I V S 2 5' スプライス部位変異体、D : I V S 2 3' スプライス部位変異体。A B、C D、A C および B D : 変異体の組み合わせ。

【図 8 B】図 8 B は、実施例 3 に記載されるような、スプライス部位の変異誘発を介してスプライシング効率を促進することによる遺伝子発現の増加を示す。図 8 B は、野生型 (WT) および変異体の H B B レポーターの放射性 R T - P C R 産物の代表的なゲルを示す。R T - P C R 産物は、5 % のポリアクリルアミドゲル中で分離された。

【図 8 C】図 8 C は、実施例 3 に記載されるような、スプライス部位の変異誘発を介してスプライシング効率を促進することによる遺伝子発現の増加を示す。図 8 C は、G F P に正規化された H B B 転写物に対応するバンドの強度の棒グラフを示す。倍率変化は、WT 10 H B B 産物に対してプロットされた。黒線は 1 の比率を示し、変化はない。

【図 9 A】図 9 A は、実施例 3 に記載されるように、H B B I V S 1' 5 スプライス部位のすぐ下流の A S O を標的とする配列が H B B m R N A を増加させることを示している。図 9 A は、H B B レポーター遺伝子の略図を示す。番号が付けられた長方形はエクソンを示し、介在線はイントロンを示す。オレンジ色の線は I V S 1 + 6 A S O (' + 6 ') を示し、灰色の線は I V S 1 + 7 A S O (' + 7 ') を示す。黒色の線は、H B B 転写物の P C R 増幅に使用されるフォワード (' F ') またはリバース (' R ') プライマーを示す。

【図 9 B】図 9 B は、実施例 3 に記載されるように、H B B I V S 1' 5 スプライス部位のすぐ下流の A S O を標的とする配列が H B B m R N A を増加させることを示している。図 9 B は、示された濃度での、未処理 (-)、模擬処理された (R i M、R N A i M A X または E P、E n d o P o r t e r)、非標的 (N T)、または I V S 1 + 7 2' - O - M e (ゲルの左の部分) または P M O (ゲルの右の部分) の A S O で処理された、野生型 H B B レポーターの放射性 R T - P C R 産物の代表的なゲルを示す。R T - P C R 産物は、5 % のポリアクリルアミドゲル中で分離された。

【図 9 C】図 9 C は、実施例 3 に記載されるように、H B B I V S 1' 5 スプライス部位のすぐ下流の A S O を標的とする配列が H B B m R N A を増加させることを示している。図 9 C は、G F P に正規化された H B B 転写物に対応するバンドの強度の棒グラフを示す。倍率変化は、模擬処理された細胞からの産物に対してプロットされた。緑色のバーは、I V S + 7 2' - O - M e A S O による処置に対応し、オレンジ色のバーは、I V S + 7 P M O A S O による処置に対応する。黒線は 1 の比率を示し、変化はない。

【図 10 A】図 10 A は、実施例 4 に記載されるように、H B B I V S 1' 5 スプライス部位のすぐ下流の I V S 1 + 7 2' - O - M e A S O を標的とする配列が G F P - H B B - T 7 タンパク質レベルを増加させることを示している。図 10 A は、U 2 O S 細胞のゲノムに統合された G F P - H B B - T 7 レポーター遺伝子の略図を示す。「G F P」と標識された長方形は G F P のオープンリーディングフレームを示し、番号が付けられた長方形は H B B エクソンを示し、介在線はイントロンを示し、および「T 7」と標識された長方形は T 7 タグをコード化する配列を示す。「+ 7」と標識された線は、I V S 1 + 7 A S O を示す。

【図 10 B】図 10 B は、実施例 4 に記載されるように、H B B I V S 1' 5 スプライス部位のすぐ下流の配列を標的とする I V S 1 + 7 2' - O - M e A S O が G F P - H B B - T 7 タンパク質レベルを増加させることを示している。図 10 B は、5 0 n M の濃度での、模擬処理された (R i M、R N A i M A X) または I V S 1 + 7 2' - O - M e A S O で処理された、野生型 G F P - H B B - T 7 レポーターのタンパク質生成物の代表的なゲルを示す。タンパク質生成物は、4 - 2 0 % の S D S - ポリアクリルアミドゲル上で分離された。G F P および チューブリンに対する抗体は、タンパク質生成物を検出するために使用された。

【図 10 C】図 10 C は、実施例 4 に記載されるように、H B B I V S 1' 5 スプライス部位のすぐ下流の配列を標的とする I V S 1 + 7 2' - O - M e A S O が G F P - H B B - T 7 タンパク質レベルを増加させることを示している。図 10 C は、2 つの生物学

的複製物から チュープリンに正規化された G F P - H B B - T 7 タンパク質に対応するバンドの強度の棒グラフを示す。倍率変化は、模擬処理された細胞からの産物に対してプロットされた。黒線は 1 の比率を示し、変化はない。

【図 11】図 11 は、実施例 5 に記載されるように、U C S C のゲノムブラウザーにおいて視覚化された、R N A 配列決定 (R N A s e q) を使用する A D A M T S 1 3 遺伝子におけるイントロン保持事象の同定を示す。上のパネルは、T H L E - 3 (ヒトの肝臓上皮) 細胞において発現され、細胞質 (上) または核分画 (下) のいずれかにおいて局在化された、A D A M T S 1 3 転写物に対応する読み取り密度を示す。このパネルの下部に、A D A M T S 1 3 遺伝子のすべての r e f s e q . アイソフォームのグラフ表示が、一定の縮尺で示される。読み取り密度はピークとして示される。最も高い読み取り密度はエクソン (ブラックボックス) に対応し、一方で、細胞画分のいずれにおいてもイントロンのほとんどにおいて読み取り (r e a d s) は観察されていない (矢印の先端を有する線)。イントロン 2 5 および 2 7 のスプライシング効率が低いことを示す細胞質画分と比較して、核画分におけるイントロン 2 5 および 2 7 (矢印によって示される) に対して、より高い読み取り密度が検出され、これはイントロン保持を結果としてもたらす。保持されたイントロン含有プレ m R N A 転写物は、核内に保持され、細胞質に輸出されない。T H L E - 3 細胞におけるイントロン 2 5 に対する読み取り密度は、下の写真に詳細に示される。

【図 12】図 12 は、実施例 6 に記載されるような、放射性 R T - P C R を介する生物情報学的解析の確認を示す。図 11 に示される生物情報学的予測を確認するための放射性 R T - P C R アッセイの略図は、図 12 に描寫される。番号が付けられた長方形はエクソンを示し、介在線はイントロンを示す。黒色の線は、2 つの産物、イントロン - 2 5 保持された (6 5 2 b p) 産物および正しく切り出された (1 8 7 b p) 産物を結果としてもたらす A D A M T S - 1 3 転写物の P C R 増幅に使用される、フォワード (「F 1」) およびリバース (「R 1」) プライマーを示す。下記は、5 % のポリアクリルアミドゲル中で分離された A 1 7 2 (膠芽腫、左) および H e p G 2 (肝細胞癌、右) 細胞の核および細胞質の画分からの放射性 R T - P C R 産物を示す代表的なゲルである。アスタリスクは、正しい産物 (サイズによる) を示す。結果は、両方の細胞質画分には存在しない、両方の細胞株の核画分におけるイントロン - 2 5 保持された産物に対応するバンドを示す。放射性 R T - P C R および R N A s e q の実験からのパーセントのイントロン保持 (P I R) として計算された A D A M T S 1 3 イントロン - 2 5 保持に関する定量化の概要は、右の表に示される。

【図 13】図 13 は、実施例 7 に記載されるように、2 ' - O - M e A S O 、 P S 骨格を使用する、5 ' スプライス部位のすぐ下流または 3 ' スプライス部位の上流にある A D A M T S 1 3 I V S 2 5 を標的とする配列のために実行された A S O w a l k のグラフ表示を示す。A S O は、一度に 5 つのヌクレオチドをシフトすることによってこれらの領域をカバーするように設計された。エクソン 2 4 から 2 9 およびイントロン配列は、一定の比率の縮尺で描かれている。

【図 14】図 14 は、実施例 8 に記載されるような、イントロン 2 5 を標的とする A S O - w a l k の結果を描寫する。上の図では、代表的なゲルは、H e p G 2 細胞における 6 0 n M の濃度での、図 13 に記載されるような、模擬処理された ( - 、 R N A i M A X のみ) 、 S M N 対照の A S O 処理された、または 2 ' - O - M e A S O 標的のイントロン 2 5 で処理された、A D A M T S 1 3 の放射性 R T - P C R 産物を示す。3 つの独立した実験から アクチンに正規化された A D A M T S 1 3 産物に対応するバンドの定量化は、S M N 対照の A S O 処理された生成物に対する倍率変化として下に棒グラフでプロットされている。黒線は 1 の比率を示し、変化はない。アスタリスクは、m R N A のレベルの最も高い増加につながる A S O を示す。

【図 15】図 15 は、実施例 9 に記載されるように、2 つの最も優れた標的 A S O である、A D A M - I V S 2 5 + 2 1 、 A D A M - I V S 2 5 + 2 6 、および A D A M T S 1 3 転写物の減少を結果としてもたらす A S O である、A D A M - I V S - 4 6 に対する用量 - 応答曲線を示す。上のパネルでは、代表的なゲルは、示された濃度での、模擬処理され

10

20

30

40

50

た、SMN対照処理された、ADAM-IVS25+21処理された、ADAM-IVS25+26処理された、またはADAM-IVS-46処理された、HepG2細胞からの放射性RT-PCR ADAMTS13産物を示す。RT-PCR産物は、5%のポリアクリルアミドゲル中で分離された。アクチンに正規化されたADAMTS13産物に対応するバンドの定量化は、模擬処理された産物に対する倍率変化として下に棒グラフでプロットされている。黒線は1の比率を示し、変化はない。

【図16】図16は、実施例10に記載されるような、ADAM-IVS25+21およびADAM-IVS25+26 ASOによるHepG2細胞の処置から結果として生じるADAMTS13タンパク質の増加を示す。上のパネルでは、代表的なゲルは、示された濃度での、模擬処理された、ADAM-IVS25+21処理された、またはADAM-IVS25+26処理された、HepG2細胞からのADAMTS13タンパク質生成物を示す。タンパク質生成物は、8%のSDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離された。ADAMTS-13およびチューブリンに対する抗体は、タンパク質生成物を検出するため使用された。下記の棒グラフは、チューブリンに正規化された、ADAM-IVS25+の21処理された細胞からのADAMTS-13タンパク質レベルに対応するバンドの強度の定量化を示す。倍率変化は、模擬処理された細胞からの産物に対してプロットされた。黒線は1の比率を示し、変化はない。ADAM-IVS25+21は、用量依存的様式でADAMTS13タンパク質生成物を増加させる。

【図17】図17は、実施例11に記載されるような、2'-O-Meおよび5'-Me-Cytosine ASOを使用して、ADAM-IVS25+21およびADAM-IVS25+26 ASOの領域においてADAMTS13 IVS 25を標的とする配列のために実行された、ASO microwalkのグラフ表示を示す。ASOは、一度に1つのヌクレオチドをシフトすることによって領域をカバーするように設計された。エクソン24から29およびイントロン配列は、一定の比率の縮尺で描かれている。

【図18】図18は、実施例12に記載されるような、イントロン25におけるADAM-IVS25+21およびADAM-IVS25+26の領域を標的とするASO-microwalkの結果を描写する。上の図では、代表的なゲルは、HepG2中の60nMの濃度での(図17に記載されている)、模擬処理された(-)、SMN対照のASO処理された、または2'-O-Me、5'-Me-Cytosine ASO処理された、ADAMTS13の放射性RT-PCR産物を示す。2つの独立した実験からのアクチンに正規化されたADAMTS13産物に対応するバンドの定量化は、模擬処理された生成物に対する倍率変化として下に棒グラフでプロットされている。黒線は1の比率を示し、変化はない。2本の薄灰色のバーは、図14および図15に記載される、IVS25 2'-O-Me ASO ADAM-IVS25+21およびADAM-IVS25+26を示す。

【図19】図19は、実施例13に記載されるような、UCSCのゲノムブラウザにおいて視覚化された、RNA配列決定(RNAseq)を使用する、TSC1遺伝子におけるイントロン保持事象の同定を示す。上のパネルは、HCN(主要なヒトの皮質ニューロン)細胞において発現され、細胞質(上)または核画分(下)のいずれかにおいて局在化されたTSC1転写物に対応する読取密度を示す。このパネルの下部に、TSC1遺伝子のすべてのrefseqアイソフォームのグラフ表示が、一定の縮尺で示される。読取密度はピークとして示される。最も高い読取密度はエクソン(ブラックボックス)に対応し、一方で、細胞画分のいずれにおいてもイントロンのほとんどにおいて読み取りは観察されていない(矢印の先端を有する線)。イントロン5、10および11のスプライシング効率が低いことを示す細胞質画分と比較して、核画分におけるイントロン5、10および11(矢印によって示される)に対して、より高い読取密度が検出され、これはイントロン保持を結果としてもたらす。保持されたイントロン含有premRNA転写物は、核内に保持され、細胞質に輸出されない。イントロン10に対する読取密度は、HCN細胞およびASTM(主要なヒト星状細胞)細胞に対する下の写真に詳細に示される。

【図20】図20は、実施例14に記載されるような、図19に示される生物情報学的予

10

20

30

40

50

測を確証するための放射性 R T - P C R アッセイの略図を示す。番号が付けられた長方形はエクソンを示し、介在線はイントロンを示す。黒色の線は、2つの産物、イントロン - 10 保持された (617 bp) 産物および正しく切り出された (278 bp) 産物を結果としてもたらす T S C 1 転写物の P C R 増幅に使用される、フォワード (「F 1」) およびリバース (「R 1」) プライマーを示す。下記は、5% のポリアクリルアミドゲル中で分離された A 172 (膠芽腫) 細胞の核および細胞質の画分からの放射性 R T - P C R 産物を示す代表的なゲル剤である。結果は、細胞質画分において著しく減少される、A 172 細胞の核画分中のイントロン - 10 保持された産物に対応するバンドを示す。バンドの定量化は、T S C 1 転写物のおよそ 36% がイントロン 10 を含有し、この産物が核内で保持されることを示した。さらに、A D A M T S 13 に対して示されるように、放射性 R T - P C R の結果は生物情報学的予測を確証した。放射性 R T - P C R および R N A s e q の実験からのパーセントのイントロン保持 (P I R) として計算された T S C 1 イントロン - 10 保持に関する定量化の概要は、右の表に示される。

【図 21】図 21 は、実施例 15 に記載されるように、2' - O - M e A S O、P S 骨格を使用する、5' スプライス部位のすぐ下流または 3' スプライス部位の上流にある T S C 1 V S 10 を標的とする配列のために実行された A S O w a l k のグラフ表示を示す。A S O は、一度に 5 つのヌクレオチドをシフトすることによってこれらの領域をカバーするように設計された。T S C 1 エクソンイントロン構造は、一定の比率の縮尺で描かれている。

【図 22】図 22 は、実施例 16 に記載されるような、イントロン 10 を標的とする A S O - w a l k の結果を描写する。上の図では、代表的なゲルは、A 172 細胞中の 60 n M の濃度での、図 21 に記載されている、模擬処理された (-)、S M N 対照の A S O 処理された、または 102' - O - M e A S O 標的のイントロンで処理された、T S C 1 の放射性 R T - P C R 産物を示す。2 つの独立した実験からの アクチンに正規化された T S C 1 産物に対応するバンドの定量化は、模擬処理された生成物に対する倍率変化として下に棒グラフでプロットされている。黒線は 1 の比率を示し、変化はない。アスタリスクは、T S C 1 m R N A のレベルの増加につながる A S O を示す。

【図 23】図 23 は、実施例 17 に記載されるような、T S C 1 - I V S 10 + 31 A S O に対する用量 - 応答曲線を示す。上のパネルはでは、代表的なゲルは、示された濃度での、模擬処理された、S M N 対照処理された、または T S C 1 - I V S 10 + 31 処理された、A 172 細胞からの放射性 R T - P C R T S C 1 産物を示す。R T - P C R 産物は、5% のポリアクリルアミドゲル中で分離された。 アクチンに正規化された T S C 1 産物に対応するバンドの定量化は、模擬処理された生成物に対する倍率変化として左下に棒グラフでプロットされている。同じ実験の R T - q P C R の結果は、放射性 R T - P C R 結果を確証する右の棒グラフ上で、模擬処理された生成物に対してプロットされている。黒線は 1 の比率を示し、変化はない。

【図 24】図 24 は、実施例 18 に記載されるような、T S C 1 - I V S 10 + 31 A S O による A 172 細胞の処置から結果として生じる T S C 1 タンパク質の増加を示す。上のパネルはでは、代表的なゲルは、示された濃度での、模擬処理された、S M N 対照処理された、または T S C 1 - I V S 10 + 31 A S O 処理された、A 172 細胞からの T S C 1 タンパク質生成物を示す。タンパク質生成物は、10% の S D S - ポリアクリルアミドゲル上で分離された。T S C 1 および チューブリンに対する抗体は、タンパク質生成物を検出するために使用された。下の棒グラフは、 チューブリンに正規化された、T S C 1 - I V S 10 + の 31 処理された細胞からの T S C 1 タンパク質レベルに対応するバンドの強度の定量化を示す。倍率変化は、模擬処理された細胞からの産物に対してプロットされた。黒線は 1 の比率を示し、変化はない。T S C 1 - I V S 10 + 31 は、T S C 1 タンパク質生成物を増加させる。

【図 25】図 25 は、実施例 19 に記載されるような、U C S C のゲノムブラウザーにおいて視覚化された、R N A 配列決定 (R N A s e q) を使用する I M P D H 1 遺伝子におけるイントロン保持事象の同定を示す。上のパネルは、A R P E 19 (ヒトの網膜上皮)

10

20

30

40

50

細胞において発現され、細胞質（上）または核画分（下）のいずれかにおいて局在化された IMPDH1 転写物に対応する読み取り密度を示す。このパネルの下部に、IMPDH1 遺伝子のすべての ref seq. アイソフォームのグラフ表示が、一定の縮尺で示される。読み取り密度はピークとして示される。最も高い読み取り密度はエクソン（ブラックボックス）に対応し、一方で、細胞画分のいずれにおいてもインtron のほとんどにおいて読み取りは観察されていない（矢印の先端を有する線）。インtron 14 のスプライシング効率が低いことを示す細胞質画分と比較して、核画分におけるインtron 14（矢印によって示される）に対して、より高い読み取り密度が検出され、これはインtron 保持を結果としてもたらす。保持されたインtron 含有 pre-mRNA 転写物は、核内に保持され、細胞質に輸出されない。インtron 14 に対する読み取り密度は、ARPE19 細胞に対する下の写真に詳細に示される。

【図 26】図 26 は、実施例 20 に記載されるように、2'-O-Me ASO、PS 骨格を使用する、5' スプライス部位のすぐ下流または 3' スプライス部位の上流にある IMPDH1 IVS 14 を標的とする配列のために実行された ASO walk のグラフ表示を示す。ASO は、一続きの（a stretch of）4 つのグアニンが ASO 中に存在しない限り、一度に 5 つのヌクレオチドをシフトすることによってこれらの領域をカバーするように設計された。IMPDH1 エクソンインtron 構造は、一定の比率の縮尺で描かれている。

【図 27】図 27 は、実施例 21 に記載されるような、インtron 14 を標的とする ASO-walk の結果を描写する。上の図では、代表的なゲルは、ARPE19 細胞における 60 nM の濃度での、図 21 に記載されている、模擬処理された（-）、SMN 対照の ASO 処理された、または 2'-O-Me ASO 標的のインtron 14 で処理された、IMPDH1 の放射性 RT-PCR 産物を示す。2 つの独立した実験からの アクチンに正規化された IMPDH1 産物に対応するバンドの定量化は、模擬処理された生成物に対する倍率変化として下に棒グラフでプロットされている。黒線は 1 の比率を示し、変化はない。アスタリスクは、IMPDH1 mRNA レベルの最も高い増加につながる ASO を示す。

【図 28】図 28 は、実施例 22 に記載されるような、示された濃度での、IMP-IVS 14 + 48 ASO による ARPE19 細胞の処置から結果として生じる用量依存的様式での IMPDH1 遺伝子発現レベルの増加を示す。ARPE-19 細胞からの IMPDH1（保持され正しく切り出されたインtron-14）および アクチンの放射性 RT-PCR 産物は、5 % のポリアクリルアミドゲル上で分離された。左の棒グラフは、模擬処理された細胞と比較した IMP-IVS 14 + 48 ASO 処理された細胞からの合計の転写物（保持され正しく切り出されたインtron-14）に対して計算された、パーセントのインtron 保持（PIR）の用量依存的低下を実証している（2 つの独立した実験）。2 つの独立した実験からの正しく切り出された転写物レベルの倍率変化は、IMPDH1 転写物レベルの用量依存的増加を示す中央のグラフにおいて模擬処理された細胞に対してプロットされた、RT-qPCR（右の棒グラフ）が実行され、結果として生じる値は アクチンに正規化された。4 つの生物学的複製物の倍率変化は、相対的な模擬処理された IMPDH1 産物とともにプロットされ、これは放射性 RT-PCR の結果を確認している。

【図 29】図 29 は、実施例 23 に記載されるような、ARPE19 細胞における示された濃度での IMP-IVS 14 + 48 ASO 標的を介して達成された IMPDH1 タンパク質レベルの増加を示す。ARPE-19 細胞からのタンパク質溶解物は、4-20 % の SDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離された。IMPDH1、アクチンおよび カテニンに対する抗体は、タンパク質生成物を検出するために使用された。IMPDH1 タンパク質バンドの強度は、アクチンバンドの強度に正規化され、倍率変化は、4 つの生物学的複製物からの模擬処理された生成物に対して計算され、下に棒グラフでプロットされた。

【図 30】図 30 は、実施例 24 に記載されるように、2'-O-Me、5'-Me-C

10

20

30

40

50

ytosine ASOを使用して、IMP-IVS14+48 ASOの領域におけるIMPDH1 IVS14を標的とする配列のために実行されたASO microalkのグラフ表示を示す。ASOは、一度に1つのヌクレオチドをシフトすることによって領域をカバーするように設計された。IMPDH1エクソンイントロン構造は、一定の比率の縮尺で描かれている。

【図31】図31は、実施例25に記載されるように、図30に示されるようなmicroalkから結果として生じるMPDH1発現レベルの増加を示す。RT-qPCRは、ARPE-19細胞から抽出された全RNA上で実行され、ARPE-19細胞は60nMのASO濃度で処理された。IMPDH1遺伝子のCt値は、ct値のアクチン（左）およびRPL32（右）のハウスキーピング遺伝子に正規化され、倍率変化は、棒グラフにおいて模擬処理された細胞からの産物に対してプロットされた。microalkは、IMPDH1転写物レベルをさらに増加させる2つの追加のASOを同定した。

【図32】図32は、実施例26に記載されるような、UCSCのゲノムブラウザにおいて視覚化された、RNA配列決定（RNaseq）を使用するPKD1遺伝子におけるイントロン保持事象の同定を示す。上のパネルは、主要なヒト腎上皮細胞（REN）において発現され、細胞質（上）または核画分（下）のいずれかにおいて局在化されたPKD1転写物に対応する読取密度を示す。このパネルの下部に、PKD1遺伝子のrefseq。アイソフォームのグラフ表示が、一定の縮尺で示される。読取密度はピークとして示される。最も高い読取密度はエクソン（ブラックボックス）に対応し、一方で、細胞画分のいずれにおいてもイントロンのほとんどにおいて読み取りは観察されていない（矢印の先端を有する線）。イントロン32、33、37および38のスプライシング効率が低いことを示す細胞質画分と比較して、核画分におけるこれらのイントロン（矢印によって示される）に対して、より高い読取密度が検出され、これはイントロン保持を結果としてもたらす。保持されたイントロン含有プレmRNA転写物は、核内に保持され、細胞質に輸出されない。イントロン37に対する読取密度は、RENの細胞に対する下の写真に詳細に示される。

【図33】図33は、実施例27に記載されるように、2'-O-Me ASO、PS骨格を使用する、5'スプライス部位のすぐ下流または3'スプライス部位の上流にあるPKD1 IV 37を標的とする配列のために実行されたASO walkのグラフ表示を示す。ASOは、一続きの4つのグアニンがASO中に存在しない限り、一度に5つのヌクレオチドをシフトすることによってこれらの領域をカバーするように設計された。PKD1エクソンイントロン構造は、一定の比率の縮尺で描かれている。

【図34】図34は、実施例28に記載されるような、イントロン37を標的とするASO-walkの結果を描写する。上の図では、代表的なゲルは、HEK293（ヒトの胚腎上皮）細胞における60nMの濃度での、図33に記載されている、模擬処理された（C）、SMN対照のASO処理された、または2'-O-Me ASO標的のイントロン37で処理された、PKD1の放射性RT-PCR産物を示す。2つの独立した実験からのアクチンに正規化されたPKD1産物に対応するバンドの定量化は、模擬処理された生成物に対する倍率変化として下に棒グラフでプロットされている。黒線は1の比率を示し、変化はない。アスタリスクは、PKD1 mRNAレベルの最も高い増加につながるASOを示す。

【図35】図35は、実施例29に記載されるような、示された濃度での、PKD1-IVS37+29 ASOによるHEK293細胞の処置から結果として生じる用量依存的様式でのPKD1遺伝子発現レベルの増加を示す。HEK293細胞からのPKD1（保持され正しく切り出されたイントロン-37）およびアクチンの放射性RT-PCR産物は、5%のポリアクリルアミドゲル上で分離された。左の棒グラフは、模擬処理された細胞（2つの独立した実験）と比較したPKD1-IVS37+29 ASO処理された細胞からの合計の転写物（保持され正しく切り出されたイントロン-37）に対して計算された、パーセントのイントロン保持（PIR）の用量依存的低下を実証している。2つの独立した実験からの正しく切り出された転写物レベルの倍率変化は、PKD1転写物レ

ベルの増加を示す中央のグラフにおいて模擬処理された細胞に対してプロットされた。R T - q P C R (右の棒グラフ) が実行され、結果として生じる値は アクチンに正規化された。4つの生物学的複製物の倍率変化は、相対的な模擬処理された P K D 1 産物とともにプロットされ、これは、放射性 R T - P C R の結果を確証し、P K D 1 転写物レベルの用量依存的増加を示していた。

【図 3 6】図 3 6 は、実施例 3 0 に記載されるような、H E K 2 9 3 細胞における示された濃度での P K D 1 - I V S 3 7 + 2 9 A S O 標的を介して達成された P K D 1 タンパク質レベルの増加を示す。H E K 2 9 3 は、P K D 1 に対する抗体、または I g G アイソタイプ対照を用いて、固定され、透過処理され、および処理された。各疾病における 1 0 , 0 0 0 個の処理された細胞に対してフローサイトメトリー分析が実行され、蛍光強度がプロットされた。倍率変化は、模擬処理された (形質導入されなかった) 産物に対して計算され、P K D 1 - I V S 3 7 + 2 9 A S O による処置後に P K D 1 レベルの増加を示す下の棒グラフにおいてプロットされた。

【図 3 7】図 3 7 は、実施例 3 1 に記載されるような、U C S C のゲノムブラウザーにおいて視覚化された、R N A 配列決定 (R N A s e q) を使用する I K B K A P 遺伝子におけるイントロン保持事象の同定を示す。上のパネルは、A R P E 1 9 、A S T 、主要なヒト気管支上皮細胞 (B R O N ) 、H C N 、R E N 、および T H L E 3 細胞において発現され、細胞質 (各細胞株に対して上) または核画分 (各細胞株に対して下) のいずれかにおいて局在化された P K D 1 転写物に対応する読取密度を示す。このパネルの下部に、I K B K A P 遺伝子の r e f s e q . アイソフォームのグラフ表示が、一定の縮尺で示される。読取密度はピークとして示される。最も高い読取密度はエクソン (ブラックボックス) に対応し、一方で、細胞画分のいずれにおいてもイントロンのほとんどにおいて読み取りは観察されていない (矢印の先端を有する線)。イントロン 7 および 8 のスプライシング効率が低いことを示す細胞質画分と比較して、核画分におけるこれらのイントロン (矢印によって示される) に対して、より高い読取密度が検出され、これはイントロン保持を結果としてもたらす。保持されたイントロン含有プレm R N A 転写物は、核内に保持され、細胞質に輸出されない。イントロン 7 および 8 に対する読取密度は、すべての分析された細胞に対する下の写真に詳細に示される。

【図 3 8】図 3 8 は、実施例 3 2 に記載されるような、A R P E - 1 9 、H e L a および U 2 0 S の細胞株における、それぞれの I K B K A P イントロン 7 の保持レベルを示す。核および細胞質の R N A 画分は、A R P E - 1 9 、H e L a および U 2 0 S の細胞から抽出され、それらの対応する放射性 R T - P C R 産物は、5 % のポリアクリルアミドゲル上で分離された。番号が付けられた長方形はエクソンを示し、介在線はイントロンを示す。結果は、対応する細胞質画分には存在しない、3つの細胞株の核画分中のイントロン 7 保持された産物に対応するバンドを示す。バンドの定量化は、I K B K A P 転写物のおよそ 3 5 % がイントロン 7 を含有し、この産物が核内に保持されることを示した。再び、放射性 R T - P C R の結果は生物情報学的予測を確証した。放射性 R T - P C R に加えて、R N A s e q の実験結果からの合計の転写物 (保持され正しく切り出されたイントロン - 7 ) に対するパーセントのイントロン保持 (P I R ) として計算された、I K B K A P イントロン 7 保持の定量化の概要が、右の表に示される。

【図 3 9】図 3 9 は、実施例 3 3 に記載されるように、2' - O - M e A S O 、P S 骨格を使用する、5' スプライス部位のすぐ下流または 3' スプライス部位の上流にある I K B K A P I V S 7 (上) および I V S 8 (下) を標的とする配列のために実行された A S O w a l k のグラフ表示を示す。A S O は、一度に 5 つのヌクレオチドをシフトすることによってこれらの領域をカバーするように設計された。I K B K A P エクソンイントロン構造は、一定の比率の縮尺で描かれている。

【図 4 0】図 4 0 は、実施例 3 4 に記載されるように、図 3 9 に示されるようなイントロン 7 (上) および 8 (下) の同定の A S O 標的を介して達成された I K B K A P 遺伝子発現レベルの増加を実証している。細胞質 R N A は、6 0 n M の濃度で、模擬処理された、S M N 対照の A S O 処理された、または各 A S O で処理された A R P E - 1 9 細胞から抽

10

20

30

40

50

出された。R T - q P C R は、I K B K A P 発現レベルを測定するために実行され、I K B K A P からの c t 値は、アクチン産物の対応する c t 値に正規化された。倍率変化は、模擬処理された生成物に対してプロットされた。

【図 4 1】図 4 1 は、実施例 3 5 に記載されるように、示された濃度で I K B - I V S 7 + 2 6 または I K B - I V S 8 - 1 6 A S O 、あるいは各々 4 5 n M (合計 9 0 n M) で両方の A S O の組み合わせにより処理された細胞における用量依存的様式での I K B K A P 転写物レベルの増加を示す。A R P E - 1 9 細胞からの細胞質 R N A を使用する、エクソン 6 - 8 ( I K B - I V S 7 + 2 6 、上) またはエクソン 8 - 1 0 ( I K B - I V S 8 - 1 6 、下) に対応する放射性 R T - P C R 産物は、5 % のポリアクリルアミドゲル上で分離された。I K B K A P の発現が、バンド強度を測定することによって定量され、その値は アクチンの値に正規化された。2 つの生物学的複製物からの倍率変化は、模擬処理された細胞の産物に対してプロットされ、各々の代表的なゲルの右の棒グラフにおいて示された。

【図 4 2】図 4 2 は、実施例 3 6 に記載されるように、示された濃度で I K B - I V S 7 + 2 6 または I K B - I V S 8 - 1 6 A S O 、あるいは各々 4 5 n M (合計 9 0 n M) で両方の A S O の組み合わせにより処理された A R P E 1 9 細胞における I K A P タンパク質レベルの用量依存的増加を示す。A R P E - 1 9 細胞からのタンパク質溶解物は、4 - 2 0 % の S D S - ポリアクリルアミドゲル上で抽出され、分離された。I K A P および カテニンに対する抗体は、分離されたタンパク質生成物を検出するために使用された。I K A P タンパク質バンドの強度は、カテニンバンドの強度に正規化され、2 つの生物学的複製物のための倍率変化は、模擬処理された細胞に対して計算され、下の棒グラフでプロットされた。

【0 0 4 5】

<配列>

本出願は、ヌクレオチド配列 S E Q I D N O : 1 - 3 7 4 を含み、これらのヌクレオチド配列は、請求項の前に表 2 ~ 8 および表 1 1 ~ 2 0 にリストされる。表 1 1 ~ 2 0 に S E Q I D N O : 1 - 1 0 2 として明記されたヌクレオチド配列は、本明細書に記載される方法によってアンチセンスオリゴマーにより標的とされ得る配列の例である。表 2 - 8 に S E Q I D N O : 1 0 3 - 3 7 4 として明記されたヌクレオチド配列は、本明細書に記載される方法に有用なアンチセンスオリゴマーの例である。すべての表において、大文字はエクソン配列を表わし、小文字はイントロン配列を表わす。

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 6】

ヒトのタンパク質をコード化する遺伝子の 8 5 パーセント (8 5 %) は、少なくとも 1 つのイントロンを有し、8 は、1 遺伝子当たりのイントロンの平均数であり、イントロンの数は 1 ~ 3 1 6 の範囲に及び得る。個々のイントロンは、異なる効率で一次転写物から切り出され、ほとんどの場合、完全に切り出された m R N A だけが、細胞質中の続く翻訳のために核膜孔を通って輸出される。切り出されていない転写物および部分的に切り出された転写物は、核内で検出可能である。完全には切り出されていない転写物の核保持は、タンパク質に翻訳され得る細胞質中の潜在的に有害な m R N A の蓄積を防ぐための機構であると一般に考えられる。幾つかの遺伝子に関して、最も効率的でないイントロンのスプライシングは、細胞質中の翻訳の前の遺伝子発現における律速的な転写後の工程である。遺伝子発現の核段階に対して律速的であるイントロンのスプライシングが、より効率的なされる場合、完全に切り出された成熟 m R N A の定常状態の生成および対応するタンパク質の翻訳が増強される。そのような方法はまた、標的遺伝子の発現をアップレギュレートすること助けとなり、これには無数の臨床的および研究的に応用がある。遺伝子 (正常な対立遺伝子及び / 又は変異対立遺伝子) の出力の増加は、その遺伝子産物 (例えば、タンパク質または機能 R N A ) の活性の量を減少させる変異を補うのに有用であり得る。多くの遺伝子疾患および障害は、減少されたタンパク質生成または単に部分的に機能的であるタンパク質の生成の結果である。

10

20

30

40

50

## 【0047】

本明細書で使用されるように、用語「含む (comprise)」あるいは「含む (comprises)」または「含む (comprising)」などのその変形は、列挙された特徴（例えば、アンチセンスオリゴマーの場合、定義された核酸塩基配列）を包含することを示すが、他の特徴を除外するように示してはいないと解釈されるべきである。したがって、本明細書で使用されるように、用語「含む (comprising)」は、包含的であり、追加の列挙されていない特徴（例えば、アンチセンスオリゴマーの場合に、追加の列挙されていない核酸塩基の存在）を除外しない。

## 【0048】

本明細書で提供される組成物および方法のいずれかの実施形態では、「含む (comprising)」は、「～から本質的に成る (consisting essentially of)」または「～から成る (consisting of)」と交換され得る。句「～から本質的に成る」は、指定された特徴（例えば核酸塩基配列）の他に、本発明の性質または機能に実質的に影響しない特徴も必要とするために本明細書で使用される。本明細書で使用されるように、用語「成る (consisting)」は、列挙された特徴（例えば核酸塩基配列）単独の存在を示すために使用される（その結果、指定された核酸塩基配列から成るアンチセンスオリゴマーの場合には、追加の列挙されていない核酸塩基の存在は除外される）。

## 【0049】

<核内遺伝子出力の標的とされた増強 >

本明細書には、核内遺伝子出力の標的とされた増強 (TANGO) と呼ばれる標的タンパク質の発現を増加させる方法が記載される。該方法は、保持されたイントロン、5'スプライス部位に隣接しているエクソン、および3'スプライス部位に隣接しているエクソンを含む、および標的タンパク質をコードする、保持されたイントロン含有プレmRNA (RICプレmRNA) を有している（含む）細胞を、RICプレmRNAの標的とされた部分に相補的なアンチセンスオリゴマー (ASO) と接触させる工程を含む。RICプレmRNAの部分へのASOのハイブリダイゼーションは、保持されたイントロンのスプライス部位（5'スプライス部位または3'スプライス部位）でスプライシングの増強を結果としてもたらし、続いて、標的タンパク質の生成を増加させる。

## 【0050】

用語「プレmRNA」および「プレmRNA転写物」は、交換可能に使用されてもよく、少なくとも1つのイントロンを含有するプレmRNA種を指し得る。プレmRNAまたはプレmRNA転写物は、5' - 7' - メチルグアノシンキャップ及び/又はポリAテールを含んでよい。幾つかの実施形態では、プレmRNA転写物は、5' - 7' - メチルグアノシンキャップ及び/又はポリAテールを含まない。プレmRNA転写物は、タンパク質に翻訳されない（または核からの細胞質へと輸送される）場合、非生産的なメッセンジャーRNA (mRNA) 分子である。

## 【0051】

本明細書で使用されるように、「保持されたイントロン含有プレmRNA」（「RICプレmRNA」）は、少なくとも1つの保持されたイントロンを含有するプレmRNA転写物である。RICプレmRNAは、保持されたイントロン、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソン、および保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソンを含有し、標的タンパク質をコードする。「標的タンパク質をコードするRICプレmRNA」は、完全に切り出されたときに標的タンパク質をコードすると理解される。「保持されたイントロン」は、同じ遺伝子によってコードされた、隣接したイントロンなどの1つ以上の他のイントロンが、同じプレmRNA転写物から切り出されたときにプレmRNA転写物中に存在するイントロンである。幾つかの実施形態では、保持されたイントロンは、標的タンパク質をコードするRICプレmRNAにおける最も豊富なイントロンである。実施形態では、保持されたイントロンは、細胞において標的タンパク質をコードする遺伝子から転写されたRICプレmRNAの集

10

20

30

40

50

団における最も豊富なイントロンであり、ここで、R I C プレm R N Aの集団は、2つ以上の保持されたイントロンを含む。実施形態では、標的タンパク質をコードするR I C プレm R N Aの集団における最も豊富なイントロンに標的とされたアンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴマーが標的とされるか又は結合する、保持されたイントロンを含む、集団における2つ以上の保持されたイントロンのスプライシングを誘発する。それによって、実施形態では、標的タンパク質をコードする成熟m R N Aが生成される。用語「成熟m R N A」および「完全に切り出されたm R N A」は、標的タンパク質をコードする完全に処理されたm R N A（例えば、核から細胞質へと輸出され、標的タンパク質へと翻訳される、m R N A）または完全に処理された機能R N Aについて記載するために本明細書で交換可能に使用される。用語「生産的m R N A（productive m R N A）」も、標的タンパク質をコードする完全に処理されたm R N Aについて記載するために使用され得る。10

#### 【0052】

幾つかの実施形態では、標的とされた領域は、標的タンパク質をコードするR I C プレm R N Aにおける2番目に豊富なイントロンである保持されたイントロン中にある。例えば、2番目に豊富な保持されたイントロンは、2番目に豊富な保持されたイントロンのヌクレオチド配列の独自性、特定のヌクレオチドA S Oを標的とする配列設計の容易さ、及び/又はA S Oによりイントロンを標的とすることから結果として生じるタンパク質生成の量の増加が原因で、最も豊富な保持されたイントロンよりも標的とされ得る。実施形態では、保持されたイントロンは、細胞において標的タンパク質をコードする遺伝子から転写されたR I C プレm R N Aの集団における2番目に豊富なイントロンであり、ここで、R I C プレm R N Aの集団は、2つ以上の保持されたイントロンを含む。実施形態では、標的タンパク質をコードするR I C プレm R N Aの集団における2番目に豊富なイントロンに標的とされたアンチセンスオリゴマーは、アンチセンスオリゴマーが標的とされるか又は結合する、保持されたイントロンを含む、集団における2つ以上の保持されたイントロンのスプライシングを誘発する。それによって、実施形態では、標的タンパク質をコードする完全に切り出された（成熟）R N Aが生成される。20

#### 【0053】

実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、R I C プレm R N Aにおいて保持されていないイントロン内にある標的とされた領域に相補的である。実施形態では、R I C プレm R N Aの標的とされた部分は、保持されていないイントロンの5'スプライス部位に対する領域+6から+100；または保持されていないイントロンの3'スプライス部位に対する領域-16から-100内にある。実施形態では、R I C プレm R N Aの標的とされた部分は、保持されていないイントロンの5'スプライス部位に対する領域+100から、保持されていないイントロンの3'スプライス部位に対する領域-100内にある。領域または配列の場所を同定するために使用されるように、「内（within）」は、列挙される位置で残基を含むように理解される。例えば、領域+6から+100は、位置+6および+100で残基を含む。それによって、実施形態では、標的タンパク質をコードする完全に切り出された（成熟）R N Aが生成される。30

#### 【0054】

幾つかの実施形態では、R I C プレm R N Aの保持されたイントロンは、非効率的に切り出されたイントロンである。本明細書で使用されるように、「非効率的に切り出された」は、R I C プレm R N Aにおける別のスプライス部位でのスプライシングの頻度と比較した、保持されたイントロンに隣接しているスプライス部位（5'スプライス部位または3'スプライス部位）でのスプライシングの比較的低い頻度を指し得る。用語「非効率的に切り出された」はまた、スプライス部位でのスプライシングの相対速度または動態を指し得、ここで、「非効率的に切り出された」イントロンは、R I C プレm R N Aにおける別のイントロンと比較して、より遅い速度で切り出され得るか又は除去され得る。40

#### 【0055】

幾つかの実施形態では、5'スプライス部位に隣接しているエクソンの-3eから-1

50

e および保持されたイントロンの + 1 から + 6 での 9 つのヌクレオチド配列は、対応する野生型配列と同一である。幾つかの実施形態では、保持されたイントロンの - 1 5 から - 1 および 3' スプライス部位に隣接しているエクソンの + 1 e での 1 6 のヌクレオチド配列は、対応する野生型配列と同一である。本明細書で使用されるように、「野生型配列」は、生物学的および科学的情報の N C B I リポジトリ (National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD USA 20894 によって運営される) に寄託された公開された参考文献のゲノム中の標的遺伝子に対するヌクレオチド配列を指す。また本明細書で使用されるように、「e」で示されたヌクレオチド位置は、ヌクレオチドがエクソン (例えば、5' スプライス部位に隣接しているエクソンまたは 3' スプライス部位に隣接しているエクソン) の配列中に存在することを示す。

【 0 0 5 6 】

該方法は、細胞を、標的タンパク質または機能 R N A をコードするプレ m R N A の一部に相補的である A S O と接触させる工程を含み、これによって標的タンパク質または機能 R N A の発現を結果的に増加させる。本明細書で使用されるように、「接触させる工程」または細胞に投与する工程は、A S O と細胞が相互作用するように、A S O を細胞に近接させる方法を指す。A S O で接触させられる細胞は、A S O を細胞へと取り込む又は輸送する。該方法は、疾病または疾患に関係する又は疾病または疾患に関連する細胞を、本明細書に記載される A S O のいずれかと接触させる工程を含む。幾つかの実施形態では、A S O は、A S O を細胞型に対して標的とする、A S O と疾病または疾患に関係する又は疾病または疾患に関連する細胞との間の接触を増強する、または A S O の取り込みを増強するために、さらに修飾され得るか又は別の分子に結合され得る (例えば、共有結合される)。

【 0 0 5 7 】

図 2 A において実証されるように、細胞の核内では、エクソンおよびイントロンから成るプレ m R N A 転写物は、m R N A を生成するためにスプライシングを受け、ここで m R N A は、核から m R N A がタンパク質へと翻訳される細胞の細胞質へと輸出され得る。少なくとも 1 つの非効率的に切り出されたイントロン (保持されたイントロン) を含有するプレ m R N A 転写物の例において、R I C プレ m R N A が生じて、これが核内で維持され、R I C プレ m R N A は、細胞質に輸出される場合には、タンパク質へと翻訳されないが、分解される。特定の理論に縛られることなく、プレ m R N A 転写物の標的とされた部分に相補的である A S O の存在下において、保持されたイントロンのスプライシングは増強されて、それ故、タンパク質へと輸出され翻訳され得る m R N A の量が増加される (図 2 B)。

【 0 0 5 8 】

本明細書で使用されるように、用語「タンパク質生成を増加させる」または「標的タンパク質の発現を増加させる」は、細胞において m R N A から翻訳されるタンパク質 (例えば標的タンパク質) の量を増加させることを意味する。「標的タンパク質」は、発現 / 生成の増加が望まれるタンパク質であり得る。幾つかの実施形態では、標的タンパク質は、表 1 に示されるタンパク質のいずれかなどの疾患に関係するタンパク質である。例えば、R I C プレ m R N A を発現する細胞を R I C プレ m R N A 転写物の標的とされた部分に相補的である A S O と接触させる工程は、結果として、プレ m R N A によってコードされたタンパク質 (例えば標的タンパク質) の量の測定可能な増加をもたらす。タンパク質の生成を測定または検出する方法は、当業者に明白であり、例えば、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡検査法、および E L I S A を含む。

【 0 0 5 9 】

幾つかの実施形態では、細胞を R I C プレ m R N A 転写物の標的とされた部分に相補的である A S O と接触させる工程は、結果として、A S O の欠如 / 処置の欠如下における細胞によって生成されたタンパク質の量と比較して、少なくとも 1 0 、 2 0 、 3 0 、 4 0

10

20

30

40

50

、50、60、80、100、200、300、400、500、または1000%の生成されたタンパク質（例えば標的タンパク質）の量の増加をもたらす。実施形態では、アンチセンスオリゴマーが接触させられた細胞によって生成された標的タンパク質の合計量は、対照化合物によって生成された標的タンパク質の量と比較して、約1.1倍から約10倍、約1.5倍から約10倍、約2倍から約10倍、約3倍から約10倍、約4倍から約10倍、約1.1倍から約5倍、約1.1倍から約6倍、約1.1倍から約7倍、約1.1倍から約8倍、約1.1倍から約9倍、約2倍から約5倍、約2倍から約6倍、約2倍から約7倍、約2倍から約8倍、約2倍から約9倍、約3倍から約6倍、約3倍から約7倍、約3倍から約8倍、約3倍から約9倍、約4倍から約7倍、4倍から約8倍、約4倍から約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも5倍、または少なくとも約10倍増加される。対照化合物は、例えば、RIC プレ mRNA の標的とされた部分に相補的でないオリゴヌクレオチドであり得る。

#### 【0060】

幾つかの実施形態では、細胞をRIC プレ mRNA 転写物の標的とされた部分に相補的であるASOと接触させる工程は、結果として、標的タンパク質または機能RNAをコードする成熟mRNAを含む、標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAの量の増加をもたらす。幾つかの実施形態では、標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNA、または標的タンパク質または機能RNAをコードする成熟mRNAの量は、ASOの欠如/処置の欠如下における細胞によって生成されたタンパク質の量と比較して、少なくとも10、20、30、40、50、60、80、100、200、300、400、500、または1000%増加される。実施形態では、標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNA、またはアンチセンスオリゴマーが接触させられた細胞において生成された標的タンパク質または機能RNAをコードする成熟mRNAの合計量は、未処理の細胞、例えば、未処理の細胞または対照化合物で処理された細胞における生成された成熟したRNAの量と比較して、約1.1倍から約10倍、約1.5倍から約10倍、約2倍から約10倍、約3倍から約10倍、約4倍から約10倍、約1.1倍から約5倍、約1.1倍から約6倍、約1.1倍から約7倍、約1.1倍から約8倍、約1.1倍から約9倍、約2倍から約5倍、約2倍から約6倍、約2倍から約7倍、約2倍から約8倍、約2倍から約9倍、約3倍から約6倍、約3倍から約7倍、3倍から約8倍、約3倍から約9倍、約4倍から約7倍、約4倍から約8倍、約4倍から約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍増加される。対照化合物は、例えば、RIC プレ mRNA の標的とされた部分に相補的でないオリゴヌクレオチドであり得る。

#### 【0061】

実施形態では、細胞をRIC プレ mRNA 転写物の標的とされた部分に相補的であるASOと接触させる工程は、結果として、機能RNAの量の増加をもたらす。幾つかの実施形態では、機能RNAの量は、ASOの欠如/処置の欠如下における細胞によって生成された機能RNAの量と比較して、少なくとも10、20、30、40、50、60、80、100、200、300、400、500、または1000%増加される。実施形態では、アンチセンスオリゴマーが接触させられた細胞において生成された機能RNAの合計量は、未処理の細胞、例えば、未処理の細胞または対照化合物で処理された細胞における生成された機能RNAの量と比較して、約1.1倍から約10倍、約1.5倍から約10倍、約2倍から約10倍、約3倍から約10倍、約4倍から約10倍、約1.1倍から約5倍、約1.1倍から約6倍、約1.1倍から約7倍、約1.1倍から約8倍、約1.1倍から約9倍、約2倍から約5倍、約2倍から約6倍、約2倍から約7倍、約2倍から約8倍、約2倍から約9倍、約3倍から約6倍、約3倍から約7倍、約3倍から約8倍、約3倍から約9倍、約4倍から約7倍、4倍から約8倍、約4倍から約9倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍増加される。対照化合物は、例えば、RIC プレ mRNA の標的とされた部分に相補的でないオリゴヌクレオチドであり得る。

なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも5倍、または少なくとも約10倍増加される。対照化合物は、例えば、R I C プレmRNAの標的とされた部分に相補的でないオリゴヌクレオチドであり得る。本明細書で提供される方法のいずれかが、機能RNA、例えば、非タンパク質コード化RNAなどの、タンパク質をコードしないmRNAの生成を増加させるために使用され得る。幾つかの実施形態では、機能RNAまたは非タンパク質コード化RNAは、疾病、例えば疾患または障害に関係している。

【0062】

< R I C プレmRNAからの保持されたイントロンの構成的スプライシング >

本明細書で提供される方法およびアンチセンスオリゴヌクレオチド組成物は、標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNA、または標的タンパク質または機能RNAをコードする成熟mRNAのレベルを増加させることによって、例えば、標的タンパク質または機能RNAの量または活性の不足によって引き起こされた疾病を有する被験体における細胞において、標的タンパク質または機能RNAの発現を増加させるのに有用である。特に、本明細書で記載されるような方法および組成物は、標的タンパク質または機能RNAをコードするR I C プレmRNA転写物からの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘発し、それによって、標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNA、または標的タンパク質または機能RNAをコードする成熟mRNAのレベルを増加させ、標的タンパク質または機能RNAの発現を増加させる。

【0063】

R I C プレmRNAからの保持されたイントロンの構成的スプライシングは、保持されたイントロンをR I C プレmRNAから正しく除去し、ここで、保持されたイントロンは野生型スプライス配列を有する。構成的スプライシングは、本明細書で使用されるように、遺伝子または対立遺伝子から転写されたプレmRNAの選択的スプライシングまたは異常スプライシングを引き起こす変異を有する遺伝子または対立遺伝子から転写されたR I C プレmRNAからの保持されたイントロンのスプライシングを包含しない。例えば、本明細書で提供される方法およびアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して誘発された、保持されたイントロンの構成的スプライシングは、プレmRNAに対する異常スプライシングを訂正しないか、またはプレmRNAの選択的スプライシングに影響せず、結果的に標的タンパク質または機能RNAの発現が増加される。

【0064】

実施形態では、構成的スプライシングは、保持されたイントロンをR I C プレmRNAから正しく除去し、ここで、R I C プレmRNAは、完全に機能的な標的タンパク質または機能RNAをコードする、野生型遺伝子または対立遺伝子または多形性遺伝子または対立遺伝子から転写され、遺伝子または対立遺伝子は、保持されたイントロンの選択的スプライシングまたは異常スプライシングを引き起こす変異を有さない。

【0065】

幾つかの実施形態では、標的タンパク質または機能RNAをコードするR I C プレmRNAからの保持されたイントロンの構成的スプライシングは、標的タンパク質または機能RNAをコードするR I C プレmRNAからの保持されたイントロンを正しく除去し、ここで、R I C プレmRNAは、遺伝子または対立遺伝子から転写され、そこから、標的遺伝子または機能RNAが野生型対立遺伝子からの生成と比較して低下したレベルで生成され、および遺伝子または対立遺伝子は、保持されたイントロンの選択的スプライシングまたは異常スプライシングを引き起こす変異を有さない。これらの実施形態では、構成的に切り出された保持されたイントロンの正しい除去は、結果として、等価な野生型タンパク質または機能RNAと比較したときに機能的である標的タンパク質または機能RNAの生成をもたらす。

【0066】

他の実施形態では、構成的スプライシングは、保持されたイントロンをR I C プレmRNAから正しく除去し、ここで、R I C プレmRNAは、等価な野生型タンパク質ま

10

20

30

40

50

たは機能 RNA と比較して低下した機能を有する形態で生成された標的タンパク質または機能 RNA をコードする、遺伝子または対立遺伝子から転写され、遺伝子または対立遺伝子は、保持されたイントロンの選択的スプライシングまたは異常スプライシングを引き起こす変異を有さない。これらの実施形態では、構成的に切り出された保持されたイントロンの正しい除去は、結果として、部分的に機能的な標的タンパク質、または等価な野生型タンパク質または機能 RNA と比較したときに部分的に機能的である機能 RNA の生成をもたらす。

【 0 0 6 7 】

構成的スプライシングによる保持されたイントロンの「正しい除去」は、エクソンの部分の除去がない、全イントロンの除去を指す。

10

【 0 0 6 8 】

実施形態では、本明細書に記載される又は本明細書に記載される方法において使用されるようなアンチセンスオリゴマーは、機能 RNA または標的タンパク質をコードする遺伝子から転写されたプレ m RNA の選択的スプライシングまたは異常スプライシングを調節することにより、標的タンパク質または機能 RNA をコードする m RNA の量、標的タンパク質の量、または機能 RNA の量を増加させない。選択的スプライシングまたは異常スプライシングの調節は、RNA 種の配列および長さを分析する既知の方法を使用して、例えば、RT - PCR によって、および本明細書および文献中で別記される方法を使用して測定することができる。実施形態では、選択的スプライシングまたは異常スプライシングの調節は、少なくとも 10 % または 1.1 倍の対象の切り出された種の量の増加または減少に基づいて判定される。実施形態では、調節は、本発明の方法において標的タンパク質または機能 RNA をコードする m RNA の増加の判定に関して本明細書に記載されるように、少なくとも 10 % から 100 % または 1.1 倍から 10 倍であるレベルでの増加または減少に基づいて判定される。

20

【 0 0 6 9 】

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

30

【 0 0 7 0 】

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

【 0 0 7 1 】

40

<アンチセンスオリゴマー>

本開示の一態様は、RIC プレ m RNA の標的とされた部分に結合することによってスプライシングを増強する、アンチセンスオリゴマーを含む組成物である。本明細書で使用されるように、用語「ASO」および「アンチセンスオリゴマー」は、交換可能に使用され、ワトソン・クリック塩基対またはゆらぎ塩基対 (G - U) によって標的核酸（例えば、RIC プレ m RNA）配列にハイブリダイズする、核酸塩基を含む、ポリヌクレオチドなどのオリゴマーを指す。ASO は、標的配列に相補的な又はほぼ相補性的である（例えば、標的配列に結合し、スプライス部位でスプライシングを増強させるのに十分な相補性）正確な配列を有し得る。ASO は、標的核酸（例えば、プレ m RNA 転写物の標的とされた部分）に結合し（ハイブリダイズし）、生理学的条件下でハイブリダイズされた

50

ままであるように設計されている。典型的に、ASOは、意図した（標的とされた）核酸配列以外の部位にハイブリダイズする場合、標的核酸でない限られた数の配列に（標的核酸以外の少数の部位に）ハイブリダイズする。ASOの設計は、プレmRNA転写物の標的とされた部分の核酸配列、またはゲノまたはか細胞プレmRNAまたはトランスクリプトームにおける他の場所での十分類似した核酸配列の発生を考慮に入れることができ、その結果、ASOが他の部位に結合し「オフターゲット」効果を引き起こす可能性は、限定されている。例えば、発明の名称「Reducing Nonsense-Mediated mRNA Decay」のWO 2015/035091として公開されたPCT国際出願番号、PCT/US2014/054151におけるものなどの、当業者に既知のアンチセンスオリゴマーは、本明細書に記載される方法を実施するために使用され得る。

10

#### 【0072】

幾つかの実施形態では、ASOは、標的核酸またはRICプレmRNAの標的とされた部分に「特異的にハイブリダイズする」または「特異的である」。典型的に、そのようなハイブリダイゼーションは、37より実質的に高い融解温度（Tm）で、好ましくは少なくとも50で、および典型的に60からおよそ90の間で生じる。そのようなハイブリダイゼーションは、好ましくは、厳格なハイブリダイゼーション条件に対応している。与えられたイオン強度およびpHで、Tmは、標的配列の50%が相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする温度である。

#### 【0073】

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

20

30

40

#### 【0074】

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

50

## 【0075】

本明細書に記載されるASOは、RICプレmRNAの標的部分に存在する核酸塩基に相補的である核酸塩基を含む。用語「ASO」は、オリゴヌクレオチド、および標的mRNA上の相補的な核酸塩基にハイブリダイズすることができる核酸塩基を含むが、ペプチド核酸(PNA)などの糖部を含まない、他のオリゴマー分子を具体化する。ASOは、自然発生のヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、修飾されたヌクレオチド、またはそれらの2つ又は3つの任意の組み合わせを含み得る。用語「自然発生のヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む。用語「修飾されたヌクレオチド」は、修飾された又は置換された糖類及び/又は修飾された骨格を有するヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、ASOのヌクレオチドのすべてが、修飾されたヌクレオチドである。本明細書に記載される方法および組成物と適合するASOの化学修飾およびのASOの成分は、当業者に明白であり、例えば、米国特許第8,258,109号B2、米国特許第5,656,612号、米国特許公開番号2012/0190728、およびDias and Stein, Mol. Cancer Ther. 2002, 1, 347-355で見られ得、それら全体が引用によって本明細書に組み込まれる。

## 【0076】

ASOの核酸塩基は、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルなどの自然発生の未修飾の核酸塩基、または標的プレmRNAの上に存在する核酸塩基との水素結合が可能であるように未修飾の核酸塩基に十分類似している合成または修飾された核酸塩基であってもよい。修飾された核酸塩基の例は、限定されないが、ヒポキサンチン、キサンチン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、および5-ヒドロキシメチルシトシンを含む。

## 【0077】

本明細書に記載されるASOはまた、オリゴマーの成分に結合する骨格構造を含む。用語「骨格構造」および「オリゴマー結合」は、交換可能に使用され、ASOのモノマー間の結合を指し得る。自然発生のオリゴヌクレオチドでは、骨格は、オリゴマーの糖部を結合する3'-5'ホスホジエステル結合を含む。本明細書に記載されるASOの骨格構造またはオリゴマー結合は、(限定されないが)ホスホロチオエート、ホスホジチオエート、ホスホセレノエート、ホスホジセレノエート、ホスホアニロチオエート、ホスホラニラデート(phosphoranyl adate)、ホスホラミデート(phosphoramidate)などを含む。例えば、LaPlanche et al. Nucleic Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein et al. Nucleic Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al. Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogue: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. U.S. Pat. No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990)、を参照。幾つかの実施形態では、ASOの骨格構造は、亜リン酸を含有していないが、例えば、ペプチド核酸(PNA)、またはカルバミン酸塩、アミド、および直鎖および環式の炭化水素基を含む結合基において、ペプチド結合を含有している。幾つかの実施形態では、骨格修飾は、ホスホチオエート結合である。幾つかの実施形態では、骨格修飾は、ホスホラミデート結合である。

## 【0078】

本明細書に記載されるASOのいずれかは、自然発生のヌクレオチド中に存在するリボースまたはデオキシリボースを含む糖部、またはモルホリン環を含む、修飾された糖部または糖アナログを含有し得る。修飾された糖部の限定しない例は、2'-O-メチル(2'-O-Me)、2'-O-メトキシエチル(2'MOE)、2'-O-アミノエチル、

2' F ; N 3' > - P 5' ホスホラミデート、2' ジメチルアミノオキシエトキシ、2' ジメチルアミノエトキシエトキシ、2' - グアニジニウム (guanidinium) 、2' - O - グアニジニウムエチル、カルバミン酸塩修飾した糖、および二環式修飾した糖などの、2' 置換基を含む。幾つかの実施形態では、糖部修飾は、2' - O - Me 、2' F 、および 2' MOE から選択される。幾つかの実施形態では、糖部修飾は、ロックド核酸 (LNA) におけるような追加の架橋結合である。幾つかの実施形態では、糖アナログは、ホスホロジアミデートモルホリノ (PMO) などのモルホリン環を含有している。幾つかの実施形態では、糖部は、リボフラノシルまたは 2' デオキシリボフラノシルの修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、2' 4' 抑制された (constrained) 2' O - メチルオキシエチル (cMOE) 修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、cEt 2' , 4 抑制された 2' - O エチルDNA修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、トリシクロDNA (tcDNA) 修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、エチレン核酸 (ENA) 修飾を含む。幾つかの実施形態では、糖部は、MCE 修飾を含む。修飾は当該技術分野で既知であり、文献、例えば、Jarver, et al. , 2014 , "A Chemical View of Oligonucleotides for Exon Skipping and Related Drug Applications , " Nucleic Acid Therapeutics 24 (1) : 37 - 47 に記載され、この目的のための引用によって本明細書に組み込まれる。

## 【0079】

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

## 【0080】

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

## 【0081】

幾つかの実施形態では、ASOは、2' - O - (2 - メトキシエチル) (MOE) のホスホチオエート修飾されたヌクレオチドで構成される。そのようなヌクレオチドで構成されたASOは、特に、本明細書で開示される方法によく適しており、そのような修飾を有しているオリゴマーは、ヌクレアーゼ分解に対する著しく増強された耐性および増加したバイオアベイラビリティを有すると示されており、これによって、例えば、本明細書に記載される幾つかの実施形態における経口送達に適している。例えば、Geary et al. , J Pharmacol Exp Ther. 2001 ; 296 (3) : 890 - 7 ; Geary et al. , J Pharmacol Exp Ther. 2001 50

; 296(3):898-904を参照。

【0082】

ASOを合成する方法は当業者に既知である。代替的に又はさらに、ASOは商用源から得られ得る。

【0083】

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

【0084】

他の実施形態では、ASOは、RIC プレmRNAにおける保持されたイントロンの5'スプライス部位の（3'方向における）下流（例えば、5'スプライス部位に対する正数で指定された方向）にあるRIC プレmRNAの標的とされた部分に相補的である（および結合する）（図1）。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する領域+6から+100内にあるRIC プレmRNAの標的とされた部分に相補的である。幾つかの実施形態では、ASOは、5'スプライス部位に対するヌクレオチド+1から+5（5'スプライス部位の下流に位置する第1の5つのヌクレオチド）に相補的ではない。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対するヌクレオチド+6と+50の間の領域内にあるRIC プレmRNAの標的とされた部分に相補的であり得る。幾つかの態様では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する領域+6から+90、+6から+80、+6から+70、+6から+60、+6から+50、+6から+40、+6から+30、または+6から+20内にある標的とされた部分に相補的である。

【0085】

幾つかの実施形態では、ASOは、RIC プレmRNAにおいて保持されたイントロンの3'スプライス部位の上流（5'相対(*relative*)）にある（例えば、負数で指定された方向における）RIC プレmRNAの標的とされた領域に相補的である（図1）。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する領域-16から-100内にあるRIC プレmRNAの標的とされた部分に相補的である。幾つかの実施形態では、ASOは、3'スプライス部位に対するヌクレオチド-1から-15（3'スプライス部位の上流に位置する第1の15のヌクレオチド）に相補的ではない。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する領域-16から-50内にあるRIC プレmRNAの標的とされた部分に相補的である。幾つかの態様では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する領域-16から-90、-16から-80、-16から-70、-16から-60、-16から-50、-16から-40、または-16から-30内にある、標的とされた部分に相補的である。

【0086】

実施形態では、RIC プレmRNAの標的とされた部分は、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する領域+100から、保持されたイントロンの3'スプライス

10

20

30

40

50

部位に対する領域 - 100 内にある。

【0087】

幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソン内（上流）にあるRIC プレ mRNA の標的とされた部分に相補的である（図1）。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける領域 + 2e から - 4e 内にあるRIC プレ mRNA の標的とされた部分に相補的である。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対するヌクレオチド - 1e から - 3e に相補的ではない。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの5'スプライス部位に対する領域 - 4e から - 100e 、 - 4e から - 90e 、 - 4e から - 80e 、 - 4e から - 70e 、 - 4e から - 60e 、 - 4e から - 50e 、 - 4e から - 40e 、 - 4e から - 30e 、または - 4e から - 20e 内にある、RIC プレ mRNA の標的とされた部分に相補的である。

【0088】

幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソン内（下流）にあるRIC プレ mRNA の標的とされた部分に相補的である（図1）。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に隣接しているエクソンにおける領域 + 2e から - 4e 内にあるRIC プレ mRNA への標的とされた部分に相補的である。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対するヌクレオチド + 1e に相補的ではない。幾つかの実施形態では、ASOは、保持されたイントロンの3'スプライス部位に対する領域 + 2e から + 100e 、 + 2e から + 90e 、 + 2e から + 80e 、 + 2e から + 70e 、 + 2e から + 60e 、 + 2e から + 50e 、 + 2e から + 40e 、 + 2e から + 30e 、または + 2e から + 20e 内にある、RIC プレ mRNA の標的とされた部分に相補的である。ASOは、スライシングの特異的結合および有効な増強に適した長さであり得る。幾つかの実施形態では、ASOは8~50の核酸塩基から成る。例えば、ASOは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、または50の核酸塩基の長さである。幾つかの実施形態では、ASOは50を超える核酸塩基から成る。幾つかの実施形態では、ASOは、8~50の核酸塩基、8~40の核酸塩基、8~35の核酸塩基、8~30の核酸塩基、8~25の核酸塩基、8~20の核酸塩基、8~15の核酸塩基、9~50の核酸塩基、9~40の核酸塩基、9~35の核酸塩基、9~30の核酸塩基、9~25の核酸塩基、9~20の核酸塩基、9~15の核酸塩基、10~50の核酸塩基、10~40の核酸塩基、10~35の核酸塩基、10~30の核酸塩基、10~25の核酸塩基、10~20の核酸塩基、10~15の核酸塩基、11~50の核酸塩基、11~40の核酸塩基、11~35の核酸塩基、11~30の核酸塩基、11~25の核酸塩基、11~20の核酸塩基、11~15の核酸塩基、12~50の核酸塩基、12~40の核酸塩基、12~35の核酸塩基、12~30の核酸塩基、12~25の核酸塩基、12~20の核酸塩基、12~15の核酸塩基、13~50の核酸塩基、13~40の核酸塩基、13~35の核酸塩基、13~30の核酸塩基、13~25の核酸塩基、13~20の核酸塩基、14~50の核酸塩基、14~40の核酸塩基、14~35の核酸塩基、14~30の核酸塩基、14~25の核酸塩基、14~20の核酸塩基、15~50の核酸塩基、15~40の核酸塩基、15~35の核酸塩基、15~30の核酸塩基、15~25の核酸塩基、20~50の核酸塩基、20~40の核酸塩基、20~35の核酸塩基、20~30の核酸塩基、20~25の核酸塩基、25~50の核酸塩基、25~40の核酸塩基、25~35の核酸塩基、または25~30の核酸塩基の長さである。幾つかの実施形態では、ASOは、18のヌクレオチドの長さである。幾つかの実施形態では、ASOは、15のヌクレオチドの長さである。幾つかの実施形態では、ASOは、25のヌクレオチドの長さである。

【0089】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態では、異なる化学作用を有するが R I C プレ m R N A の同じ標的とされた部分に相補的である 2 つ以上の A S O が使用される。幾つかの実施形態では、 R I C プレ m R N A の異なる標的とされた部分に相補的である 2 つ以上の A S O が使用される。

【 0 0 9 0 】

実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、1 つ以上の部分または抱合体、例えば、標的とする部分、またはオリゴヌクレオチドの活性または細胞取り込みを増強する他の抱合体に化学的に結合される。そのような部分は、限定されないが、脂質部分、例えば、コレステロール部分、コレステリル部分、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基、ポリアミン、またはポリエチレンギリコール鎖、あるいはアダマンタン酢酸を含む。親油性部分を含むオリゴヌクレオチドおよび調製方法は、公開された文献に記載されている。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定されないが、脱塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、例えば、N - アセチルガラクトサミン ( G a l N A c ) 、N - A c - グルコサミン ( G l u N A c ) 、またはマンノース ( 例えば、マンノース - 6 - リン酸、脂質、あるいはポリ炭化水素化合物を含む、部分と結合する。当該芸術分野で理解される及び文献に記載されるように、例えば、リンカーを使用して、抱合体は、糖、塩基またはリン酸基上の幾つかの位置のいずれかでアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、ヌクレオチドの1 つ以上に結合され得る。リンカーは、二価または三価の分枝リンカーを含むことができる。実施形態では、抱合体は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの 3' 末端に結合される。オリゴヌクレオチドを調製する方法は、例えば、米国特許第 8,450,467 号「 C a r b o h y d r a t e c o n j u g a t e s a s d e l i v e r y a g e n t s f o r o l i g o n u c l e o t i d e s 」に記載され、これは引用によって本明細書に組み込まれる。

【 0 0 9 1 】

幾つかの実施形態では、A S O によって標的とされる核酸は、真核細胞などの細胞において発現された R I C プレ m R N A である。幾つかの実施形態では、用語「細胞」は、細胞の集団を指し得る。幾つかの実施形態では、細胞は、被験体中にある。幾つかの実施形態では、細胞は、被験体から分離される。幾つかの実施形態では、細胞は、エスクビボにある。幾つかの実施形態では、細胞は、疾病または疾患関連の細胞または細胞株である。幾つかの実施形態では、細胞は、( 例えば、細胞培養において ) インピトロにある。

【 0 0 9 2 】

< 医薬組成物 >

記載された組成物の及び記載された方法のいずれかにおいて使用するためのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬組成物または医薬製剤は、製薬産業において周知の及び公開された文献に記載された従来の技術に従って調製され得る。実施形態では、被験体を処置するための医薬組成物または医薬製剤は、上に記載されるような有効な量のアンチセンスオリゴマー、またはその薬学的に許容可能な塩、溶媒和物、水和物、またはエステル、および薬学的に許容可能な希釈剤を含む。医薬製剤のアンチセンスオリゴマーはさらに、薬学的に許容可能な賦形剤、希釈剤または担体を含み得る。

【 0 0 9 3 】

薬学的に許容可能な塩は、過度の毒性、刺激、アレルギー反応などがない、ヒトおよび下等動物の組織と接触させる使用に適しており、合理的なベネフィット・リスク比に相応しており ( 例えば、 S . M . B e r g e , e t a l . , J . P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , 6 6 : 1 - 1 9 ( 1 9 7 7 ) を参照 ) 、この目的のための参照によって本明細書に組み込まれる。塩は、化合物の最終的な分離および精製中にインサイチュで、または遊離基機能を適切な有機酸と反応させることによって別々に調製され得る。薬学的に許容可能な無毒の酸付加塩の例は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、硫酸、および過塩素酸などの、無機酸、または酢酸、シュウ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸、またはマロン酸などの、有機酸で、あるいはイオン交換などの他の文書化さ

10

20

30

40

50

れた方法論を用いることによって形成されたアミノ基の塩である。他の薬学的に許容可能な塩は、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコビル酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオネート、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、グルコン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシ-エタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸塩、シウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバリン酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアノ酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩の塩などを含む。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩は、ナトリウム、リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどを含む。さらに、薬学的に許容可能な塩は、適切な場合、無毒のアンモニウム、第四級アンモニウム、およびハロゲン化物、水酸化物、カルボン酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、低級アルキルスルホン酸塩およびアリールスルホン酸塩などの、対イオンを使用して形成されたアミンカチオンを含む。  
10

#### 【0094】

実施形態では、組成物は、限定されないが、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、ソフトゲル、坐剤、および浣腸剤などの多くの考えられる剤形のいずれかへと製剤される。実施形態では、組成物は、水性、非水性、または混合した培地中の懸濁液として製剤される。水性懸濁液は、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール及び/又はデキストランを含む懸濁液の粘度を増加させる物質さらに含有し得る。懸濁液はまた、安定剤を含有し得る。実施形態では、本発明の医薬製剤または医薬組成物は、限定されないが、溶液、エマルジョン、マイクロエマルジョン、泡、リポソーム含有製剤（例えば、カチオンまたは非カチオンのリポソーム）を含む。  
20

#### 【0095】

本発明の医薬組成物または医薬製剤は、必要に応じた及び当業者に周知の又は公開された文献に記載された、1つ以上の浸透促進剤、担体、賦形剤、または他の活性または不活性の成分を含み得る。実施形態では、リポソームはまた、立体的に安定したリポソーム、例えば、1つ以上の特定化された脂質を含むリポソームを含む。これらの特定化された脂質は、結果として、循環寿命が増強されたリポソームをもたらす。実施形態では、立体的に安定したリポソームは、1つ以上の糖脂質を含むか、またはポリエチレングリコール（PEG）部分などの1つ以上の親水性ポリマーで誘導体化される。実施形態では、界面活性剤は、医薬製剤または医薬組成物に含まれる。医薬品、製剤およびエマルジョンにおける界面活性剤の使用は、当該技術分野で周知である。実施形態では、本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの効率的な送達を達成する、例えば、細胞膜にわたる拡散を助ける及び/又は脂溶性薬物の浸透性を増強するために、浸透促進剤を利用する。実施形態では、浸透促進剤は、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート剤、または非キレート性の非界面活性剤である。  
30

#### 【0096】

実施形態では、医薬製剤は、複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、別の薬物または治療薬と組み合わせて投与される。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、当該技術分野で既知の方法によって、血液脳関門にわたって主題のアンチセンスオリゴヌクレオチドの浸透を促進することができる1つ以上の薬剤とともに投与される。例えば、筋組織における運動性ニューロンへのアデノウイルスベクターの投与による薬剤の送達は、米国特許第6,632,427号「Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons」に記載され、これは引用によって本明細書に組み込まれる。脳、例えば、線条体、視床、海馬、または黒質へ  
40

の直接のベクターの送達は、例えば、米国特許第6,756,523号「*Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain*」に記載され、これは引用によって本明細書に組み込まれる。

【0097】

実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、望ましい薬剤的特性または薬力学的特性を提供する薬剤と連結または結合される。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、血液脳関門にわたる浸透または輸送を促進すると当該技術分野で知られている物質、例えば、トランスフェリン受容体に対する抗体にカップリングされる。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、アンチセンス化合物をより効果的にする又は血液脳関門にわたる輸送を増加させるために、ウイルスベクターと結合される。実施形態では、浸透性の血液脳関門の破壊は、糖、例えば、メソ-エリトリトール、キシリトール、D (+)ガラクトース、D (+)ラクトース、D (+)キシロース、ズルシトール、ミオイノシトール、L (-)フルクトース、D (-)マンニトール、D (+)グルコース、D (+)アラビノース、D (-)アラビノース、セロビオース、D (+)マルトース、D (+)ラフィノース、L (+)ラムノース、D (+)メリビオース、D (-)リボース、アドニトール、D (+)アラビトール、L (-)アラビトール、D (+)フコース、L (-)フコース、D (-)リキソース、L (+)リキソース、およびL (-)リキソース、あるいはアミノ酸、例えば、グルタミン、リジン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、チロシン、バリン、およびタウリンの注入によって助けられる。血液脳関門の浸透を増強するための方法および物質は、例えば、米国特許第4,866,042号「*Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier*」、米国特許第6,294,520号「*Material for passage through the blood-brain barrier*」、および米国特許第6,936,589号「*Parenteral delivery systems*」に記載され、これは引用によって本明細書に組み込まれる。

【0098】

実施形態では、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、1つ以上の部分または抱合体、例えば、オリゴヌクレオチドの活性または細胞取り込みを増強する標的とする部分または他の抱合体に化学的に結合される。そのような部分は、限定されないが、脂質部分、例えば、コレステロール部分、コレステリル部分、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールまたはウンデシル残基、ポリアミン、またはポリエチレングリコール鎖、あるいはアダマンタン酢酸を含む。親油性部分を含むオリゴヌクレオチドおよび調製方法は、公開された文献に記載されている。実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定されないが、脱塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、例えば、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、N-Ac-グルコサミン(GlucNAc)、またはマンノース(例えば、マンノース-6-リン酸、脂質、あるいはポリ炭化水素化合物を含む、部分と結合する。当該芸術分野で理解される及び文献に記載されるように、例えば、リンカーを使用して、抱合体は、糖、塩基またはリン酸基上の幾つかの位置のいずれかでアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、ヌクレオチドの1つ以上に結合され得る。リンカーは、二価または三価の分枝リンカーを含むことができる。実施形態では、抱合体は、アンチセンスオリゴヌクレオチドの3'末端に結合される。オリゴヌクレオチドを調製する方法は、例えば、米国特許第8,450,467号「*Carbohydrate conjugates as delivery agents for oligonucleotides*」に記載され、これは引用によって本明細書に組み込まれる。

【0099】

10

20

30

40

50

## &lt;疾患および障害&gt;

少なくとも1つのイントロン（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のイントロン）を含むプレmRNAによってコードされたタンパク質または機能RNA生成または活性の減少に関する疾患、例えば、疾患または障害は、本明細書で提供される方法および組成物によって処置され得る。処置される疾患または障害は、遺伝子の1つの対立遺伝子が機能的（野生型）タンパク質をコードする及び遺伝子の1つの対立遺伝子が変異させられ非機能性タンパク質または減少した／部分的な機能を有するタンパク質をコードする、ハプロ不全の結果であり得る。他の疾患または障害は、遺伝子の1つの対立遺伝子が失われる及び遺伝子の他の対立遺伝子によって生成されたタンパク質の量が十分でない、ヘミ接合体欠失が原因であり得る。さらに他の疾患または障害は、タンパク質をコードする遺伝子が、変異させられて、結果的に部分的な機能を有するタンパク質の生成をもたらす低形質変異（hypomorphic mutations）が原因であり得る。

## 【0100】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、機能タンパク質の生成を増加させるために使用される。本明細書で使用されるように、用語「機能的な（functional）」は、疾患の1つ以上の疾病を除去するのに必要とされるタンパク質の活性または機能の量に言及している。幾つかの実施形態では、該方法は、部分的に機能的なタンパク質またはRNAの生成を増加させるために使用される。本明細書で使用されるように、用語「部分的に機能的な（partially functional）」は、疾患の1つ以上の疾病を除去する又は防ぐのに必要とされる活性または機能の量未満である、タンパク質かRNAの活性または機能の量に言及している。幾つかの実施形態では、部分的に機能的なタンパク質またはRNAは、完全に機能的なタンパク質またはRNAに対して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、85%、少なくとも90%、または少なくとも95%少ない活性を有する。

## 【0101】

実施形態では、該方法は、標的タンパク質または機能RNAをコードするRICプレmRNAを有する被験体の細胞によって標的タンパク質または機能RNAの発現を増加させる方法であり、ここで、被験体は、標的タンパク質または機能RNAの活性の量の不足によって引き起こされた疾患有し、標的タンパク質または機能RNAの活性の量の不足は、標的タンパク質または機能RNAのハプロ不全によって引き起こされる。そのような実施形態では、被験体は、機能的な標的タンパク質または機能的な機能RNAをコードする第1の対立遺伝子、および標的タンパク質または機能RNAが生成されない第2の対立遺伝子を有する。別のそのような実施形態では、被験体は、機能的な標的タンパク質または機能的な機能RNAをコードする第1の対立遺伝子、および非機能性の標的タンパク質または非機能性の機能RNAをコードする第2の対立遺伝子を有する。これらの実施形態のいずれにおいても、アンチセンスオリゴマーは、（機能的な標的タンパク質をコードする）第1の対立遺伝子から転写されたRICプレmRNAの標的とされた部分に結合し、それによって、RICプレmRNAからの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘発し、被験体の細胞において、標的タンパク質または機能RNAをコードするmRNAのレベルの増加、および標的タンパク質または機能RNAの発現の増加を引き起こす。

## 【0102】

関連する実施形態では、該方法は、標的タンパク質または機能RNAをコードするRICプレmRNAを有する被験体の細胞によって標的タンパク質または機能RNAの発現を増加させる方法であり、ここで、被験体は、標的タンパク質または機能RNAの量または機能の不足から結果として生じる常染色体劣性遺伝疾患有する。これらの実施形態では、被験体は、

a. 第1の変異対立遺伝子であって、そこから、

10

20

30

40

50

i ) 標的タンパク質または機能 R N A が、野生型対立遺伝子からの生成と比較して、低下したレベルで生成される、

ii ) 標的タンパク質または機能 R N A が、等価な野生型タンパク質と比較して、低下した機能を有する形態で生成される、または

iii ) 標的タンパク質または機能 R N A が生成されない、第 1 の変異対立遺伝子および

b . 第 2 の変異対立遺伝子であって、そこから、

i ) 標的タンパク質または機能 R N A が、野生型対立遺伝子からの生成と比較して、低下したレベルで生成される、

ii ) 標的タンパク質または機能 R N A が、等価な野生型タンパク質と比較して、低下した機能を有する形態で生成される、または

iii ) 標的タンパク質または機能 R N A が生成されない、第 2 の変異対立遺伝子を含み、

ここで、R I C プレ m R N A は、第 1 の対立遺伝子及び / 又は第 2 の対立遺伝子から転写される。これらの実施形態では、アンチセンスオリゴマーは、第 1 の対立遺伝子または第 2 の対立遺伝子から転写された R I C プレ m R N A の標的とされた部分に結合し、それによって、R I C プレ m R N A からの保持されたイントロンの構成的スプライシングを誘発し、被験体の細胞内において、標的タンパク質または機能 R N A をコードする m R N A のレベルの増加、および標的タンパク質または機能 R N A の発現の増加を引き起こす。これらの実施形態では、R I C プレ m R N A からの保持されたイントロンの構成的スプライシングから結果として生じる発現レベルの増加を有している標的タンパク質または機能 R N A は、等価な野生型タンパク質と比較して低下した機能を有している（部分的に機能的）、または等価な野生型タンパク質と比較して完全な機能を有している（完全に機能的）形態のいずれかである。

#### 【 0103 】

実施形態では、標的タンパク質をコードする m R N A 、標的タンパク質または機能 R N A のレベルは、対照細胞、例えば、アンチセンスオリゴマーで処理されていない対照細胞または R I C プレ m R N A の標的とされた部分に結合しないアンチセンスオリゴマーで処理されている対照細胞において生成された標的タンパク質をコードする m R N A 、標的タンパク質または機能 R N A の量と比較したときに、本明細書で別記されるように、 1 . 1 倍から 10 倍増加した。

#### 【 0104 】

実施形態では、標的タンパク質の量または活性の不足または機能 R N A の量または活性の不足によって引き起こされた疾病は、 A S O が標的とされる保持されたイントロンの選択的スプライシングまたは異常スプライシングによって引き起こされた疾病ではない。実施形態では、標的タンパク質の量または活性の不足または機能 R N A の量または活性の不足によって引き起こされた疾病は、標的タンパク質または機能 R N A をコードする R I C プレ m R N A の中の任意の保持されたイントロンの選択的スプライシングまたは異常スプライシングによって引き起こされる疾病ではない。

#### 【 0105 】

表 1 は、疾患および本明細書で提供される方法および組成物を使用して処置可能であり得る各疾患に関係する標的遺伝子の例を提供する。

#### 【 0106 】

## 【表1】

表1

疾患	標的遺伝子	潜在的なイントロン標的の数	
X I 型網膜色素変性症	PRPF31	2	
網膜芽細胞腫	RB1	1	10
β サラセミア (BTI)	HBB	1	
β サラセミア	HBG1/2	2	
鐸型赤血球症	HBG1/2	2	
囊胞性線維症	CFTR	26	
血栓性血小板減少性紫斑病	ADAMTS13	2	20
結節硬化症	TSC1	3	
X 型網膜色素変性症	IMPDH1	1	
腎多囊胞病	PKD1	4	
家族性自律神経不全	IKBKAP	2	30

## 【0107】

幾つかの実施形態では、疾患の原因となるタンパク質をコードする

```
mRNA
```

転写物は、本明細書に記載されるASOによって標的とされる。幾つかの実施形態では、疾患の原因とならないタンパク質をコードする

```
mRNA
```

転写物は、ASOによって標的とされる。例えば、特定の経路において第1のタンパク質の変異または不足の結果である疾患は、第2のタンパク質をコードする

```
mRNA
```

を標的とすることによって改善され得、それによって、第2のタンパク質の生成が増加される。幾つかの実施形態では、第2のタンパク質の機能は、第1のタンパク質の変異または不足を補うことができる。

## 【0108】

本明細書で提供される組成物のいずれかが、個体に投与され得る。「個体」は、「被験体」または「患者」と交換可能に使用されてもよい。個体は、哺乳動物、例えば、ヒト、またはヒト以外の霊長類、げっ歯類、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ロバ、ヤギ、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、またはヒツジなどの動物であってもよい。幾つかの実施形態では、個体はヒトである。他の実施形態では、個体は、植物などの別の真核生物であってもよい。幾つかの実施形態では、本明細書で提供される組成物は、エクスピボで細胞に投与される。

## 【0109】

幾つかの実施形態では、本明細書で提供される組成物は、疾患または障害を処置する方法として個体に投与される。幾つかの実施形態では、個体は、本明細書に記載される疾患のいずれかなどの遺伝子疾患を有している。幾つかの実施形態では、個体は、本明細書に

記載される疾患のいずれかなどの疾患有するリスクがある。幾つかの実施形態では、個体は、タンパク質の量の不足またはタンパク質の活性の不足によって引き起こされた疾患または障害を有するリスクが増加している。個体が、タンパク質の量の不足またはタンパク質の活性の不足によって引き起こされた疾患または障害を有するリスクが増加している場合、該方法は予防処置 (preventative or prophylactic treatment) を含む。例えば、個体は、疾患の家族歴によるそのような疾患または障害を有するリスクが増加し得る。典型的に、そのような疾患または障害を有するリスクが増加している個体は、(例えば、疾患または障害の発症または進行を防ぐ又は遅らせることによる) 予防処置から恩恵を得る。

【0110】

10

表2は、HBB遺伝子から転写されたRICプレmRNAの領域を標的とすることによって、HBB遺伝子によってコードされたタンパク質の生成を増加させるための、ASOの配列の限定しないリストを提供する。

【0111】

## 【表2】

表2. HBB遺伝子を標的とするASOのリスト

ASO	配列	SEQ ID NO
非標的	CCAGTGGTATTGCTTACC	103
HBBIVS1+6	ctgtcttgtaacacctgat	104
HBBIVS1+7	cctgtcttgtaacacctga	105
HBBIVS1+8	acctgtcttgtaacacctg	106
HBBIVS1+9	aacctgtcttgtaacacct	107
HBBIVS1+10	aaacctgtcttgtaacacct	108
HBBIVS1+11	taaacacctgtcttgtaaccc	109
HBBIVS1+12	ttaaacacctgtcttgtaac	110
HBBIVS1+13	cttaaacacctgtcttgtaa	111
HBBIVS1+14	ccttaaacacctgtcttgtaa	112
HBBIVS1+15	tccttaaacacctgtcttgt	113
HBBIVS1+16	ctccttaaacacctgtctt	114
HBBIVS1+17	tctccttaaacacctgtctt	115
HBBIVS1+18	gtctccttaaacacctgtct	116
HBBIVS1+19	ggtctccttaaacacctgtc	117
HBBIVS1+20	tggtctccttaaacacctgt	118
HBBIVS1+21	ttggtctccttaaacacctg	119
HBBIVS1+22	attggtctccttaaacacct	120
HBBIVS1+23	tattggtctccttaaacacc	121
HBBIVS1+24	ctattggtctccttaaacac	122
HBBIVS1+25	tctattggtctccttaaaa	123
HBBIVS1+26	ttctattggtctccttaaa	124
HBBIVS1+27	tttctattggtctcctta	125
HBBIVS1+28	gtttctattggtctcctt	126

表3は、PRPF31遺伝子から転写されたRICプレmRNAの領域を標的とすることによって、PRPF31遺伝子によってコードされたタンパク質の生成を増加させるための、ASOの配列の限定しないリストを提供する。

【0113】

## 【表3】

表3. PRPF31遺伝子を標的とするASOのリスト

ASO	配列	SEQ ID NO
P31-IVS10+6	accggaccccccagggccc	127
P31-IVS10+11	tgcctaccggaccccccag	
P31-IVS10+16	ccccatgcctaccggacc	
P31-IVS10+21	atgacccccattgcctacc	
P31-IVS10+26	cctccatgaccccatgc	
P31-IVS10+31	tctccctccatgacccc	
P31-IVS10-41	gaggaggacgcccggcttc	
P31-IVS10-36	gctgggaggaggacgccc	
P31-IVS10-31	agtcggctgggaggagga	
P31-IVS10-26	cagggagtcggctgggag	
P31-IVS10-21	ggcgccagggagtcggct	133
P31-IVS10-16	tgggcggcgccagggagt	
P31-IVS12+6	ccccacctgggtctggcc	
P31-IVS12+11	cccagccccacctgggtc	
P31-IVS12+16	cggtccccagccccacct	
P31-IVS12+21	tccctcggtccccagccc	
P31-IVS12-16	ggaggctgcgatctgggc	
P31-IVS12-21	ctgcgatctggctcccc	
P31-IVS12-26	atctggctccccccacc	
P31-IVS12-31	ggctccccccaccttgtg	140
P31-IVS12+26	ttgtgtccctcggtcccc	
P31-IVS12+31	ccaccttgtgtccctcg	
P31-IVS12+36	tccccccaccttgtgtcc	

## 【0114】

表4は、ADAMTS13遺伝子から転写されたRICプレmRNAの領域を標的と

することによって、A D A M T S 1 3 遺伝子によってコードされたタンパク質の生成を増加させるための、A S O の配列の限定しないリストを提供する。

【 0 1 1 5 】

## 【表4-1】

表4. ADAMTS13遺伝子を標的とするASOのリスト

ASO	配列	SEQ ID NO
ADAM-IVS25+6	caggaaggaggacaggac	150
ADAM-IVS25+11	ccugacaggaaggaggac	
ADAM-IVS25+16	agcugccugacaggaagg	
ADAM-IVS25+21	gcagcagcugccugacag	
ADAM-IVS25+26	cuccugcagcagcugccu	
ADAM-IVS25+31	caccccuccugcagcagc	
ADAM-IVS25+36	uugcccacccuccugca	
ADAM-IVS25+41	ugccuuugcccacccuc	
ADAM-IVS25+46	gaagaugccuuugccac	
ADAM-IVS25-16	gagacagguaagcagugc	159
ADAM-IVS25-21	agguaagcagugcuccccc	
ADAM-IVS25-26	agcagugcucccccgauu	
ADAM-IVS25-31	ugcuuccccgauucccag	
ADAM-IVS25-36	ccccgauucccagcaggg	
ADAM-IVS25-41	auucccagcagggcaggg	
ADAM-IVS25-46	cagcagggcaggcuccgg	
ADAM-IVS25-47	agcagggcaggcuccggg	
ADAM-IVS25-62	gggcuuccaagcugagga	
ADAM-IVS27+6	agguggagaaggccuggc	168
ADAM-IVS27+11	aaggagguggagaaggc	
ADAM-IVS27+16	caccaaggaggaggagg	
ADAM-IVS27+21	uggagcaccaaggaggagg	
ADAM-IVS27+26	aggacuggagcacccaaag	
ADAM-IVS27+31	cugccaggacuggagcac	
ADAM-IVS27+36	ccuucccugccaggacugg	
		170

【表4-2】

ADAM-IVS27+41	cccgccucccugccagg	175
ADAM-IVS27-16	agggacauaggaacccag	176
ADAM-IVS27-21	cauaggaacccagacaga	177
ADAM-IVS27-26	gaacccagacagacccgu	178
ADAM-IVS27-31	cagacagacccgguggugc	179
ADAM-IVS27-36	agaccgguggugccagag	180
ADAM-IVS27-41	gguggugccagaggccag	181
ADAM-IVS27-46	ugccagaggccaggacaa	182
ADAM-IVS27-51	gaggccaggacaacucac	183
ADAM-IVS25+17	cagcugccugacagggaaag	184
ADAM-IVS25+18	gcagcugccugacaggaa	185
ADAM-IVS25+19	agcagcugccugacagga	186
ADAM-IVS25+20	cagcagcugccugacagg	187
ADAM-IVS25+21a	gcagcagcugccugacag	188
ADAM-IVS25+22	ugcagcagcugccugaca	189
ADAM-IVS25+23	cugcagcagcugccugac	190
ADAM-IVS25+24	ccugcagcagcugccuga	191
ADAM-IVS25+25	uccugcagcagcugccug	192
ADAM-IVS25+26a	cuccugcagcagcugccu	193
ADAM-IVS25+27	ccuccugcagcagcugcc	194
ADAM-IVS25+28	ccuccugcagcagcugc	195
ADAM-IVS25+29	ccccuccugcagcagcug	196
ADAM-IVS25+30	accccuccugcagcagcu	197

【0117】

表5は、T S C 1 遺伝子から転写されたR I C プレm R N Aの領域を標的とすることによって、T S C 1 遺伝子によってコードされたタンパク質の生成を増加させるための、A S Oの配列の限定しないリストを提供する。

【0118】

## 【表5-1】

表5. TSC1遺伝子を標的とするASOのリスト

ASO	配列	SEQ ID NO
TSC1-IVS5+6	ucaaaauccuuacaaacau	198
TSC1-IVS5+11	uucauucaaaauccuuaca	
TSC1-IVS5+16	accuuucauucaaaucc	
TSC1-IVS5+21	auaaaaccauuucauuca	
TSC1-IVS5+26	uacucauaaaaccauuuc	
TSC1-IVS5+31	aacuauacucauaaaacc	
TSC1-IVS5+36	ucagaaaacuauacuaua	
TSC1-IVS5+41	aaauuucagaaacuauac	
TSC1-IVS5-16	ucaaacaggaaacgucug	
TSC1-IVS5-21	caggaaacgucugucagg	
TSC1-IVS5-26	aacgucugucaggcacug	207
TSC1-IVS5-31	cugucaggcacuggcacc	
TSC1-IVS5-36	aggcacuggcaccaggau	
TSC1-IVS5-41	cuggcaccaggauccggca	
TSC1-IVS5-46	accaggauccggcauugua	
TSC1-IVS5-51	gaucggcauuguaacagua	
TSC1-IVS10+6	aggcacacuaguugacac	
TSC1-IVS10+11	agagcaggcacacuaguu	
TSC1-IVS10+16	aggagagagcaggcacac	
TSC1-IVS10+21	agcagaggagagagcagg	
TSC1-IVS10+26	cagaaagcagaggagaga	218
TSC1-IVS10+31	uucaccagaaagcagagg	
TSC1-IVS10+36	ucagcuucaccagaaagc	
TSC1-IVS10+41	aaggguagcuucaccag	
TSC1-IVS10-16	aguacaucagcaguggca	

【表5-2】

TSC1-IVS10-21	aucagcaguggcaaagga	223	
TSC1-IVS10-26	caguggcaaaggaaugcu	224	
TSC1-IVS10-31	gcaaaggaaugcuaaguc	225	
TSC1-IVS10-36	ggaaugcuaagucaucca	226	
TSC1-IVS10-41	gcuaagucauccacgagg	227	10
TSC1-IVS10-46	gucauccacgagguuuau	228	
TSC1-IVS10-51	ccacgagguuuauaucca	229	
TSC1-IVS11+6	aauccaaccuaagacaua	230	
TSC1-IVS11+11	aaucaaauccaaccuaag	231	
TSC1-IVS11+16	caacuaaucaaaucuaac	232	
TSC1-IVS11+21	aaaaccaacuaaucaaaau	233	20
TSC1-IVS11+26	aggccaaaaccaacuaau	234	
TSC1-IVS11+31	aaggcaggccaaaaccaa	235	
TSC1-IVS11+36	cauuuaaggcaggccaaa	236	
TSC1-IVS11+41	ccugccauuaaggcagg	237	
TSC1-IVS11-16	agaacauauaugaacacu	238	30
TSC1-IVS11-21	auauaugaacacugagcc	239	
TSC1-IVS11-26	ugaacacugagcccaacu	240	
TSC1-IVS11-31	acugagcccaacuaauag	241	
TSC1-IVS11-36	gcccaacuaauagaaaaaa	242	
TSC1-IVS11-41	acuaauagaaaaacugcc	243	
TSC1-IVS11-46	uagaaaaacugccgauuu	244	40
TSC1-IVS11-51	aaacugccgauuuuuuuuu	245	

【0120】

表6は、IMPDH1遺伝子から転写されたRICプレmRNAの領域を標的とすることによって、IMPDH1遺伝子によってコードされたタンパク質の生成を増加させるための、ASOの配列の限定しないリストを提供する。

【0121】

## 【表6-1】

表6. IMPDH1遺伝子を標的とするASOのリスト

ASO	配列	SEQ ID NO
IMP-IVS14+6	gggcccagggucag	246
IMP-IVS14+18	cugaucugcccagguggg	247
IMP-IVS14+23	gugggcugaucugcccag	248
IMP-IVS14+28	ggguugugggcugaucug	249
IMP-IVS14+33	cugaaggguuguggcug	250
IMP-IVS14+38	gggcccugaaggguugug	251
IMP-IVS14+43	ugagcgggcccugaagg	252
IMP-IVS14+48	uggcaugagcgggcccug	253
IMP-IVS14-16	aagacugagcccagcagc	254
IMP-IVS14-21	ugagcccagcagcuugaa	255
IMP-IVS14-26	ccagcagcuugaagcuca	256
IMP-IVS14-31	agcuugaagcucagagga	257
IMP-IVS14-36	gaagcucagaggacccca	258
IMP-IVS14-41	ucagaggaccccacccca	259
IMP-IVS14-46	ggaccccaccccaccucu	260
IMP-IVS14-51	ccaccccaccucuuagg	261
IMP-IVS14+44	augagcgggcccugaagg	262
IMP-IVS14+45	caugagcgggcccugaag	263
IMP-IVS14+46	gcaugagcgggcccugaa	264
IMP-IVS14+47	ggcaugagcgggcccuga	265
IMP-IVS14+48a	uggcaugagcgggcccug	266
IMP-IVS14+49	guggcaugagcgggccc	267
IMP-IVS14+50	gguggcaugagcgggccc	268
IMP-IVS14+51	cgguggcaugagcgggccc	269
IMP-IVS14+52	ucgguggcaugagcgggc	270

## 【表 6 - 2】

IMP-IVS14+53	gucgguggcaugagcggg	271
--------------	--------------------	-----

## 【0 1 2 3】

表 7 は、PKD1 遺伝子から転写された RIC プレ m RNA の領域を標的とすることによって、PKD1 遺伝子によってコードされたタンパク質の生成を増加させるための、ASO の配列の限定しないリストを提供する。

## 【0 1 2 4】

## 【表7-1】

表7. PKD1遺伝子を標的とするASOのリスト

ASO	配列	SEQ ID NO
PKD1-IVS32+6	cgagguuucucuaggaa	272
PKD1-IVS32+11	gggcucgagguuucucua	
PKD1-IVS32+16	caccagggcucgagguuu	
PKD1-IVS32+21	accugcaccagggcucga	
PKD1-IVS32+26	cagugaccugcaccagg	
PKD1-IVS32+31	agacacagugaccugcac	
PKD1-IVS32+36	accccagacacagugacc	
PKD1-IVS32+41	ccggcaccccaagacacag	
PKD1-IVS32-16	gucagcaagguaaccagg	
PKD1-IVS32-32	gggaugugucacacacac	280
PKD1-IVS32-37	gugucacacacacagccc	
PKD1-IVS32-42	acacacacagcccacccc	
PKD1-IVS32-47	cacagcccaccccccgucc	
PKD1-IVS32-52	cccaccccccguccaguca	
PKD1-IVS32-57	ccccguccagucacgcac	
PKD1-IVS32-62	uccagucacgcacggaca	
PKD1-IVS33+6	ccccuccucucacccag	
PKD1-IVS33+11	agagccccuccucucac	
PKD1-IVS33+16	gcuucagagccccuccu	289
PKD1-IVS33+21	ggugagcuucagagcccc	
PKD1-IVS33+26	gcaaggugagcuucaga	
PKD1-IVS33-31	cagcugcaaggugagcu	
PKD1-IVS33-26	gggcccagcugcaagggu	
PKD1-IVS33-21	aggguggggcccagcugca	
PKD1-IVS33-16	gcauaggugggcccagc	

【表 7 - 2】

PKD1-IVS37+6	gcacaggccgcacccagg	297
PKD1-IVS37+8	gggcacaggccgcaccca	298
PKD1-IVS37+24	gagacggagguggcaggg	299
PKD1-IVS37+29	gacaagagacggaggugg	300
PKD1-IVS37+34	ugggagacaagagacgga	301
PKD1-IVS37+39	ggaggugggagacaagag	302
PKD1-IVS37+44	gggugggaggugggagac	303
PKD1-IVS37+49	ugcauggguggggaggugg	304
PKD1-IVS37-16	gcccuuguggucagccugg	305
PKD1-IVS37-21	guggucagccuggccca	306
PKD1-IVS37-26	cagccuggcccccagccca	307
PKD1-IVS37-31	uggccccagcccacagug	308
PKD1-IVS37-36	ccagcccacagugacagc	309
PKD1-IVS37-41	ccacagugacagcaggc	310
PKD1-IVS37-46	gugacagcagggcuuugg	311
PKD1-IVS37-51	agcagggcuuuggcaacg	312
PKD1-IVS38+6	accagugcaccggaugcc	313
PKD1-IVS38+11	gacagaccagugcaccgg	314
PKD1-IVS38+16	cagaagacagaccagugc	315
PKD1-IVS38+21	aagcccagaagacagacc	316
PKD1-IVS38+26	aacuaaagcccagaagac	317
PKD1-IVS38+31	ggcaaaacuaaagccag	318
PKD1-IVS38+36	cuuaaggcaaaacuaaag	319
PKD1-IVS38+41	cuggacuaaaggcaaaac	320
PKD1-IVS38-16	ucacacgcuccagcccu	321
PKD1-IVS38-21	cgcuccagccccuacugc	322
PKD1-IVS38-26	cagccccuacugccccau	323

【表 7 - 3】

PKD1-IVS38-31	ccuacugccccaugcccg	324
PKD1-IVS38-36	ugccccaugcccgccucg	325
PKD1-IVS38-41	caugccccgcccucgaguga	326
PKD1-IVS38-46	ccggccucgagugagcggc	327
PKD1-IVS38-51	ucgagugagcggccacca	328

10

【0127】

表 8 は、I K B K A P 遺伝子から転写された R I C プレ m R N A の領域を標的とすることによって、I K B K A P 遺伝子によってコードされたタンパク質の生成を増加させるための、A S O の配列の限定しないリストを提供する。

【0128】

## 【表8-1】

表8. IKBKAP遺伝子を標的とするASOのリスト

ASO	配列	SEQ ID NO
IKB-IVS7+6	uuaacugcaauauauuuuc	329
IKB-IVS7+11	guuguuuaacugcaauau	
IKB-IVS7+16	uuauuguuguuuaacugc	
IKB-IVS7+21	auuuuuuaauuguuguuua	
IKB-IVS7+26	uaaaaaauuuuuuaauuguu	
IKB-IVS7+31	uaagauaaaaauuuuuua	
IKB-IVS7+36	uuuaauuaagauaaaaauu	
IKB-IVS7+41	uuauuuuuuaauaagauaa	
IKB-IVS7-16	gucaaacacacauacaca	
IKB-IVS7-21	acacacauacacacuuua	
IKB-IVS7-26	cauacacacuuuaacau	337
IKB-IVS7-31	acacuuaaaacauuauga	
IKB-IVS7-36	uaaaaacauuaugauaaaa	
IKB-IVS7-41	cauuauugauaaaaguugu	
IKB-IVS7-46	ugauaaaaguugucaauu	
IKB-IVS7-51	aaaguugucaauucagaa	
IKB-IVS8+6	cuaagguuucuucuccca	
IKB-IVS8+11	uuucucuaagguuucuuc	
IKB-IVS8+16	aagaauuucucuaagguu	
IKB-IVS8+21	guuccaagaauuucucua	340
IKB-IVS8+26	cucugguuccaagaauuu	
IKB-IVS8+31	cucuacucugguuccaag	
IKB-IVS8+36	accaccucuacucugguu	
IKB-IVS8+41	guaccaccaccucuacuc	
IKB-IVS8-16	gaguguuacaauaucgaa	

【表8-2】

IKB-IVS8-21	uuacaauaucgaaagcuc	354
IKB-IVS8-26	auaucgaaagcucaccua	355
IKB-IVS8-31	gaaagcucaccuaacuaa	356
IKB-IVS8-36	cucaccuaacuaaagaau	357
IKB-IVS8-41	cuaacuaaagaauagaua	358
IKB-IVS8-46	uaaagaauagauaaaauc	359
IKB-IVS8-51	aauagauaaaauccagaa	360
IKB-IVS7+22M	aaaaaaaaauuguuguuu	361
IKB-IVS7+23M	aaaaaaaaauuguuguuu	362
IKB-IVS7+24M	aaaaaaaaauuguuguu	363
IKB-IVS7+25M	aaaaaaaaauuguug	364
IKB-IVS7+26M	aaaaaaaaauuguuuu	365
IKB-IVS7+27M	auaaaaaaaaauuguu	366
IKB-IVS7+28M	gauaaaaaaaaauug	367
IKB-IVS7+29M	agauaaaaaaaaauuuuuu	368
IKB-IVS7+30M	aagauaaaaaaaaauuuuuu	369
IKB-IVS8-16M	gaguguuacaauaucgaa	370
IKB-IVS8-17M	aguguuacaauaucgaaa	371
IKB-IVS8-18M	guguuacaauaucgaaag	372
IKB-IVS8-19M	uguuuacaauaucgaaagc	373
IKB-IVS8-20M	guuacaauaucgaaagcu	374

10

20

30

40

## 【0130】

&lt;保持されたイントロンを同定する方法&gt;

本開示の範囲内にはまた、隣接した（上流または下流の）イントロンが細胞におけるプレmRNAから切り出されているなかで、プレmRNA転写物における保持されたイントロンを同定する（判定する）方法がある。一例では、標的遺伝子からのエクソンのスプライシングおよび接合および各イントロンの除去の程度は、以下の方法によって測定することができる。イントロンが、プレmRNA転写物から切り出されている隣接したイントロンに対するプレmRNA転写物において保持されるかどうか、および標的イントロンが、同じ遺伝子によってコードされたプレmRNA内の1つ以上の他のイントロンに対してより大きな程度まで保持されるかどうかを判定するために、あらゆる方法が使用され得るこ

50

とは、当業者によって理解される。

【0131】

I . 保持されたイントロンのためのスクリーニング

イントロン保持のために第1ラウンドのスクリーニングは、細胞または組織（例えば、疾患関連の細胞）から分離された核RNAを使用して実行され、例えば、標的遺伝子によってコードされたプレRNAを調査する逆転写酵素-PCR (RT-PCR) によって分析され得る。標的遺伝子は、少なくとも1つのイントロンを含有し、疾患または障害を関係する、または疾患または障害に関する又はその原因となる疑いのあるタンパク質または機能RNAをコードする遺伝子であり得る。RT-PCR分析に関して、各イントロンは、対のプライマーの1つが標的プレmRNAのイントロンの領域に特異的である、および対のもう1つのプライマーが、イントロンの2つのエクソン分上流または下流であるエクソンの領域に特異的である、一連のプライマー対を設計することによって、遺伝子によってコードされたプレmRNAにおける保持のために評価される（図3）。幾つかの実施形態では、上流またはフォワードプライマーは、相補的であり得、イントロン、例えば、図3におけるエクソン1と2の間のイントロン内の領域にハイブリダイズし得、および下流またはリバースプライマーは、相補的であり得、評価されているイントロンから2つのエクソン分離れた位置にあるエクソン内、例えば、図3に示されるようなエクソン3内の領域にハイブリダイズし得る。代替的に、上流またはフォワードプライマーは、相補的であり得、エクソン、例えば、図3におけるエクソン2内の領域にハイブリダイズし得、および下流またはリバースプライマーは、相補的であり得、フォワードプライマーから2つのエクソン分離れているイントロン内、例えば、図3に示されるようなエクソン3と4の間のイントロン内の領域にハイブリダイズし得る。プライマー対の設計は、遺伝子によってコードされたイントロンの各々に対して繰り返され得る。

10

【0132】

プライマー対の各々を使用するRT-PCR後に、RT-PCR産物が、当該技術分野で既知の方法、例えば、アガロースゲル中の分離および視覚化によって分析される。標的イントロンが存在する場合に予期されるRT-PCR産物のおよそのサイズが、遺伝子及び/又はプレmRNAの核酸配列に基づいて推定され得る。RT-PCR分析からの産物の欠如は、標的イントロンが、存在しなかった、およびプレmRNAから除去/切り出された、並びにそれ故、試験される条件下では、保持されたイントロンではないことを示している。推定されたおよそのサイズであるRT-PCR反応からの産物の存在は、標的イントロンが、プレmRNA中に存在し、試験される条件下でプレmRNAから除去/切り出されなかったことを示しており、そのようなイントロンは「保持されたイントロン」と呼ばれる。

30

【0133】

多くのプレRNAに対して又はトランスクリプトーム全体のレベルで分析が望まれる例において、イントロン保持のためのスクリーニングは、RNA-seqまたは他の高スループットの転写分析法によって分析することができる。RNA-seq分析は、全トランスクリプトームにわたってイントロン保持事象を判定するために、ディープシークエンシングの読み取りおよび統計方法の適切なマッピングを使用して行われる。

40

【0134】

I I . イントロン保持事象の確認

プレmRNA内のイントロンの第2ラウンドのスクリーニングは、RT-PCRなどの方法を使用してイントロン保持事象を確認するために実行され得る。上に記載された第1ラウンドのスクリーニング上で保持されたイントロンであると同定されたイントロンの各々は、再び評価することができる。RT-PCR分析に関して、保持された各イントロンは、対のプライマーの1つが標的プレmRNAのイントロンの領域に特異的であり、対のもう1つのプライマーがイントロンの3、4または5つのエクソン分上流または下流にあるエクソンの領域に特異的であるプライマー対を設計することによって、遺伝子によってコードされたプレmRNAにおける保持のために評価される（図4）。図4に示された略

50

図において、評価される保持されたイントロンは、エクソン1と2の間に位置する。上流またはフォワードプライマーは、領域に特異的であり、保持されたイントロン内でハイブリダイズし、下流またはリバースプライマーは、保持されたイントロンから3、4、および5つのエクソン分離しているエクソンである、それぞれ、エクソン4、エクソン5、およびエクソン6における領域にハイブリダイズするように設計されている。R T - P C R反応は、フォワードプライマーおよびリバースプライマーの各々を使用して実行される。

#### 【0135】

R T - P C R後に、R T - P C R産物が、当該技術分野で既知の方法、例えば、アガロースゲル中の分離および視覚化によって分析される。各反応からのR T - P C R産物の分子サイズに基づいて、イントロンの各々（例えば、エクソン2と3、3と4、4と5との間のイントロン）が、試験されているイントロン（上で同定された保持されたイントロン）に加えて保持されるかどうかを判定することができる。1つ以上の隣接したイントロンが除去／切り出されたときに保持されると分かった保持されたイントロンは、「非効率的に切り出されたイントロン」と呼ばれ得る。

#### 【0136】

##### I I I . イントロンのスプライシング効率の判定

除去される／切り出される同じプレm R N Aにおける他のイントロンに対する持続性の（*persis tent*）イントロンまたは非効率的に切り出されたイントロンとして同定される標的遺伝子によってコードされたプレm R N Aにおけるイントロンは、イントロン保持の割合または効率を判定するためにさらに評価され得る。

#### 【0137】

イントロンは、R N a s e保護アッセイなどのアッセイを実行することによって、イントロン保持の効率を判定するために評価され得る（図5）。1対のR N Aプローブ（例えば、放射標識されたR N Aプローブ）は、プローブの各々が、保持されたイントロンおよび隣接したエクソンの末端に及ぶ領域に特異的であるように設計されている。例えば、R N Aプローブは、保持されたイントロンの5'末端および保持されたイントロンの上流にあるエクソンの3'末端に及ぶ領域にハイブリダイズするように設計され；および第2のR N Aプローブは、保持されたイントロンの3'末端および保持されたイントロンの下流にあるエクソンの5'末端に及ぶ領域にハイブリダイズするように設計されている。幾つかの実施形態では、イントロンにハイブリダイズするプローブの部分は、少なくとも100のヌクレオチドの長さであり、エクソンにハイブリダイズするプローブの部分は、少なくとも50のヌクレオチドの長さである（図5）。疾患関連の細胞、組織または細胞株から抽出された核R N Aは、プローブが二本鎖R N Aの領域を形成するプレm R N Aの領域にハイブリダイズする条件下で、対のR N Aプローブでインキュベートされる。プレm R N AとR N Aプローブの混合物は、R N a s e A及び／又はR N a s e T 1などの、一本鎖R N Aを分解するR N a s eで消化した。二本鎖R N Aは分解から保護されている。

#### 【0138】

R N a s eの消化反応は、当該技術分野で既知の方法、例えば、アガロースゲル中の分離および視覚化によって分析される。R N Aプローブの全長（例えば、150のヌクレオチド）に対応するR N A分子の量は、プレm R N A中に存在する保持されたイントロンのその量を示す。消化されたR N Aプローブに対応するR N A分子（例えば、およそ50のヌクレオチドの長さのR N A分子）の量は、R N Aプローブがハイブリダイズするイントロンがプレm R N A中に存在しない（例えば、切り出された）ために、切り出されたR N Aの量を表わした。切り出されたR N A（分解されたR N Aプローブの量、例えば、50のヌクレオチドR N A分子）に対するイントロン保持（全長R N Aプローブの量、例えば、100のヌクレオチドR N A分子）の比率は、イントロンのスプライシングの効率を示している。同じプレm R N Aの他のイントロンに対して最も高い比率を有しているプレm R N Aのイントロンは、イントロンが、標的遺伝子によってコードされたプレm R N Aの最も非効率的に切り出されたイントロンまたは最も高度に保持されたイントロンであることを示している。

10

20

30

40

50

## 【0139】

<スプライシングを増強するASOを同定する方法>

本発明の範囲内にはまた、標的プレmRNA、特に標的インtronのスプライシングを増強するASOを同定する（判定する）方法がある。プレmRNAの標的部位内の異なるヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするASOは、標的インtronのスプライシングの速度及び／又は程度を改善するASOを同定する（判定する）ためにスクリーニングされ得る。幾つかの実施形態では、ASOは、スプライシング抑制因子／サイレンサーの結合部位をブロックまたは妨害し得る。インtronの標的部位にハイブリダイズされたときに望ましい効果（例えば、増強されたスプライシング、タンパク質または機能RNAの生成）をもたらすASOを同定する（判定する）ために、当該技術分野で既知の方法が使用され得る。これらの方法はまた、保持されたインtronに隣接しているエクソンまたは保持されていないインtronにおける標的とされた領域への結合によって、保持されたインtronのスプライシングを増強するASOを同定するために使用され得る。使用され得る方法の一例は以下に提供される。

## 【0140】

ASO「walk」と呼ばれる、1ラウンドのスクリーニングは、プレmRNAの標的部位にハイブリダイズするように設計されたASOを使用して実行され得る。例えば、ASO walkに使用されるASOは、保持されたインtronの5'スプライス部位の上流のおよそ100のヌクレオチド（例えば、標的とされた／保持されたインtronの上流に位置するエクソンの配列の一部）から標的とされた／保持されたインtron 5'スプライス部位に下流のおよそ100のヌクレオチドまで、及び／又は保持されたインtronの3'スプライス部位の上流のおよそ100のヌクレオチドから標的とされた／保持されたインtronの3'スプライス部位の下流の下流に位置するエクソンの配列の一部）まで、5つのヌクレオチドごとに敷き詰められ得る。例えば、15のヌクレオチドの長さの第1のASOは、標的とされた／保持されたインtronの5'スプライス部位に対するヌクレオチド+6から+20まで特異的にハイブリダイズするように設計され得る。第2のASOは、標的とされた／保持されたインtronの5'スプライス部位に対するヌクレオチド+11から+25まで特異的にハイブリダイズするように設計されている。ASOは、プレmRNAの標的部位に及ぶように設計されている。実施形態では、ASOは、より密に、例えば、1、2、3、または4つのヌクレオチドごとに敷き詰められ得る。さらに、ASOは、5'スプライス部位の下流の100のヌクレオチドから3'スプライス部位の上流の100のヌクレオチドまで敷き詰められ得る。

## 【0141】

1つ以上のASO、または1つの対照ASO（標的部位にハイブリダイズするとは予期され得ない配列である、スクランブル配列を有するASO）は、例えばトランスフェクションによって、標的プレmRNA（例えば、本明細書で別記されるRICプレmRNA）を発現する疾患関連の細胞株へと送達される。ASOの各々のスプライシングを誘発する効果は、本明細書で記載されるように、当該技術分野で既知の方法、例えば、スプライスジャンクションに及ぶプライマーを使用する逆転写酵素（RT）-PCRによって評価され得る（「インtron保持事象の同定」を参照）。対照ASO処理された細胞と比較したASO処理された細胞におけるスプライスジャンクションに及ぶプライマーを使用して生成されたRT-PCR産物の減少または欠如は、標的インtronのスプライシングが増強されたことを示している。幾つかの実施形態では、スプライシング効率、比率、切り出され得ないプレmRNAに対する切り出されたプレmRNAの割合、スプライシングの速度、またはスプライシングの程度は、本明細書に記載されるASOを使用して改善され得る。標的プレmRNAによってコードされるタンパク質または機能RNAの量も、各ASOが望ましい効果（例えば、タンパク質生成の増強）を達成したかどうかを判定するために評価され得る。ウェスタンプロットティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡検査法、およびELISAなどの、タンパク質生成を評価及び／又は定量するための当

10

20

30

40

50

該技術分野で既知の方法も使用することができる。

【0142】

ASO「micro-walk」と呼ばれる第2ラウンドのスクリーニングは、プレmRNAの標的部位にハイブリダイズするように設計されたASOを使用して実行され得る。ASO micro-walkに使用されるASOは、ASOでハイブリダイズされたときに結果的にスプライシングを増強させるプレmRNAのヌクレオチド酸配列をさらに改良する(refine)ために、1つのヌクレオチドごとに敷き詰められる。

【0143】

標的イントロンのスプライシングを促進するASOによって定義された領域は、1-nt工程(1-nt steps)で間隔を置かれたASOの他に、典型的に18-25ntである、より長いASOを含む、ASO「micro-walk」によって、より詳細に調査される。

【0144】

上にASO walkに関して記載されたように、ASO micro-walkは、1つ以上のASO、または対照ASO(標的部位にハイブリダイズすると予期されていない配列である、スクランブル配列を有するASO)を、例えば、トランスフェクションによって、標的プレmRNAを発現する疾患関連お細胞株へと送達することにより実行される。ASOの各々のスプライシングを誘発する効果は、本明細書で記載されるように、当該技術分野で既知の方法、例えば、スプライスジャンクションに及ぶプライマーを使用する逆転写酵素(RT)-PCRによって評価され得る(「イントロン保持事象の同定」を参照)。対照ASO処理された細胞と比較したASO処理された細胞におけるスプライスジャンクションに及ぶプライマーを使用して生成されたRT-PCR産物の減少または欠如は、標的イントロンのスプライシングが増強されたことを示している。幾つかの実施形態では、スプライシング効率、比率、切り出されていないプレmRNAに対する切り出されたプレmRNAの割合、スプライシングの速度、またはスプライシングの程度は、本明細書に記載されるASOを使用して改善され得る。標的プレmRNAによってコードされるタンパク質または機能RNAの量も、各ASOが望ましい効果(例えば、タンパク質生成の増強)を達成したかどうかを判定するために評価され得る。ウェスタンプロッティング、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡検査法、およびELISAなどの、タンパク質生成を評価及び/又は定量するための当該技術分野で既知の方法も使用することができる。

【0145】

プレmRNAの領域にハイブリダイズされたときに、結果的にスプライシングを増強させ、タンパク質生成を増加させるASOは、動物モデル、例えば、全長ヒト遺伝子がノックインされたトランスジェニックマウスモデルまたは疾患のヒト化マウスモデルを使用して、インピボで試験され得る。ASOの投与に適した経路は、ASOの送達が望まれる疾患及び/又は細胞型に依存して変化し得る。ASOは、例えば、硝子体内注射、髄腔内注射、腹膜腔内注射、皮下注射、または静脈内注射によって投与され得る。投与後に、モデルの動物の細胞、組織、及び/又は臓器は、当該技術分野に既知の及び本明細書に記載される方法によって、例えば、スプライシング(効率、速度、程度)およびタンパク質生成を評価することにより、ASO処置の効果を判定するために評価され得る。動物モデルはまた、疾患または疾患重症度の表現型または行動の徴候であり得る。

【実施例】

【0146】

本発明は、以下の実施例によってより具体的に例証される。しかしながら、本発明がいかなる方法においてもこれらの実施例によって限定されないことが理解されるべきである。

【0147】

実施例1:イントロン保持事象は、遺伝子に固有であり、非生産的である。

本明細書に記載された方法を使用して、PRPF31(XI型網膜色素変性症)および

10

20

30

40

50

R B 1 (網膜芽細胞腫) 遺伝子におけるイントロン保持事象のために、第 1 ラウンドスクリーニングを実行した(図 3)。簡潔には、RNA 抽出物を、HeLa (ヒトの上皮子宮頸部腺癌) および 293T (ヒトの胚腎上皮) 細胞の核画分および ARPE-19 (ヒトの網膜) 細胞の核および細胞質の画分から分離した。逆転写酵素 PCR (RT-PCR) を、細胞型の各々からの RNA 抽出物を使用して実行した。要するに、ポリ-A RNA (完全に転写された RNA) の DNA コピーのみを生成するために、cDNA 合成をオリゴ dT とともに実行し、PRPF31 および RB1 の転写物におけるイントロン保持に関する評価を行うために、PCR を実行した。PCR 産物を、1.5% のエチジウムプロマイド染色したアガロースゲル上で分離した(図 6A-6D)。結果は、試験される 3 つの細胞株の各々の核内の両方の遺伝子 (PRPF31 および RB1) に関する(黒のアスタリスクによって印された)幾つかのイントロン保持事象を示している(図 6A-6D)。

#### 【0148】

表 9 および 10 は、それぞれ、PRPF31 および RB1 に関して試験された 3 つの細胞株に生じる、すべてのイントロン保持事象をリストしている。3 つの細胞株すべてにわたって生じる事象 (イントロン保持の存在または欠如) は、アスタリスクで示されている。表は、3 つの細胞株にわたって非常に高い一致があることを示し、これは、イントロン保持事象が、遺伝子に固有であり、異なる細胞環境によって影響されないことを示唆している。これらの事象が非生産的である(つまり、結果的にタンパク質生成をもたらすことができる)かどうかを検討するために、ARPE-19 細胞の細胞質画分を使用して、RT-PCR を実行した(図 6E)。結果は、観察されたイントロン保持事象の大多数が、ARPE-19 細胞の細胞質中に存在しないことを示し(図 6E、アスタリスクはバンドがあるべき場所を印している)、これは、予測した通り、イントロン保持事象によって、結果的として、転写物が、核内に保持されるか、または細胞質中のナンセンス変異依存 mRNA 分解機構によって分解され、それ故、非生産的な転写物であることを示唆している。

#### 【0149】

10

20

## 【表9】

表9. PRPF31遺伝子におけるイントロン保持事象に関する結果の概要。

「Yes」はイントロン保持の存在を示し；「No」はイントロン保持の欠如を示し；および「？」は非決定的な結果を示す。3つの細胞株間に一致がある場合は、アスタリスク (asterisk) (\*) で標識付けされている。

PRPF31			
293T	網膜	HeLa	イントロン
Yes	Yes	Yes	1*
No	No	No	2*
Yes	Yes	Yes	3*
Yes	Yes	Yes	4*
No	Yes	No	5
No	No	No	6*
No	No	No	7*
No	No	No	8*
?	Yes	?	9
?	Yes	?	10
No	No	No	11*
Yes	Yes	Yes	12*
No	No	No	14*

10

20

30

40

【0150】

## 【表 10 - 1】

表 10. RB1 遺伝子におけるイントロン保持事象に関する結果の概要。

「Yes」はイントロン保持の存在を示し；「No」はイントロン保持の欠如を示す。3つの細胞株間に一致がある場合は、アスタリスク (\*) で標識付けされている。

RB1			
293T	網膜	HeLa	イントロン
No	No	No	1*
No	No	No	2*
Yes	Yes	No	3
No	No	No	4*
Yes	Yes	Yes	5*
Yes	Yes	Yes	6*
Yes	Yes	No	7
No	Yes	Yes	8
Yes	Yes	Yes	9*
No	Yes	No	10
No	No	No	11*
Yes	No	Yes	12
No	No	No	13*
Yes	Yes	Yes	14*
No	No	No	15*
No	Yes	No	16
No	Yes	No	17
No	Yes	Yes	18
No	Yes	Yes	19
Yes	No	No	20
No	No	Yes	21

【表10-2】

Yes	Yes	Yes	22*
Yes	Yes	Yes	23*
No	No	No	24*
Yes	Yes	Yes	25*

10

## 【0152】

## 実施例2：イントロン保持事象の確認

本明細書に記載された方法を使用して、PRPF31 (X1型網膜色素変性症) およびRB1 (網膜芽細胞腫) 遺伝子におけるイントロン保持事象のために、第2ラウンドスクリーニングを実行した(図4)。簡潔には、実施例1に記載されるように逆転写酵素PCR (RT-PCR) を実行するために、ARPE-19 (ヒトの網膜) 細胞からの核RNA抽出物を使用した。本実施例において、1つを超えるイントロンがプレmRNAから切り出された(除去された)シナリオで、イントロン保持を評価した。結果は、候補イントロン保持事象の数の範囲を限定する図6A-Dの結果と比較して、両方の遺伝子(PRPF31およびRB1)に関する(黒のアスタリスクによって印された)より少ないイントロン保持事象を示す(図7A-7B)。

20

## 【0153】

## 実施例3：変異誘発またはイントロン領域のASO標的を介するスプライシング効率の改善は、遺伝子発現を増加させる

サラセミアに関する、HBB(ヒトのグロビン)遺伝子の2つのイントロンの各々のスプライシング効率を改善し、これが結果として転写レベルの増加をもたらすかどうかを評価することを目的とした。HBBオープンリーディングフレーム全体を、ミニ遺伝子レポーターにおいてクローニングした。変異を、完全なコンセンサス配列にもたらすために、両方のイントロンの5'および3'スプライス部位へと導入した図8Aは、スプライス部位で導入されたHBB遺伝子および変異の略図を示す。各スプライス部位における変異に加えて、これらの変異の組み合わせを運ぶミニ遺伝子レポーターを、Fugeneのトランスフェクション試薬を使用して24時間、独立して、HEK293(ヒトの胚腎上皮)細胞へとトランスフェクトした。放射性RT-PCRの結果は、イントロン1(IVS1)の5'スプライス部位のみを改善する変異が、HBB転写物レベルを増加させることを示している(図8B)。変異ミニ遺伝子のHBB PCR産物に対応するバンドの強度の定量化を、GFPの強度に正規化し、野生型HBBに関連してプロットした。バーは、イントロン1のスプライシング効率が改善されたときのHBBの発現レベルの2倍を超える増加を示している(図8C)。我々は、HBBイントロン1が、非効率的に切り出され、遺伝子(示されないデータ)中の律速のイントロンであることを以前に観察した。ここでは、非効率的に切り出されたイントロンのスプライシング効率を改善することによって、遺伝子発現の著しい増加が達成されることを示す。

30

## 【0154】

ASOを使用してHBBイントロン1のスプライシング効率を改善することによって、HBBレポーター遺伝子(ミニ遺伝子)発現の増加も達成することができるかどうかを判定した。この目的のために、18-mer 2'-O-Me ASOを生成し、位置+7で開始してイントロン1を標的とし、および2つの18-mer PMO-ASOを生成し、5'スプライスジャンクションに対して、それぞれ、位置+6および+7で開始してイントロン1を標的とした(図9A;表2、それぞれ、配列番号:SEQ ID NO:104および105)。HEK293細胞を、最初に、Fugeneのトランスフェクション試薬を使用して、野生型HBBミニ遺伝子レポーターおよびGFP(トランスフェクショ

40

50

ン対照として)で同時導入した。4時間後、細胞を、トランスフェクトしなかったか、模擬トランスフェクトしたか、またはRNAiMAX (RiM) (Invitrogen) またはEndoPorter (EP) (GeneTools) の送達試薬を使用して、独立して、標的ASOまたは非標的ASO対照の各々でトランスフェクトした。48時間、図9Bに示されるように増加したASOの濃度を使用して、実験を行った。放射性RT-PCRの結果は、両方の化学作用による+7標的のASOが、模擬トランスフェクトされた又は非標的のASOと比較して、HBB転写物レベルを増加させることを示している(図9B)。+6PMO-ASOに対しても同様の結果が得られた(データは示されず)。標的ASOでトランスフェクトされた細胞からのHBB PCR産物に対応するバンドの強度を、GFPに正規化し、模擬処理された細胞からの正規化されたHBB PCR産物に対してプロットした。この分析の結果は、標的ASO(+6および+7)の両方が、HBB転写物レベルをおよそ50%増加させることを示している(図9C)。これらの結果は、ASOを使用するHBB遺伝子中の律速のイントロンのスプライシング効率の改善が、遺伝子発現の増加につながることを示している。

#### 【0155】

実施例4：イントロン領域のASO標的を介するスプライシング効率の改善がタンパク質生成を増加させる

+7'2'-O-Me ASOによるHBBイントロン1の標的後のタンパク質生成の増加を検出するために、GFPオープンリーディングフレームにより上流およびT7タグをコードする配列により下流に隣接しているHBBミニ遺伝子から成るレポーター構築物を生成した(図10A)。このレポーターを、内因性遺伝子を模倣するU2OS細胞のゲノムに統合した。GFP-HBB-T7レポーターを発現するU2OS細胞を、模擬トランスフェクトしたか、または+7'2'-O-Me ASOでトランスフェクし、タンパク質抽出物をウェスタンプロットによって分析した。簡潔には、2つの独立した生物学的複製物からのタンパク質抽出物を、4-20%のSDS-Pアクリルアミドゲル上に流し(run)、ニトロセルロース膜に移した。タンパク質生成の増加を証拠づけるために、抗GFP抗体を、GFP-HBB-T7レポーターからタンパク質生成物を検出するために使用し、抗チューブリン抗体を、ローディングコントロール/loading controlとしてチューブリンを検出するために使用された。図10Bは、GFP-HBB-T7タンパク質(下のバンド)が、+7'2'-O-Me ASOによる処置で増加されることを示すウェスタンプロット結果を示している。標的ASOでトランスフェクトされた細胞からのGFP-HBB-T7タンパク質に対応するバンドの強度を、内因性チューブリンに正規化し、模擬処理された細胞からの正規化されたGFP-HBB-T7タンパク質バンドに対してプロットした。

#### 【0156】

この分析の結果は、標的ASO(+7)が、GFP-HBB-T7タンパク質レベルを2.5倍を超えて増加させることを示している(図10C)。これらの結果は、律速のイントロンの5'スプライス部位の領域の下流に標的とされたASOを使用することによってスプライシング効率を促進することが、図2に描写されるような標的タンパク質生成の増加につながることを実証している。

#### 【0157】

実施例5：次世代配列を使用するRNAseqによるADAMTS13転写物におけるイントロン保持事象の同定

イントロン保持事象を同定するためにADAMTS13遺伝子によって生成された転写物のスナップショットを明らかにするために、次世代シークエンシングを使用して、全トランスクリプトームのショットガンシークエンシングを実行した。この目的のために、polyA+RNAをTHELE-3(ヒトの肝臓上皮)細胞の核および細胞質の画分から分離し、 Illumina's Truseq Stranded mRNA library Prep Kitを使用して、cDNAライブラリーを構築した。ライブラリーに対して、対末端配列決定を行い(pair-end sequenced)、結果として、ヒト

10

20

30

40

50

ゲノム（2009年2月、GRCh37/hg19アセンブリ）にマッピングされた100のヌクレオチドの読み取りをもたらした。ADAMTS13に対する配列決定の結果を、図11に示す。簡潔には、UCSC Genome Informatics Group (Center for Biomolecular Science & Engineering, University of California, Santa Cruz, 1156 High Street, Santa Cruz, CA 95064) によって操作され、例えば、Rosenblloom, et al., 2015, "The UCSCのゲノムブラウザのデータベース：2015年アップデート," Nucleic Acids Research 43, Database Issue (doi: 10.1093/nar/gku1177) に記載された、UCSCのゲノムブラウザを使用して視覚化されたマッピングされた読み取りを示し、読み取りの範囲および数はピーク信号によって推論され得る。ピークの高さは、特定の領域における読み取りの密度によって与えられた発現のレベルを示している。ピークがADAMTS13のエクソンおよびインtronの領域に合わせられ得るように、(読み込み信号の下の)UCSCのゲノムブラウザによって、(一定の比率の縮尺で描かれた)すべてのADAMTS13アイソフォームの略図が提供される。このディスプレイに基づいて、THE-3細胞の核画分において高い読取密度を有しているが、(図11の下のチャートにおけるインtron 25に関して示されるように)これらの細胞の細胞質画分においては非常に低い読取密度を有しているか又は読取密度を有していない、2つのインtron(矢印によって示された、25および27)を同定した。これは、両方のインtronが保持されること、およびインtron-25およびインtron-27を含有している転写物が、核内に残ることを示している。これは、これらの保持されたインtron含有(RIC)ADAMTS13プレmRNAが、細胞質に輸出されないために非生産的であることを示唆している。

#### 【0158】

実施例6：ADAMTS13のRNAseq分析によって同定されたインtron保持事象の確証

ADAMTS13(血栓性血小板減少性紫斑病)遺伝子におけるインtron 25の保持事象の確証を、本明細書に記載された方法を使用して実行した(図12)。簡潔には、A172(ヒトの膠芽腫)およびHepG2(ヒトの肝細胞癌)細胞からの核および細胞質のRNA抽出物を、実施例1に記載されるような放射性の逆転写酵素PCR( RT-PCR)を実行するために使用した。本実施例において、エクソン25およびエクソン27に位置付けられたプライマーを使用して、インtron保持を評価し、これは、インtron-25を含有している転写物および正しく切り出された転写物の両方の増幅につながった。産物を、5%のポリアクリルアミドゲルに流し、ホスホリイメージング(phosphor imaging)によって視覚化した。インtron 25の保持レベルを、合計の転写物(インtron含有の転写物+正しく切り出された転写物)に対する、インtron-25を含有している産物に対応するバンドの強度のパーセントのインtron保持(PIR)として計算した。バンドの定量化は、ADAMTS13転写物のおよそ80%がインtron 25を含有していること、およびこの産物が核内で保持されることを示した。さらに、放射性RT-PCRの結果は、RNAseq結果の生物情報学的解析がインtron保持事象を同定する強力なツールであることを実証している生物情報学的予測を確証した。

#### 【0159】

実施例7：ADAMTS13のインtron 25を標的とするASO-walkの設計

ASO-walkを、本明細書に記載される方法を使用してインtron 25を標的とするように設計した(図13)。ヌクレオチド+6から+58に及ぶ5'スプライス部位のインtron 25のすぐ下流の領域およびインtronのヌクレオチド-16から-79に及ぶ3'スプライス部位のインtron 25のすぐ上流の領域を、(一続きの4つのグアニンを回避するために、1 ASO、ADAM-IVS25-47を例外として)5つのヌクレオチド間隔でシフトされた2'-O-Me RNA、PS骨格、18-mer ASOを用いて標的とした(図13;表4、SEQ ID NO: 150~167)。インtron調

節エレメントがスプライス部位に隣接している配列に集中する (concentrate) という知識に基づいて、これらの標的部位を選択した。

#### 【0160】

実施例8：ADAMTS13イントロン25のASO標的を介するスプライシング効率の改善は、転写レベルを増加させる

ASOを使用してADAMTS13イントロン25のスプライシング効率を改善することによって、ADAMTS13発現の増加を達成することができるかどうかを判定するために、本明細書に記載される方法を使用した(図14)。この目的のために、HepG2細胞を、模擬トランスフェクトしたか、またはRNAiMAX(RiM)(Invitrogen)の送達試薬を使用して、独立して、図13および表4、SEQ ID NO:150~167に記載される標的ASO、または非標的SMN-ASO対照でトランスフェクトした。48時間(図14に示されるように)60nMのASOを使用して、実験を行った。放射性RT-PCRの結果は、+21および+26を標的とするASOが、模擬トランスフェクトされた又は非標的のASOと比較して、ADAMTS13転写物レベルを増加させることを示している(図14)。標的ASOでトランスフェクトされた細胞からのADAMTS13 PCR産物に対応するバンドの強度を、アクチンに正規化し、対照ASO処理された細胞からの正規化されたADAMTS13 PCR産物に対してプロットした。この分析の結果は、標的ASO(+21および+26)の両方が、ADAMTS13転写物レベルをおよそ2.5倍増加させることを示している(図14)。これらの結果は、ASOを使用してADAMTS13遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を改善することが、遺伝子発現の増加につながることを示している。

#### 【0161】

実施例9：ADAMTS13イントロン25を標的とするASOの用量反応効果

+21および+26のASOの他に、逆効果を示した(図14) -46 ASOの用量反応効果を判定するために、本明細書に記載される方法を使用した(図15)。HepG2細胞を、模擬トランスフェクトしたか、あるいは48時間、図15に示されるような増加する濃度で、RNAiMAX(RiM)(Invitrogen)の送達試薬を使用して、独立して、3つのASOの各々、または非標的SMN-ASO対照でトランスフェクトした。放射性RT-PCRの結果は、+21および+26を標的とするASOが、模擬トランスフェクトされた又は非標的のASOと比較して、ADAMTS13転写物レベルを増加させ、一方で、-46 ASOが、模擬トランスフェクトされた又は非標的のASOと比較して、ADAMTS13転写物レベルを減少させることを示している(図15)。標的ASOでトランスフェクトされた細胞からのADAMTS13 PCR産物に対応するバンドの強度を、アクチンに正規化し、対照ASO処理された細胞からの正規化されたADAMTS13 PCR産物に対してプロットした。この分析の結果は、標的ASO(+21および+26)の両方が、ADAMTS13転写物レベルをおよそ2.5倍増加させることを示している(図15)。これらの結果は、ASOを使用してADAMTS13遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を改善することが、遺伝子発現の増加につながることを示している。

#### 【0162】

実施例10：ADAMTS13イントロン25のASO標的を介するスプライシング効率の改善は、タンパク質レベルを増加させる

+21または+26のASOによるADAMTS13イントロン25の標的後のタンパク質生成の増加を検出するために、本明細書に記載される方法を使用した(図16)。HepG2細胞を、模擬トランスフェクトしたか、あるいは48時間、図16に示されるような増加する濃度で、RNAiMAX(RiM)(Invitrogen)の送達試薬を使用して、独立して、3つのASOの各々、または非標的SMN-ASO対照でトランスフェクトした。簡潔には、HepG2に処理された細胞からのタンパク質抽出物を、8%のSDS-ポリアクリルアミドゲル上に流し、ニトロセルロース膜に移した。タンパク質生成の増加を証拠づけるために、抗ADAMTS13抗体または抗チューブリン抗体を

、それぞれ、ローディングコントロールとしてADAMTS13およびチューブリンを検出するために使用した。図16は、ADAMTS13（上のパネルは）が、+21または+26のASOによる処置により用量依存的様式で増加されることを示すウェスタンプロットの結果を示している。標的ASOで-トランスフェクトされた細胞からのADAMTS13タンパク質に対応するバンドの強度を、内因性チューブリンに正規化し、模擬処理された細胞からの正規化されたADAMTS13タンパク質バンドに対してプロットした。この分析の結果は、標的ASO（+21および+26）が、ADAMTS13タンパク質レベルを3倍を超えて増加させることを示している（図16）。これらの結果は、律速のイントロンである、ADAMTS13イントロン25の5'スプライス部位の下流の領域に標的とされたASOを使用することによってスプライシング効率を促進することが、図2に描寫されるような標的タンパク質生成の増加につながることを実証している。  
10

#### 【0163】

実施例11：ADAMTS13イントロン25の+21～+26の領域を標的とするASO-microwalkの設計

ASO microwalkを、本明細書に記載される方法を使用して、イントロン25+21から+26の領域を標的とするように設計した（図17）。+17から+46に及ぶ5'スプライス部位のイントロン25の下流の領域を、1つのヌクレオチド間隔でシフトされた、2' - O - Me、5' - Me - Cytosine RNA、PS骨格、18-mer ASOを用いて標的とした（図17；表4、SEQ ID NO：184～197）。ASO+21および+26の観察された効果に基づいて、この標的部位を選択した（図16）。

#### 【0164】

実施例12：ADAMTS13イントロン25の+21から+26の領域のASO microwalk標的を介するスプライシング効率の改善は、転写レベルを増加させる

microwalk ASOを使用してADAMTS13イントロン25のスプライシング効率を改善することによって、ADAMTS13発現の増加を達成することができるかどうかを判定するために、本明細書に記載される方法を使用した（図18）。この目的のために、HepG2細胞を、模擬トランスフェクトしたか、あるいはRNAiMAX（RiM）（In vitrorogen）の送達試薬を使用して、独立して、図17および表4のSEQ ID NO：184～197に記載される標的ASOの各々、または非標的SMN-ASO対照でトランスフェクトした。48時間（図18に示されるように）60nMのASOを使用して、実験を行った。放射性RT-PCRの結果は、5' - Me - Cytosineでの+21およびASO標的の+25が、模擬トランスフェクトされた又は非標的のASOの他に、2つの元の+21および+26のASOと比較して、ADAMTS13転写物レベルをさらに増加させることを示している（薄灰色のバー、図18）。標的ASOでトランスフェクトされた細胞からのADAMTS13 PCR産物に対応するバンドの強度を、アクチンに正規化し、対照ASO処理された細胞からの正規化されたADAMTS13 PCR産物に対してプロットした。この分析の結果は、標的ASO（+21および+25）の両方が、ADAMTS13転写物レベルをおよそ2.0倍増加させることを示している（図18）。これらの結果は、ASOを使用してADAMTS13遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を改善することが、遺伝子発現の増加につながり、microwalkによる標的部位の改良（refinement）が、より効率的なASOの同定につながることを示している。  
30  
40

#### 【0165】

実施例13：次世代シークエンシングを使用するRNAseqによるTSC1転写物におけるイントロン保持事象の同定

イントロン保持事象を同定するためにTSC1遺伝子によって生成された転写物のスナップショットを明らかにするために、次世代シークエンシングを使用して、全トランスクリプトームのショットガンシークエンシングを実行した。この目的のために、polyA+RNAを主要なヒトの星状細胞（ASTM）および主要なヒトの皮質ニューロン（HC  
50

N) 細胞の核および細胞質の画分から分離し、 Illumina's TrueSeq Strand mRNA library Prep Kit を使用して、 cDNA ライブライマーを構築した。ライブライマーに対して、対末端配列決定を行い、結果として、ヒトゲノム(2009年2月、 GRCh37/hg19 アセンブリ)にマッピングされた 100 のヌクレオチドの読み取りをもたらした。 TSC1 に対する配列決定の結果を、図 19 に示す。簡潔には、図 19 は、 UCSC のゲノムブラウザを使用して視覚化されたマッピングされた読み取りを示し、読み取りの範囲および数はピーク信号によって推論され得る。ピークの高さは、特定の領域における読み取りの密度によって与えられた発現のレベルを示している。ピークが TSC1 のエクソンおよびイントロンの領域に合わせられ得るよう 10 に、(読み込み信号の下の) UCSC のゲノムブラウザによって、(一定の比率の縮尺で描かれた)すべての TSC1 アイソフォームの略図が提供される。このディスプレイに基づいて、ASTM および HCN の細胞の核画分において高い読み取り密度を有しているが、(図 19 の下のチャートにおけるイントロン 10 に関して示されるように)これらの細胞の細胞質画分においては非常に低い読み取り密度を有しているか又は読み取り密度を有していない、3つのイントロン(矢印によって示された、5、10 および 11)を同定した。これは、両方のイントロンが保持されること、およびイントロン - 5、イントロン - 10 およびイントロン - 11 を含有している転写物が、核内に残ることを示している。これは、これらの保持されたイントロン含有( RIC ) TSC1 プレ mRNA が、細胞質に輸出されないために非生産的であることを示唆している。

## 【 0166 】

20

実施例 14 : TSC1 の RNAseq 分析によって同定されたイントロン保持事象の確証 TSC1 (I型結節性硬化症) 遺伝子におけるイントロン 10 の保持事象の確証を、本明細書に記載される方法を使用して実行した(図 20)。簡潔には、実施例 1 に記載されるような放射性逆転写酵素 PCR (RT-PCR) を実行するために、A172(ヒトの膠芽腫)細胞からの核および細胞質の RNA 抽出物を使用した。本実施例において、エクソン 9 およびエクソン 11 に位置付けられたプライマーを使用して、イントロン保持を評価し、これは、イントロン - 10 を含有している転写物および正しく切り出された転写物の両方の増幅につながった。産物を、5% のポリアクリルアミドゲルに流し、ホスホリイメーディングによって視覚化した。イントロン 10 の保持レベルを、合計の転写物(イントロン含有の転写物 + 正しく切り出された転写物)に対する、イントロン - 10 を含有している産物に対応するバンドの強度のパーセントのイントロン保持(PIR)として計算した。バンドの定量化は、TSC1 転写物のおよそ 36% がイントロン 10 を含有していること、およびこの産物が核内で保持されることを示した。さらに、放射性 RT-PCR の結果は、RNAseq 結果の生物情報学的解析がイントロン保持事象を同定する強力なツールであることを実証している生物情報学的予測を確証した。

30

## 【 0167 】

実施例 15 : TSC1 のイントロン 10 を標的とする ASO - walk の設計

ASO walk を、本明細書に記載される方法を使用してイントロン 10 を標的とするように設計した(図 21)。ヌクレオチド + 6 から + 58 に及ぶ 5' スプライス部位のイントロン 10 のすぐ下流の領域およびイントロンのヌクレオチド - 16 から - 68 に及ぶ 3' スプライス部位のイントロン 10 のすぐ上流の領域を、5 つのヌクレオチド間隔でシフトされた 2' - O - Me RNA 、 PS 骨格、 18 - mer ASO を用いて標的とした(図 21 ; 表 5 、 SEQ ID NO : 214 ~ 229)。イントロン調節エレメントがスプライス部位に隣接している配列に集中するという知識に基づいて、これらの標的部位を選択した。

40

## 【 0168 】

実施例 16 : TSC1 イントロン 10 の標的 ASO を介するスプライシング効率の改善は、転写レベルを増加させる

ASO を使用して TSC1 イントロン 10 のスプライシング効率を改善することによって、 TSC1 発現の増加を達成することができるかどうかを判定するために、本明細書に

50

記載される方法を使用した(図22)。この目的のために、A172細胞を、模擬トランスフェクトしたか、あるいはRNAiMAX(RiM)(Invitrogen)の送達試薬を使用して、独立して、図21および表5のSEQ ID NO:214~229に記載される標的ASOの各々、または非標的SMN-ASO対照でトランスフェクトした。48時間(図22に示されるように)60nMのASOを使用して、実験を行った。放射性RT-PCRの結果は、+31を標的とするASOが、模擬トランスフェクトされた又は非標的のASOと比較して、TSC1転写物レベルを増加させることを示している(図22)。標的ASOでトランスフェクトされた細胞からのTSC1 PCR産物に対応するバンドの強度を、アクチンに正規化し、模擬処理された細胞からの正規化されたTSC1 PCR産物に対してプロットした。この分析の結果は、幾つかのASO(+31を含む)が、TSC1転写物レベルをおよそ1.5倍増加させることを示している(図22)。これらの結果は、ASOを使用してTSC1遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を改善することが、遺伝子発現の増加につながることを示している。

#### 【0169】

##### 実施例17:TSC1イントロン10を標的とするASOの用量応答効果

+31 ASOの用量反応効果を判定するために、本明細書に記載される方法を使用した(図23)。A172細胞を、模擬トランスフェクトしたか、あるいは72時間、図23に示されるような増加する濃度で、RNAiMAX(RiM)(Invitrogen)の送達試薬を使用して、独立して、+31 ASO、または非標的SMN-ASO対照でトランスフェクトした。放射性RT-PCRの結果は、+31を標的とするASOが、模擬トランスフェクトされた又は非標的のASOと比較して、TSC1転写物レベルを増加させることを示している(図23)。標的ASOでトランスフェクトされた細胞からのTSC1 PCR産物に対応するバンドの強度を、アクチンに正規化し、模擬処理された細胞からの正規化されたTSC1 PCR産物に対してプロットした。この分析の結果は、+31を標的とするASOが、用量依存的様式でTSC1転写物レベルをおよそ2.0倍増加させることを示している(図23)。これらの結果は、TSC1転写物におけるどこかのプライマーを使用するRTqPCRによって確認され、3倍の増加、およびASO処置に対する用量依存反応を示している。これらの結果は、ASOを使用してTSC1遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を改善することが、遺伝子発現の増加につながることを確認している。

#### 【0170】

##### 実施例18:TSC1イントロン10のASO標的を介するスプライシング効率の改善は、タンパク質レベルを増加させる

+31 ASOによるTSC1イントロン10の標的後のタンパク質生成の増加を検出するために、本明細書に記載される方法を使用した(図24)。A172細胞を、模擬トランスフェクトしたか、あるいは72時間、図24に示されるような増加する濃度で、RNAiMAX(RiM)(Invitrogen)の送達試薬を使用して、独立して、+31 ASO、または非標的SMN-ASO対照でトランスフェクトした。簡潔には、A172に処理された細胞からのタンパク質抽出物を、10%のSDS-ポリアクリルアミドゲル上に流し、ニトロセルロース膜に移した。タンパク質生成の増加を証拠づけるために、抗TSC1抗体または抗チューブリン抗体を、それぞれ、ローディングコントロールとしてTSC1およびチューブリンを検出するために使用した。図24は、TSC1(上のパネルは)が、30nMおよび60nMで+31 ASOによる処置により用量依存的様式で増加されることを示すウェスタンプロットの結果を示している。標的ASOでトランスフェクトされた細胞からのTSC1タンパク質に対応するバンドの強度を、内因性チューブリンに正規化し、模擬処理された細胞からの正規化されたTSC1タンパク質バンドに対してプロットした。この分析の結果は、標的ASO(+31)が、TSC1タンパク質レベルを2倍を超えて増加させることを示している(図24)。これらの結果は、律速のイントロンである、TSC1イントロン10の5'スプライス部位の下流の領域に標的とされたASOを使用することによってスプライシング効率を促進することが

、図2に描写されるような標的タンパク質生成の増加につながることを実証している。

【0171】

実施例19：次世代シークエンシングを使用するRNAseqによるIMPDH1転写物におけるイントロン保持事象の同定

イントロン保持事象を同定するためにIMPDH1遺伝子(X型網膜色素変性症)によって生成された転写物のスナップショットを明らかにするために、次世代シークエンシングを使用して、全トランスクリプトームのショットガンシークエンシングを実行した。この目的のために、polyA+RNAをARPE-19(ヒトの網膜上皮)細胞の核および細胞質の画分から分離し、 Illumina's Truseq Stranded mRNA library Prep Kitを使用して、cDNAライブラリーを構築した。  
ライブラリーに対して、対末端配列決定を行い、結果として、ヒトゲノム(2009年2月、GRCh37/hg19アセンブリ)にマッピングされた100のヌクレオチドの読み取りをもたらした。IMPDH1に対する配列決定の結果を、図25に示す。簡潔には、図25は、UCSCのゲノムブラウザを使用して視覚化されたマッピングされた読み取りを示し、読み取りの範囲および数はピーク信号によって推論され得る。ピークの高さは、特定の領域における読み取りの密度によって与えられた発現のレベルを示している。ピークがIMPDH1のエクソンおよびイントロンの領域に合わせられ得るように、(読み込み信号の下の)UCSCのゲノムブラウザによって、(一定の比率の縮尺で描かれた)すべてのIMPDH1アイソフォームの略図が提供される。このディスプレイに基づいて、ARPE-19細胞の核画分において高い読み取り密度を有しているが、(図25の下のチャートにおけるイントロン14に関して示されるように)これらの細胞の細胞質画分においては読み取り密度を有していない、1つのイントロン(矢印によって示された、14)を同定した。これは、イントロン14が保持されること、およびイントロン-14を含有している転写物が、核内に残ることを示している。これは、保持されたイントロン含有(RIC)IMPDH1プレmRNAが、細胞質に輸出されないために非生産的であることを示唆している。

【0172】

実施例20：IMPDH1のイントロン14を標的とするASO-walkの設計

ASO-walkを、本明細書に記載される方法を使用してイントロン14を標的とするように設計した(図26)。ヌクレオチド+6から+65に及ぶ5'スプライス部位のイントロン14のすぐ下流の領域およびイントロンのヌクレオチド-16から-68に及ぶ3'スプライス部位のイントロン14のすぐ上流の領域を、(一続きの4つのグアニンを回避するために、1ASO、IMP-IVS14+18を例外として)5つのヌクレオチド間隔でシフトされた2'-O-Me RNA、PS骨格、18-mer ASOを用いて標的とした(図26；表6、SEQ ID NO:246~261)。イントロン調節エレメントがスプライス部位に隣接している配列に集中するという知識に基づいて、これらの標的部位を選択した。

【0173】

実施例21：IMPDH1イントロン14のASO標的を介するスプライシング効率の改善は、転写レベルを増加させる

ASOを使用してIMPDH1イントロン14のスプライシング効率を改善することによって、IMPDH1発現の増加を達成することができるかどうかを判定するために、本明細書に記載される方法を使用した(図27)。この目的のために、ARPE-19細胞を、模擬トランسفェクトしたか、あるいはRNAiMAX(RiM)(Invitrogen)の送達試薬を使用して、独立して、図26および表6のSEQ ID NO:246~261に記載される標的ASOの各々、または非標的SMN-ASO対照でトランسفェクトした。48時間(図27に示されるように)60nMのASOを使用して、実験を行った。放射性RT-PCRの結果は、+48を標的とするASOが、模擬トランسفェクトされた又は非標的のASOと比較して、IMPDH1転写物レベルを増加させることを示している(図27)。標的ASOでトランسفェクトされた細胞からのIMPDH

10

20

30

40

50

1 PCR 産物に対応するバンドの強度を、 アクチンに正規化し、 対照 ASO 处理された細胞からの正規化された IMPDH1 PCR 産物に対してプロットした。この分析の結果は、 標的 ASO (+48) が、 IMPDH1 転写物レベルを 4 倍増加させることを示している（図 27）。これらの結果は、 ASO を使用して IMPDH1 遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を改善することが、 遺伝子発現の増加につながることを示している。

【0174】

実施例 22： IMPDH1 イントロン 14 を標的とする ASO +48 の用量応答効果

+48 ASO の用量反応効果を判定するために、 本明細書に記載される方法を使用した（図 28）。 ARPE-19 細胞を、 模擬トランスフェクトしたか、 あるいは 72 時間、 図 28 に示されるような増加する濃度で、 RNAiMAX (RiM) (In vitro gene) の送達試薬を使用して、 独立して、 +31 ASO、 または非標的 SMN-ASO 対照でトランスフェクトした。放射性 RT-PCR の結果は、 +48 を標的とする ASO が、 用量依存的様式で、 模擬トランスフェクトされた又は非標的の ASO と比較して、 IMPDH1 転写物レベルを増加させることを示している（図 28）。標的 ASO でトランスフェクトされた細胞からの IMPDH1 PCR 産物に対応するバンドの強度を、 アクチンに正規化し、 模擬処理された細胞からの正規化された IMPDH1 PCR 産物に対してプロットした。この分析の結果は、 標的 ASO (+48) が、 IMPDH1 転写物レベルをおよそ 1.5 倍増加させることを示している（図 28、 中央のグラフ）。これらの結果は、 IMPDH1 転写物におけるどこかのプライマーを使用する RTqPCR によって確認され、 2.5 倍の増加、 および ASO 処置に対する用量依存反応を示している（図 28、 右のグラフ）。さらに、 PIR を（実施例 6 に記載されるように）イントロン 14 保持に対して計算し、 ASO 濃度および正しく切り出された転写物が増加すると、 イントロン 14 保持の低下が観察されることを示す値をプロットした（図 28、 左のグラフ）。これらの結果は、 ASO を使用して IMPDH1 遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を改善することが、 遺伝子発現の増加につながることを確認している。

【0175】

実施例 23： IMPDH1 イントロン 14 の ASO 標的を介するスプライシング効率の改善は、 タンパク質レベルを増加させる

+48 ASO による IMPDH1 イントロン 14 の標的後のタンパク質生成の増加を検出するために、 本明細書に記載される方法を使用した（図 29）。 ARPE-19 細胞を、 模擬トランスフェクトしたか、 あるいは 72 時間、 図 29 に示されるような増加する濃度で、 RNAiMAX (RiM) (In vitro gene) の送達試薬を使用して、 独立して、 +48 ASO、 または非標的 SMN-ASO 対照でトランスフェクトした。簡潔には、 ARPE-19 に処理された細胞からのタンパク質抽出物を、 4-20% の SDS-PAGE 上に流し、 ニトロセルロース膜に移した。タンパク質生成の増加を証拠づけるために、 抗 IMPDH1 抗体、 抗 カテニン抗体、 または アクチンを、 それぞれ、 ローディングコントロールとして IMPDH1、 カテニンまたは アクチンを検出するために使用した。図 29 は、 IMPDH1 が、 +48 ASO による処置により用量依存的様式で増加されることを示すウェスタンプロットの結果を示している。標的 ASO でトランスフェクトされた細胞からの IMPDH1 タンパク質に対応するバンドの強度を、 内因性 アクチンに正規化し、 模擬処理された細胞からの正規化された IMPDH1 タンパク質バンドに対してプロットした。この分析の結果は、 標的 ASO (+48) が、 IMPDH1 タンパク質レベルをおよそ 2.5 倍増加させることを示している（図 29）。これらの結果は、 律速のイントロンである、 IMPDH1 イントロン 14 の 5' スプライス部位の下流の領域に標的とされた ASO を使用することによってスプライシング効率を促進することが、 図 2 に描寫されるような標的タンパク質生成の増加につながることを実証している。

【0176】

10

20

30

40

50

実施例 24 : IMPDH1 イントロン 14 の +48 の領域を標的とする ASO - micro - walk の設計

ASO micro - walk を、本明細書に記載される方法を使用して、イントロン 14 +44 から +70 の領域を標的とするように設計した(図 30)。+44 から +70 に及ぶ 5' スプライス部位のイントロン 14 の下流の領域を、1 つのスクレオチド間隔でシフトされた、2' - O - Me 、 5' - Me - Cytosine RNA 、 PS 骨格、 18 -mer ASO を用いて標的とした(図 30 ; 表 6 、 SEQ ID NO : 262 ~ 271)。ASO +48 の観察された効果に基づいて、この標的部位を選択した(図 29)。

【0177】

実施例 25 : IMPDH1 イントロン 14 の +48 領域の ASO micro - walk 標的を介するスプライシング効率の改善は、転写レベルを増加させる

ASO を使用して IMPDH1 イントロン 14 のスプライシング効率を改善することによって、 IMPDH1 発現の増加を達成することができるかどうかを判定するために、本明細書に記載される方法を使用した(図 31)。この目的のために、 ARPE - 19 細胞を、模擬トランスクレクトしたか、あるいは RNAiMAX (RiM) (Invitrogen) の送達試薬を使用して、独立して、図 30 および表 6 の SEQ ID NO : 262 ~ 271 に記載される標的 ASO の各々、または非標的 SMN - ASO 対照でトランスクレクトした。48 時間(図 31 に示されるように) 60 nM の ASO を使用して、実験を行った。RT - qPCR の結果は、 ASO 標的の +46 および +47 が、模擬トランスクレクトされた又は非標的の ASO の他に、元の +48 ASO と比較して、 IMPDH1 転写物レベルをさらに増加させることを示している(図 31)。この分析の結果は、標的 ASO (+46 および +47) の両方が、 IMPDH1 転写物レベルを 3.0 倍を超えて増加させることを示している(図 31)。これらの結果は、 ASO を使用して IMPDH1 遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を改善することが、遺伝子発現の増加につながり、 micro - walk による標的部位の改良が、より効率的な ASO の同定につながることを示している。

【0178】

実施例 26 : 次世代シーケンシングを使用する RNAseq による PKD1 転写物におけるイントロン保持事象の同定

イントロン保持事象を同定するために PKD1 遺伝子(腎多囊胞病)によって生成された転写物のスナップショットを明らかにするために、次世代シーケンシングを使用して、全トランスクリプトームのショットガンシーケンシングを実行した。この目的のために、 poly A + RNA を主要なヒトの星状細胞(ASTM)および主要なヒト腎上皮細胞(REN)細胞の核および細胞質の画分から分離し、 Illumina's TrueSeq Stranded mRNA library Prep Kit を使用して、 cDNA ライブライアリを構築した。ライブライアリに対して、対末端配列決定を行い、結果として、ヒトゲノム(2009年2月、GRCh37/hg19 アセンブリ)にマッピングされた 100 のスクレオチドの読み取りをもたらした。PKD1 に対する配列決定の結果を、図 32 に示す。簡潔には、図 32 は、UCSC のゲノムブラウザを使用して視覚化されたマッピングされた読み取りを示し、読み取りの範囲および数はピーク信号によって推論され得る。ピークの高さは、特定の領域における読み取りの密度によって与えられた発現のレベルを示している。ピークが PKD1 のエクソンおよびイントロンの領域に合わせられ得るように、(読み込み信号の下の)UCSC のゲノムブラウザによって、(一定の比率の縮尺で描かれた)すべての PKD1 アイソフォームの略図が提供される。このディスプレイに基づいて、REN 細胞の核画分において高い読み取り密度を有しているが、(図 32 の下のチャートにおけるイントロン 37 に関して示されるように)これらの細胞の細胞質画分においては非常に低い読み取り密度を有しているか又は読み取り密度を有していない、4 つのイントロン(矢印によって示された、32、33、37 および 38)を同定した。これは、4 つのイントロンが保持されること、およびイントロン - 32 、イントロン - 33 、イントロン - 37 、およびイントロン - 38 を含有している転写物が、核内に残ることを示し

10

20

30

40

50

ている。これは、これらの保持されたイントロン含有 (R I C) P K D 1 プレ m R N A が、細胞質に輸出されないために非生産的であることを示唆している。

【0179】

実施例 27：P K D 1 のイントロン 37 を標的とする A S O - w a l k の設計

A S O w a l k を、本明細書に記載される方法を使用してイントロン 37 を標的とするように設計した（図 33）。ヌクレオチド + 6 から + 66 に及ぶ 5' スプライス部位のイントロン 37 のすぐ下流の領域およびイントロンのヌクレオチド - 16 から - 51 に及ぶ 3' スプライス部位のイントロン 37 のすぐ上流の領域を、（一続きの 4 つのグアニンを回避するために、2 A S O、P K D 1 - I V S 37 + 8 および + 24 を例外として）5 つのヌクレオチド間隔でシフトされた 2' - O - M e R N A、P S 骨格、18 - m e r A S O を用いて標的とした（図 33；表 7、S E Q I D N O : 297 ~ 312）。イントロン調節エレメントがスプライス部位に隣接している配列に集中するという知識に基づいて、これらの標的部位を選択した。

【0180】

実施例 28：P K D 1 イントロン 37 の A S O 標的を介するスプライシング効率の改善は、転写レベルを増加させる

A S O を使用して P K D 1 イントロン 37 のスプライシング効率を改善することによって、P K D 1 発現の増加を達成することができるかどうかを判定するために、本明細書に記載される方法を使用した（図 34）。この目的のために、H E K 293 細胞を、模擬トランスフェクトしたか、あるいは R N A i M A X (R i M) (I n v i t r o g e n) の送達試薬を使用して、独立して、図 33 および表 7 の S E Q I D N O : 297 ~ 312 に記載される標的 A S O の各々、または非標的 S M N - A S O 対照でトランスフェクトした。48 時間（図 34 に示されるように）60 n M の A S O を使用して、実験を行った。放射性 R T - P C R の結果は、+ 29 を標的とする A S O が、模擬トランスフェクトされた又は非標的の A S O と比較して、P K D 1 転写物レベルを増加させることを示している（図 34）。標的 A S O でトランスフェクトされた細胞からの P K D 1 P C R 産物に対応するバンドの強度を、アクチンに正規化し、模擬処理された細胞からの正規化された P K D 1 P C R 産物に対してプロットした。この分析の結果は、+ 29 A S O が、P K D 1 転写物レベルを 1.8 倍増加させることを示している（図 34）。これらの結果は、A S O を使用して P K D 1 遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を改善することが、遺伝子発現の増加につながることを示している。

【0181】

実施例 29：P K D 1 イントロン 37 を標的とする A S O の用量応答効果

+ 29 A S O の用量反応効果を判定するために、本明細書に記載される方法を使用した（図 35）。H E K 293 細胞を、模擬トランスフェクトしたか、あるいは 48 時間、図 35 に示されるような増加する濃度で、R N A i M A X (R i M) (I n v i t r o g e n) の送達試薬を使用して、独立して、+ 29 A S O、または非標的 S M N - A S O 対照でトランスフェクトした。放射性 R T - P C R の結果は、+ 29 を標的とする A S O が、模擬トランスフェクトされた又は非標的の A S O と比較して、P K D 1 転写物レベルを増加させることを示している（図 35）。標的 A S O でトランスフェクトされた細胞からの P K D 1 P C R 産物に対応するバンドの強度を、アクチンに正規化し、模擬処理された細胞からの正規化された P K D 1 P C R 産物に対してプロットした。この分析の結果は、+ 29 を標的とする A S O が、用量依存的様式で P K D 1 転写物レベルを 2.0 倍を超えて増加させることを示している（図 35、中央のグラフ）。これらの結果は、P K D 1 転写物におけるどこかのプライマーを使用する R T q P C R によって確認され、2 倍を超える増加、および A S O 処置に対する用量依存反応を示している（図 35、右のグラフ）。さらに、P I R を（実施例 6 に記載されるように）イントロン 37 保持に対して計算し、A S O 濃度および正しく切り出された転写物が増加すると、イントロン 37 保持の低下が観察されることを示す値をプロットした（図 35、左のグラフ）。これらの結果は、A S O を使用して P K D 1 遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を

10

20

30

40

50

改善することが、遺伝子発現の増加につながることを確認している。

【0182】

実施例30：PKD1イントロン37のASO標的を介するスプライシング効率の改善は、タンパク質レベルを増加させる

+29 ASOによるPKD1イントロン37の標的後のタンパク質生成の増加を検出するために、本明細書に記載される方法を使用した(図36)。HEK293細胞を、模擬トランスフェクトしたか、あるいは72時間、図36に示されるような増加する濃度で、RNAiMAX(RiM)(In vitrorogen)の送達試薬を使用して、独立して+29 ASO、または非標的SMN-ASO対照でトランスフェクトした。簡潔には、細胞を、抗PKD1抗体またはIgGアイソタイプ対照抗体を用いて、固定し、透過処理し、および処理した。10,000個の細胞を数えることによって、フローサイトメトリーにより細胞を分析した。図36は、より高いASO濃度の細胞が、模擬処理された(未処理の)細胞と比較して、より強いPKD1シグナルを有することを示唆している、細胞数当たりの蛍光強度のプロットを示す。模擬処理された細胞に対応する蛍光強度に対する、+29 ASO処理された細胞に対する蛍光強度の倍率変化をプロットした。この分析の結果は、標的ASO(+29)が、PKD1タンパク質レベルをおよそ1.5倍増加させることを示している(図36)。これらの結果は、律速のイントロンである、PKD1イントロン37の5'スプライス部位の下流の領域に標的とされたASOを使用することによってスプライシング効率を促進することが、図2に描写されるような標的タンパク質生成の増加につながることを実証している。20

【0183】

実施例31：次世代シーケンシングを使用するRNaseqによるIKBKA P転写物におけるイントロン保持事象の同定

イントロン保持事象を同定するためにIKBKA P遺伝子によって生成された転写物のスナップショットを明らかにするために、次世代シーケンシングを使用して、全トランスクリプトームのショットガンシーケンシングを実行した。この目的のために、pol y A + RNAをARPE-19、ASTM、ヒト気管支上皮(BRON)、HCN、REN、およびTHLE-3細胞の核および細胞質の画分から分離し、Illumina's TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kitを使用して、cDNAライブラリーを構築した。ライブラリーに対して、対末端配列決定を行い、結果として、ヒトゲノム(2009年2月、GRCh37/hg19アセンブリ)にマッピングされた100のヌクレオチドの読み取りをもたらした。IKBKA Pに対する配列決定の結果を、図37に示す。簡潔には、図37は、UCSCのゲノムブラウザを使用して視覚化されたマッピングされた読み取りを示し、読み取りの範囲および数はピーク信号によって推論され得る。ピークの高さは、特定の領域における読み取りの密度によって与えられた発現のレベルを示している。ピークがIKBKA Pのエクソンおよびイントロンの領域に合わせられ得るように、(読み込み信号の下の)UCSCのゲノムブラウザによって、(一定の比率の縮尺で描かれた)すべてのIKBKA Pアイソフォームの略図が提供される。このディスプレイに基づいて、配列決定されるすべての細胞の核画分において高い読み取り密度を有しているが、(図37の下のチャートにおける両方のイントロンに関して示されるように)これらの細胞の細胞質画分においては読み取り密度を有していない、2つのイントロン(矢印によって示された、7および8)を同定した。これは、イントロン7および8が保持されること、およびイントロン7および8を含有している転写物が、核内に残ることを示している。これは、保持されたイントロン含有(RIC)IKBKA PプレmRNAが、細胞質に輸出されないために非生産的であることを示唆している。40

【0184】

実施例32：IKBKA PのRNaseq分析によって同定されたイントロン保持事象の確認

IKBKA P(家族性自律神経不全)遺伝子中のイントロン7-保持事象の確認を、本明細書に記載される方法を使用して実行した(図38)。簡潔には、実施例1に記載され50

るような放射性逆転写酵素PCR (RT-PCR) を実行するために、ARPE-19、HeLa、およびU2OSからの核および細胞質のRNA抽出物を使用した。本実施例において、エクソン6およびエクソン8に位置付けられたプライマーを使用して、イントロン保持を評価し、これは、イントロン-7を含有している転写物および正しく切り出された転写物の両方の増幅につながった。産物を、5%のポリアクリルアミドゲルに流し、ホスホリイメージングによって視覚化した。イントロン7の保持レベルを、合計の転写物(イントロン含有の転写物+正しく切り出された転写物)に対する、イントロン-7を含有している産物に対応するバンドの強度のパーセントのイントロン保持 (PIR) として計算した。バンドの定量化は、IKBKA P転写物のおよそ35%がイントロン7を含有していること、およびこの産物が核内で保持されることを示した。さらに、放射性RT-PCRの結果は、RNAseq結果の生物情報学的解析がイントロン保持事象を同定する強力なツールであることを実証している生物情報学的予測を確証した。

#### 【0185】

実施例33：IKBKA Pのイントロン7および8を標的とするASO-walkの設計  
ASO-walkを、本明細書に記載される方法を使用してイントロン7(上のパネル)またはイントロン8(下のパネル)を標的とするように設計した(図39)。ヌクレオチド+6から+58に及ぶ5'スプライス部位のイントロン7または8のすぐ下流の領域およびイントロンのヌクレオチド-16から-68に及ぶ3'スプライス部位のイントロン7または8のすぐ上流の領域を、5つのヌクレオチド間隔でシフトされた2'-O-Me RNA、PS骨格、18-mer ASOを用いて標的とした(図39；表8、SEQ ID NO: 329~360)。イントロン調節エレメントがスプライス部位に隣接している配列に集中するという知識に基づいて、これらの標的部位を選択した。

#### 【0186】

実施例34：IKBKA Pイントロン7および8のASO標的を介するスプライシング効率の改善は、転写レベルを増加させる

ASOを使用してIKBKA Pイントロン7または8のスプライシング効率を改善することによって、IKBKA P発現の増加を達成することができるかどうかを判定するために、本明細書に記載される方法を使用した(図40)。この目的のために、ARPE-19細胞を、模擬トランスフェクトしたか、あるいはRNAiMAX (RiM) (Invitrogen)の送達試薬を使用して、独立して、図39および表8のSEQ ID NO: 329~360に記載される標的ASOの各々、または非標的SMN-ASO対照でトランスフェクトした。48時間(図40に示されるように)60nMのASOを使用して、実験を行った。RT-qPCRの結果は、IVS7+26を標的とするASO(上のグラフ)およびIVS8+26および-16(下のグラフ)を標的とするASOが、模擬トランスフェクトされた又は非標的のASOと比較して、IKBKA P転写物レベルを増加させることを示している(図40)。この分析は、これらのASOが、IKBKA P転写物レベルをおよそ1.2~1.6倍増加させることを示している(図40)。これらの結果は、ASOを使用してIKBKA P遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を改善することが、遺伝子発現の増加につながることを示している。

#### 【0187】

実施例35：IKBKA Pイントロン7および8を標的とするASOの用量応答効果

IVS7+26およびIVS8-16のASOの用量反応効果を判定するために、本明細書に記載される方法を使用した(図41)。ARPE-19細胞を、模擬トランスフェクトしたか、あるいは72時間、RNAiMAX (RiM) (Invitrogen)の送達試薬を使用して、増加する濃度で、独立して、IVS7+26またはIVS8-16のASO、または非標的SMN-ASO対照で、あるいは各々45nM(合計90nM)で両方のASOの組み合わせでトランスフェクトした(図41)。放射性RT-PCRの結果は、IVS7+26またはIVS8-16を標的とするASOが、用量依存的様式で、模擬トランスフェクトされた又は非標的のASOと比較して、IKBKA P転写物レベルを増加させることを示している(図41)。標的ASOでトランスフェクトされた細胞

10

20

30

40

50

からの I K B K A P P C R 産物に対応するバンドの強度を、 アクチンに正規化し、 模擬処理された細胞からの正規化された I K B K A P P C R 産物に対してプロットした。この分析の結果は、 I V S 7 + 2 6 および I V S 8 - 1 6 を標的とする A S O 、 およびそれらの組み合わせが、 I K B K A P 転写物レベルを用量依存的様式で 2 . 0 - 2 . 5 倍増加させることを示している（図 4 0 ）。これらの結果は、 A S O を使用して I K B K A P 遺伝子における律速のイントロンのスプライシング効率を改善することが、 遺伝子発現の增加につながることを確認している。

#### 【 0 1 8 8 】

実施例 3 6 : I K B K A P イントロン 7 または 8 の A S O 標的を介するスプライシング効率の改善は、 タンパク質レベルを増加させる

10

I V S 7 + 2 6 A S O または I V S 8 - 1 6 A S O による、 それぞれ、 I K B K A P イントロン 7 または 8 の標的後のタンパク質生成の増加を検出するために、 本明細書に記載される方法を使用した（図 4 2 ）。 A R P E - 1 9 細胞を、 模擬トランスフェクトしたか、 あるいは 7 2 時間、 R N A i M A X ( R i M ) ( I n v i t r o g e n ) の送達試薬を使用して、 増加する濃度で、 独立して、 I V S 7 + 2 6 または I V S 8 - 1 6 の A S O 、 または非標的 S M N - A S O 対照で、 あるいは各々 4 5 n M ( 合計 9 0 n M ) で両方の A S O の組み合わせでトランスフェクトした（図 4 2 ）。 簡潔には、 A R P E - 1 9 に処理された細胞からのタンパク質抽出物を、 4 - 2 0 % の S D S - ポリアクリルアミドゲル上に流し、 ニトロセルロース膜に移した。 タンパク質生成の増加を証拠づけるために、 抗 I K A P 抗体または抗 カテニン抗体を、 それぞれ、 ローディングコントロールとして I K A P および カテニンを検出するために使用した。 図 4 2 は、 I K A P が、 I V S 7 + 2 6 A S O または I V S 8 - 1 6 A S O 、 または両方の A S O の組み合わせによる処置により用量依存的様式で増加されることを示すウェスタンプロットの結果を示している。 標的 A S O でトランスフェクトされた細胞からの I K A P タンパク質に対応するバンドの強度を、 内因性 カテニンに正規化し、 模擬処理された細胞からの正規化された I K A P タンパク質バンドに対してプロットした。 この分析の結果は、 標的 A S O I V S 7 + 2 6 および I V S 8 - 1 6 が、 I K A P タンパク質レベルをおよそ 3 倍増加させることを示している（図 4 2 ）。 これらの結果は、 I K B K A P イントロン 7 の 5 ' スプライス部位の下流の領域または I K B K A P イントロン 8 の 3 ' スプライス部位の上流の領域に標的とされた A S O を使用することによってスプライシング効率を促進することが、 図 2 に描寫されるような標的タンパク質生成の増加につながることを実証している。

20

#### 【 0 1 8 9 】

30

【表 1 1】

表 1 1. P R P F 3 1 標的配列

SEQ ID NO	領域	標的配列	
1	エクソン 10	UGGGCUACGAACUGAAGGAUGAGAUCGAGCGAAAUUCGACAAGUGGCA GGAGCCGCCGCCUGUGAAGCAGGUGAAGCCGCUGCCUGCGCCCCUGGAU GGACACGCGGAAGAAGCGAGGCAGGCCG	10
2	イントロン 10	gggcccuggggguccgguaggcaugggggucauggaggggagaagccgg cguccuccucccagccgacucccuggcgccgcccc	20
3	エクソン 11	UACCGCAAGAUGAAGGAGCGGCUGGGGCUGACGGAGAUCCGGAAGCAGG CCAACCGUAUGAGCUUCGGA	
4	エクソン 12	UCGAGGAGGACGCCUACCAGGAGGACCUGGGAUUCAGCCUGGGCCACCU GGGCAAGUCGGCAGUGGGCGUGUGCGGCAGACACAGGUAAACGAGGCC ACCAAGGCCAGGAUCUCCAAGACGCUG	30
5	イントロン 12	ggccagacccaggugggcuggggaccgaggacacaaggugggggag cccagaucgcagccucc	
6	エクソン 13	GGACCCUGCAGAAGCAGAGCGUCGUUAUGGCAGGAAGUCCACCAUCCG CGACCGCUCCUCGGCACGGCCUCCAGCGUGGCCUUCACCCACUC	40

【0190】

【表12-1】

表12. RB1標的配列

SEQ	領域	標的配列	
ID	NO		
7	エクソン 24	AUCUUAGUAUCAAUUGGUGAAUCAUUC	10
		tattttcttctatgaaatataatagtatgcattgttaagtataaaaagaa attaaagctttctataatttgaatttccaaatgcagtttattcaaacacc tcatccaggcatattgcatagaattttatgagatataatatctcagat ttactttcaaataatcaagttaatctcaaattcatactcctaattggtaac ttcaaaaactttctaaatatccacttgagattataatacatatataac atttgttatatacatatatacatgtgagctgttttgctcacaaca tttctatcaccaatgtgtgagatttttctcacccaaatctattctt caactctctgggttttacaattcaattctgacactaattacc agagtcagcatcagactccacaggttcaagggtcagtcggccacaaaaat ggtctcactgcagacaccagtcaactgtcaggtccccaggctacacc acacttccgtctgacttgaatacgaagttgggggttccgatagtgcct cttccttacagtttgcattccactgccagaactactcacaaaactctggaa aatattctacttactattatcagttcatcataaaagatacaaataatgaaca gccagatgaagaaatattatagggtgaggtccagaagagtcggccatgc acaggggcttctgtccctgggagttgggtgcaccaccccttctagcac ttagacatgttaccaactccaaagatctcccaaccttattgttgggg gttttatgggggtttcattatagggataattgattaactcaatttc caaccccccctccctccctggatagagggtgggctgaaagttccaaagct tctactcaagacttggtcttctggcaaccagctccatcctaaattag ctaggtacccaccaagtatcacctcattagaacaaaagatggtcccattc acccttatcacacatgaaattcgaagggttttaggagctctgtcccagg	20
8	イントロン 24		30
			40

【表 1 2 - 2】

	aaccaggacaaagaccaaatatcttcaatgataccatgtatgtatgt acataacctcacaggaatcttataaaacaatttcaaattcactcatt atgagtgtgatttcaaattgagatactccaaaatgtaagccgatatcca aatgtcaccagcctgtccctgcctactggctcctccatacatatgca cttttgcgttccttcctcagactcttaggatattctttctgg 10 acactgatttagaattgttgcattgagatccgcctcagtgaaagtggc agagcttcattctaggagatccaaggaaagcttgcattgaaacattt attctaggctgcaatccacaaccctagttggcctccattaaagtca taattcagcagtcccatattcaatatgcattactgttaatatgttgcac catctccattccctgagagcttatatttaattttaaattttatt tttagagacagtgtctcactctgtcacctacttataacctcaaact 20 cctcggcccaagcagtccttcaccttagcctcccaagttgccaggact acaggcatgcaccaccatgtccagctaattttaaatttttagaga cagggtttctatgttggccagattggatttgaactcctggcttccacg ataccctgtctcagcctccaaagaactggattacagatgtgagccac tgcacctggccagagagcttatattcttataggaaatggaaagactgcct atgttatgtttgtctacataatacattaccccaacttagtgacttaa 30 aacaacgcttattatctccatttctgtgggtcaataatctaggcatga cttagctggccagagttctccaaagtctgtgatcaagggtgtcagttg ggctggccctgcagtcattcaaggctccactagaggagcattcactgg cagacttattcaaattggctgtggctgatcctcgatggctattggcccc tctattggttttgtcccttggccctccatagtactgcttgctattc acaacatggcagcttgcttgccagagcaggactctgagggaggcag 40 ggaaataaagagcaagagagaggtcacagtcttattgtaatctaattt ggaaatgacagcccattactttggcatattattttggtagaagcaag acaacagtagatctagcccacacacgagggaggagatcacacaagg ggtgaataccaggaggtgggtcattggagccatctgagaggctgccc
--	--

【表 1 2 - 3】

		accacactgcctcaagtaacttagggagaggtaaaagtttatgccaga tgaccaaataataaaatgtgttacaaatagttcacatggctcagc tgtcagactttacaaaggagctatggaccttataaggacagttggAAC tggctaggtatcacatagtggtcttcaaacatTTTgcttgcataacc tctaaaataattggaaaaagttgaatgtacttccatatcttaagctg 10 ataattaaaatattatacatTTAatAGCAGCACGGATTAGTTTG ttaaattgtatATGCTCCAATAGATTACCATCAAAACCTGTTTG aatttaatattggagaattcgctagTTAATTGGAAAATAAGTA taattggcaaagctaattcactgttgaatctatccgtcaaATCAGAT ataatttctatcagaaagtctatATGACTTGTCAACATAATACCCATAA 20 agtgaatcaaaaattattattcattgaacacatcatctttatcaaatt cttgcaccccttcattctgggtgtataatAGCCTAAAAACAAAAAAGG acaaaagcaagttccagaaagctgttgcattgcctacttctgaaaa gtagtcctgtatgggggtctgaaaatgaggaaccaggacttgcagag taggcagttgctggaggaagaatgtgagctgcattggaaaagacaggag gatttacaaagagtgggtgttaattgggatggaatttaggttagttatt ctgatttttagattttcatatctttatTTGGTCCAATGAAGCAGAAA 30 atTTAAATGAAGTTTACCTTGCCTGATTTGACACACCTCAAACAT ataacttgaggTTGCTAACTATGAAACACTGGCATTATGATTAAAG taaagaa
9	エクソン 25	CUUCUGAGAAGUUCCAGAAAAUAAAUCAGAUGGU AUGUAACAGCGACCG UGUGCUCAAAAGAAGUGCUGAAGGAAGCAACCCUCCUAAACCACUGAAA 40 AAACUACGCUUUGAUUUGAAGGAUCAGAUGAAGCAGAUGG

## 【表 1 3】

表 1 3. H B B 標的配列

SEQ	ID	領域	標的配列
NO			
10	エクソン 1		AUGGUGCAUCUGACUCCUGAGGAGAAGUCUGCCGUUACUGCCCUGUGGG GCAAGGUGAACGUGGAUGAAGUUGGUGGAGGCCUGGG
11	イントロン 1		tatcaaggttacaagacaggttaaggagaccaatagaaactggcattg tggagacagagaagactcttgggttctgataggcactgactctctg cctattggtcta
12	エクソン 2		CUGCUGGUGGUACCUACCUUUGGACCCAGAGGUUCUUUGAGUCUUUGGG AUCUGUCCACUCCUGAUGCUGUUUAUGGGCAACCCUAAGGUGAAGGCUCA UGGCAAGAAAGUGCUCGGUGCCUUUAGUGAUGGCCUGGCUCACCUGGAC AACCUCAAGGGCACCUUUGCCACACUGAGUGAGCUGCACUGUGACAAGC UGCACGUGGAUCCUGAGAACUUC

【 0 1 9 4 】

30

【表14-1】

表14. HBG1/HBG2標的配列

SEQ ID NO	領域	標的配列	
13	エクソン 1	ACACUCGCUUCUGGAACGUCUGAGGUUAUCAUAAGCUCCUAGUCCAGA CGCCAUGGGUCAUUUCACAGAGGGAGCAAGGCUACUAUCACAAGCCUG UGGGGCAAGGUGAAUGUGGAAGAUGCUGGAGGAGAAACCCUGGG	10
14	イントロン 1-5'	ctctggtgaccaggacaaggaggaaaggaaggaccctgtgcctggcaa aagtccaggtcgcttcaggattgtggcacctctgactgtcaaact gttc	20
15	エクソン 2	CUCCUGGUUGUCUACCCAUGGACCCAGAGGUUCUUGACAGCUUUGGCA ACCUGUCCUCUGCCUCUGCCAUCAUCAUGGGCAACCCCAAAGUCAAGGCACA UGGCAAGAAGGUGCUGACUUCUUGGGAGAUGCCACAAAGCACCUGGAU GAUCUCAAGGGCACCUUUGCCAGCUGAGUGAACUGCACUGUGACAAGC UGCAUGUGGAUCCUGAGAACUUC	30
16	イントロン 2	tccaggagatttcagccctgtgccttagtctcgaggcaacttaga caacggagtattgatctgagcacagcagggtgtgagctgttgaagata ctggggttgggggtgaagaaactgcagaggactaactggctgagaccc agtggtaatgttttagggctaaggagtgcctctaaaaatctagatgga caattttgactttgagaaaagagagaggtggaaatgagggaaatgacttt ctttattagattccagtagaaagaactttcatcttcctcattttgt tgtttaaaacatctatctggaggcaggacaagtatggcgttaaaag atgcaggcagaaggcatatattggctcagtcaaagtgggaacttttgt ggccaaacatacattgctaaggctattcctatatcagctggacacata aaaatgctgctaattgcttcattacaaacttatatccttaattccagat ggggcaaaagtatgtccagggtgaggaacaattgaaacatttggcgtg	40

【表 1 4 - 2】

		gagtagatttgaaagttagctctgtgtgtgtgtgtgtgtgcgcgc cgcggtgtgtgtgtgtcagcgtgtgttttttaacgtcttcagcc tacaacatacagggttcatggtggcaagaagatagcaagattaaatta tggccagtgactagtgtttgaaggaaacaactacacctgcatttaatgg aaggcaaaatctcaggcttgaggaaagttaacataggcttgattctgg gtgaaagcttgggtgttagttatctggaggccaggctggagctctcagc tcactatgggttcatcttattgtctc	10
17	エクソン 3	UCCUGGGAAAUGUGCUGGUGACCGUUUUGGCAAUCCAUUUCGGCAAAGA AUUCACCCUGAGGUGCAGGCUUCCUGGCAGAAGAUGGUGACUGCAGUG GCCAGUGCCCUGGUCCUCCAGAUACCAC	20

【0196】

【表15-1】

表15. C F T R 標的配列

SEQ	ID	領域	標的配列	
NO				
18	エクソン 1		AAUUGGAAGCAAAUGACAUCAUCACAGCAGGUUCAGAGAAAAAGGGUUGAGCG GCAGGCACCCAGAGUAGUAGGUUUUGGCAUUAGGAGCUUGAGGCCAGA CGGCCUAGCAGGGACCCCAGCGCCCGAGAGACCAUGCAGAGGUUCGCCU CUGGAAAAGGCCAGCGUUGUCUCCAAACUUUUUUU	10
19	イントロン 1		aagggtggccaaccgagcttcggaaagacacgtgcccacgaaagaggagg gcgtgttatgggttgggtttgggttaaaggataagcagttttaaa agatgcgtatcattcattgtttgaaagaaaatgtggattttagaa taaaacagaaagcattaagaagagatggaagaatgaactgaagctgatt gaatagagagccacatctacttgcaactgaaaagttagaatctcaagac tcaagtacgctactatgcacttgcatttttatttcattttctaaagaaacta aaaatacttgttaataagtacctaagtatggttattggttttccccct tcatgccttggacacttgattgtcttgcacatacaggtgccatgc ctgcataatgtactgtcagaaaacatttcttgcatttttttttttttttt caaaaatttgggttaggtagaaaatataatgtctaaagtatttttttt atgagactggatatacttagtatttgcacaggtaaatgatttttttttt aattgaaagcaaatttgcatttttttttttttttttttttttttttttt caagctataaattttaaaagccataggaatagataccgaagttatcc aactgacatttaataattgtattcatagcctaattgtgatgagccacag aagcttgcaaaactttaatgagatttttttttttttttttttttttttt atcttaggcaaagtgtgttagatgttagcacttcatatttgcatttt ttt atgaataggtactgtctcttggacatttgcacacataatttgcatttt	20 30 40

【表15-2】

		caatgaataagcatactgaggtatcaaaaaagtcaaatatgttataat agctcatatatgtgttagggggaaaggaatttagcttcacatctctc ttatgttagttctctgcat.....ccaaataaggtctgaatgaca caaattttagaactctccagagaaaagaaagatgctgagggaaaaagca taggtttggactcactaaatcccagttcaattccttcttaataat atattcaattttacctgagaaagctctcgctctcgatatttatttag aaatttctcttgtacatgattgattcacaatccttctgcctcct cttctactttcttcttcttagatttcctatctttagatttgcctcct gccttatacctcaacagtttagaaacaatattttgaaaatcactacggta tcctgcatacgatgtttccatgccaactttactaattccattataat tattatttattgatgccttagagggcagatgagtgtagctgctatggagt gaggagacaaaacataagaaagttatgatcctaccctcaggtatgatt cagacatgataattaagtcaacaaattgatagaaactaattactaactc tctggctatagtcattttcaatgaatagctcattactgagtgatgc gctacagtaacaaaattataaggctgttatttttttttttttttt gcatgtcttattcagagttttttatattgaaatggaagaggctggac ttcagtaatttgctataaactgcttagtatgatttttttttttttttt atttttaaagaataattttatgaaatgttttttttttttttttt ccctggaaaaaccataactattattccctccaaatccctttgacaaatg gacagtcacatttcagagatattgatgtttatacaggtgtacgc gtaagagatgaagcctggattttatgaaattgacttatttttttttt tatttacatgtgcataatttccatatgcccagaaaagttgaatagtatc agattccaaatctgtatggagaccaaatacaagtgaatatctgttcctc 10 20 30 40
20	エクソン2	UGGACCAGACCAUUUUGAGGAAAGGAUACAGACAGCGCCUGGAAUUGU CAGACAUAUACCAAAUCCUUCUGUUGAUUCUGCUGACAAUCUAUCUGA AAAAUUGGA

【表15-3】

21	イントロン2	ttcatgtacattgttagttgaagagagaaattcatattattaattatt tagagaagagaaagcaaacatattataagtttaattcttatatttaaaa ataggagccaagtatggtggcta atgcctgtaatcccaactattggga ggccaagatgagaggattgctttagaccaggagttgataccagcctgg gcaacatagcaagatgttatctctacacaaaataaaaaagttagctggg 10 aatggtagtgc atgcttgtattccagctactcaggaggctgaagcagg agggttactttagccccaggagttgaggtgcagttagctatgatttg ccactgcactccagcttgggtgacacagcaaaaccctctctctaaaa aaaaaaaaaaaaaggaacatctcatttacactgaaatgttactgaa atcattaaacaataaaatcataaaagaaaaataatcagttcctaagaa atgatttttttcctgaaaaatacacattggttcagagaatttgc 20 tattagagaccatgagatggatttgtgaaaactaaagtaacaccatta tgaagtaaatcgtgtatatttgcttcaaaaccttataattgaataca aatgtactccctggaaagtcttaaggtaatggctactggttatcaaaca aatgtaaaaattgtatatttgagtagtacctgttacatgccaggtagaat atctcctctcagccactctgagtgaaagcatcattatctctatatttac 30 agaaaaagcaaactgaggctcagagagataatatacttgcagttaaatg aatgatggagccatgattccagctgaggtctgtattgccttgctctca ggaatggtagtccccccataaagaatctctcagttcatttcaatca aaaggtaggatcctttagtgcactgacagaaacccaattactag cttaagtaataaaaggaac.....gcccccttggcctccaaatgt ttgggatttagtggcgtgagccactgccccggcctattactcctttagag 40 tgatttagagccatgttacttatggtaacttgacagtaatggaaataa ccactgtgaaacgtaaagccttgcataattgttacctagttc ttgtggttcatgaaattttcatctgtacagttgaaaattaagatg ataatatttagagatatttattccttgcataagaaaaaggcttc attaacagaaatcagtgcaataacttaataatacaatcagctggtgt
----	--------	---

【表 15-4】

【表 15-5】

【表15-6】

		ctcccactgttgctataacaaatcccaagtcttatttcaaagtaccaag atattgaaaatagtgctaagagttcacatatggatgacccttatat aaactcatttaagtctcctctaaagatgaaaagtcttgtgtgaaatt ctcagggtatattatgagaaataatgaaatttaatttctctgtt	
24	エクソン4	AAGUCACCAAAGCAGUACAGCCUCUUACUGGAAAGAAUCAUAGCUUC CUAUGACCCGGAUAACAAGGAGGAACGCUCUAUCGCGAUUAUCUAGGC AUAGGCUUUAUGCCUUCUUUAUUGUGAGGACACUGCUCCUACACCCAG CCAUUUUUGGCCUUCAUCACAUUGGAAUGCAGAUGAGAAUAGCUAUGUU UAGUUUGAUUUUAUAAG	10
25	イントロン 4-5'	acttccttgcacaggccccatggcacatattctgtatcgtacatgtt ttaatgtcataaatttaggttagtgagctggtacaagtaaggataatgc tcaaattaatataatgcctattaaataatggcaggaataattaatg ctcttaattatccttgcataatttaattgacttaactgataattattga gtatcttctgtaaactgcctctgttagttttttctctaattca tgttatcatttttggaatccatggttcctgttaagatgactcacac agcctacataaaagtaattgacaaaatcatcttataatgatgttatgat catatcttataatgttgcagcaagaagagtataatataatgattgttatgat aacccaaacaacaaaagattcaccttaactgggtcataatgttatgat tatccaccgccttatttgagttggattttatcatcctatgagcccta caaatttaagttttggAACAGCACGTGATTGAAACCATAAGAACCT actctgctttctgcattgttgcatttttttttttttttttttttttttttt gcatt attcaagggttttcaaaggcatgtgcatttttttttttttttttttttt catgtgttactaacttggatctgcaaaagtcttgcatttttttttttt atggacttatttggatattgttgcatttttttttttttttttttttttt caatgtaaaaacattatgttaataacttggcttttaagagcatagat ctgaaatctgcctctagcaaataacccataaacacttctaaagatataacct	20 30 40

【表15-7】

	gcaaggtaattgtgttaaaacccataaccatactttattgtca aaaaagcctttatgaaggcagaagttaaaaaaaaaaaaacaaaaaaac agagtccacagttatcacctcagctacaatctcatcagttcacaagtc cagcaaaacatgtgataagtcaacaaatgtttatttcaatctgaacat tttacgtaagtgaagactttgttagatatcatttgaatgtgaaatcta cacagttggcatatcagagaaggtaattcagttataaaatgtttat agaaagtgcgttatcataatgataatagctcaggatgtgcataaaaa gcttttaagcgattgggtacactatctcatttgcatttgcacaacta ttaatggtaggtactattatccctatcttgcataatggataagtaactaagat ttaaaaagtacagaacatgggtgaaacactgcatttgcataatggataat aggttaatcacgatctctaaactggagggtgtccaccactaggacaa atagagtactgatatttagtggtcagactgtaatgcgggaagagacagg catggctaaacgggtgttagagatcaaataaggggcaggttagttgt aacatgtccatatgtaacatggcatacaggtataggtgcattt cagacccagctgcattgataaaaaagtttaggtggattgtatctgtctt ctttctcaatgttgcataatctgtgttgcatttgcatttgcatttgcattt ctagccacacttattggcataatggcatcatcaccacaaagaaggcaat cccatctccgtgtggcttggttgtccctaaagtaaaccttgcatttgcattt actttcccaggctcatgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt tggccaggatatgtggacctttcataatgttccaaattctgcaacatggataata gagctttctgtgtttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt atgaatttaataacaaacaaacttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt tgcagagataactaaattaataaaaaatttgcatttgcatttgcatttgcattt acacagctctatgttaaggcattgtgcagaactcaaagtcactcgagatt aaggcattttactaagttatgtgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt tttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt tttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcattt
	10
	20
	30
	40

【表15-8】

		<p>ctaactcctcaagaaaatccttcagatgattttctaaccaggagtt  taacttcctttaactaccctattactttctacttccttaactcatcta  tcatattatatttagttatataacttaggtcgccctgaagaagggat  tgtgtttcataaatcttaataatccctgaggcatcaagtacagtgatt  tgcatttactaaatgctcaacaaatatgtgagggattcactgaaacta  atattagataattcccagtcaaagtgatctaatacgaaatcaattttc  agttttataggcaaagtatgactctgggtttccataatcataattaatt  tgtcaactttataatttaattaagtaatttaattttgttagataaataa  gtagataaaaaataattacctgcttaactacgtttcatatagcattgc  atttttcttgtaaaattnagaattttgttataataactttttaca  aaagtattaatttattcagttattcatcatatacttttattgacttaaaa  gtaattttattcaaaagagtttagtataaggactacatgaaaaattcaagg  ccaaggcttaatttcaaatttcaactgccttggctctatctttaaaac  aaaacaaaaactcccgcacaatataatcaatgggtatttaagtataatc  atttcattgtgaggagaaaaataattttctgccttagatgctggga  aataaaaacaactagaagcatgccagtataatattgactgttggaaa  cattatgaacctgagaagatagtaagctagatgaatagaatataattt  tcattaccttacttaataatgaatgcataataactgaatttagtcatat  tataattttacttataatataattttgttattttgttggaaaattatcta  acttt </p>		10 20 30
26	エクソン5	CUUUAAAGCUGUCAAGCCGUGUUUCUAGAUAAAUAAGUAUUGGACAACU UGUUAGUCUCCUUUCCAACAAACCUGAACAAUUUGAU		40
27	イントロン5	tacctattgatttaatcttttaggcactattgttataaatttataact ggaaaggcgagtttctgggtcagataatagtaatttagtggtaagt cttgcctcagctctagctccctattctggaaactaagaaaggtaattt tatagcagagcaccattctgggtctggtagaaccacccaactcaaagg caccttagcctgttggtaataagattttcaaaacttaattttatcag		

【表 15-9】

【表15-10】

		agaatttctttataaatatgttgcatttcattttgttagattataa aacaggtaaaaaggataaaacattatgtgaattaaaggaaataccta attttgcgttagtttattagctttactactctggttatggatcat cacaccagagccttagttactttgtgtacagaataactaatatgagtg aatgaatgacttacacaagtcaactgcttaggataaaggcgttgcgttgc tcagctagatgacagaaaagtatctaagtttggagtcaaatacgac tttgcgttagtttgcatttcattttacttagttatgtgacccattttca agccacttcacccactgagtcgtttgcattttcatctctaaaatagag ataccaccgctcataggctgtcataaggatagatgcataatggaa tgagtctgtacagcgtctggcacataggaggcattaccacaaacagtagt tatttttttttaccatctattgataataatgcacccatctgttgc gaataaaaagaaatatgactaaaacccgttgcgttcaatagataat ttgacttgcgtttactatttagattgattgattgattga
30	エクソン7	GAUCAGAGAGCUGGGAAAGAUCAGUGAAAGACUUGUGAUUACCUCAGAAA UGAUUGAAAAUAUCCAAUCUGUUAAGGCAUACUGCUGGGAAAGAAGCAAU GGAAAAAAUGAUUGAAAACUUUAAG
31	イントロン7	ttgttccaataattcaatattgttagtaattctgtccttaattttta aaaatatgtttatcatggtagacttccacccatattgtatgtttgtga caatcaaattgtcattaagttctgtcaatattcatgcatttagttgc acaaatttcactttcatggctgttagttatgttagttggccagggtgt tattttatgtcaagtatattatactgatacgttattaaagaatttcc tacatatgttcaactgctgctcaatacatttatttcgtttaaaacaattat caagatactgaaggctgattggtaactcacatggaactggagaggtata caattctgaaccaaatacatgattctctattattatcttaattttagt tgttatgttatattaaacatgaaaaaaattgtattggtagaatatgt ttgctcttccttaactcgaaatgacataggtaatattcacagattgg gttcctataatcctccacttgaagtgaagtcaagttcaagtaatgaaag

【表15-11】

	ctacacctgagatagaatcagtacttggcacctatctctagtgttctt tcacctatataacctttcactgattagtaaagattatccaacaaag aaagtacagcacagactgagatatgattactgagataaatttggcaaa atataaactacacgcatttctgttagcaatgagaccatttcttcagtt agctccatgttctacaaacttcaatcaaaaaaggttctaggagactcag tgaaagttgatacactgttcaaggaacaaataattcagcacatggaa tttcacagggaaaaatataactaaaaagagaggtaccatggatgg tcaatatgggttatgaggaattcaggctgctgagtccagtgtacaatgg aaactgagctgcaggtgtgtgattgtacaacaacaaaagaaatgctgaaat attaagtccttgccatgtaaatagaaaaagagtatttatttccaaac attattgctcacctgttttgttatgccttcaagataatccagggaa ggaattgcatttcttccagaaaacaagttctggggattgttcaa ttggtagatgttggattttcttcaaaaagatgaaatct atccctcttacttggaaatttctttgatata>tagcgaatgttgg taacctgtataatctggcatgaaattgtcactcgaaaaggctagaagtg ttgacataaatatggacagcaagagttgctcactcaagagagcaa tataatgttctggaaagagattggcagaattcacatcaaaggagtatta cttcagcctggccactgttactggtaaaaaggctgtgcaaagctct ctgaaaatccactctttattgctcttagtaataaagtcaacttcaat tttaaaaataacaaactgatataatggactcataaaatgttagca attatattatggagaatctactttctgggtgattcttacaaatgttctt ggatctatttttttcttatagtacctattcttccatggcag tcttagtaatatattcaacaacagttcaacaaatttaacatgg 10 20 30 40
--	---

【表 15-12】

【表15-13】

		acaagtactacaagcaaaacactggactttcattgttatctttcata taaggttaactgaggcccagagagattaataacatgccaaaggcacac aggtcatatgtggagccaggtaaaaatataaggcagaaagactcta gagaccatgctcagatcttccattccaagatccctgatattgaaaaat aaaataacatcctgaattttattgt	10
32	エクソン 8	ACAGAACUGAACUGACUCGGAAGGCAGCCUAUGUGAGAUACUCAAUA GCUCAGCCUUUCUUCUUCAGGGUUCUUUGUGGUUUUUACUGUGCU UCCCUAUGCACUAUCAAAGGAAUCAUCCUCCGGAAAAAUUCACCACC AUCUCAUUCUGCAUUGUUCUGCGCAUGGCGGUCACUCGGCAUUUCCU GGGCUGUACAAACAUGGUAUGACUCUCUUGGAGCAAUAACAAAAUA	20
33	イントロン 8	gtaccataatgctgcattatactatgatttaataatcagtcaatag atcagttctaataactttgcaaaaatgtgcggaaaagatagaaaaagaa atttccttcacttaggaagttataaaagttgccagctaataacttaggaatg ttcaccttaaactttccatgcatttctctggacagtatgatggatgag agtggcattttatgccaaattacctaaaatccaaataactgtatgta gctagcagcttgagaaattctaaagttcaagtgataagactcaatt tatacaaagctaattggataaacttgtatgatgatgatgaaagcaaataaa tacttattatgcttttgctgtttattnaatatttaacccagaaaat aagtcaactgtgacagaaaataaaaatgagagagaagggtgagccacttt agtagttctggcattattnaatctaggccagaggttgcaaatgggtgc ccatagaactaatttggctcctagacctgtcttatttaaccttcatt taaaaaattgtattggccagcaattaaaattggagatgtctca cacacacacacataaacacacacactcatgtgtgcagccttttga agaatttggataactgtcaactgcgtcctcctttccacaagctgtga cagctccctgctcacagagcacctgcctctcctgttcatcatgctc ttctcagtcccattccttcattatcacctattggcctgagactaa gtgagttgagatctgtgattnagacaaagtggtaatctagctgaa	30 40

【表 15-14】

【表15-15】

	catggtggcagatgctgttagtcccagctgctcgggaggctgaggcagga gaatcaacttgaacctgggaggcggaggttgcagttagctaaatcacgc cactgcactccagcctggcaacaaggcgagactctgtctgaaaaagaa aaaaaaataaaaataaaaataaaaagaagtggaggaaatattaaatgcaa tataaaagctttttattttaagtcatacaattgtttcacataaca gatcaggaaataatacagagatcataagttggagctggggttgaatc ctggctctgccatattacttctgtgtatctaagtcagttactgaact ttgtggccctctggctctccatgtgtaaaatggagaatattaatatt accttgcaagttgtgtgaagactgaaggagagaatttagtaaaaca ttcatcagagtaccatgcacacagttgtcctcaataaacattagctc tctgattgcaagttccagtcataagtgctttatataccagccaataa aaggatgcgagagagatataccagtgtattgtttctaccatttaaac ctatttcatccactgttacaaattctatcatactgctccacataaaaa atattatcaatgatttttagtctctgaagtgcataattttagtattgag cacacctgtgaagtttagttctcacttacatgggtgtgtaaa ggtaggaggataaaaccagtgtcctaggtctaaatcttcttaatgtc atactttggattcattgatataagtaacttgagcaccagcgcttcatt tacttcatttttaaagatatagtaaagtagtattccatctgcctagca aaattgttttagaaaaagttgtggatcagatttattttactttgatt ttaggaattcaagtgtctcgccatgtggatcaggaaaaatgcagtt gacattttctactacttccaggtcattttctactctggcataaaaa accctcaattcctgtctcactccatctaataataggtagcatgctt agcccttactatgtgccaggcactaggataagcactttatgtttgt cccaattaattctcacagcatttctatgcacctaataaaaaatattt tcatttcaccaataataaaatggaggcttcaaaaagtttagggacttgg ctcagctcacacaactggcaaggactgaaaatggattttacttccaaat gtcataggctagagcccttcaactaaactgtgtcttccatctggcgc
	10
	20
	30
	40

【表 15-16】

【表15-17】

	acagaagaaagggtttgagggactcacagttccatgtgactggggagg cctcacaatcatggtgatgatgaaaggcatgtctcacatggaggcaga taagagcatagaacttgtgcagggaaacttcccttattaaaccaccag gtcttgtgagacttcttcactatcacgagaataggatggcaagaccct ccccatgattcaattatctccactgggtccctcccacaacacatggg aattatgggagctataattcaagatgagattgggtgaggacatagcca aaccatatcagcctccttctggctttatgttctccgtgggtgacctc tctcaggctcaagtgataaccaatgtgctgactctcaa atgcgcat ctctggcttcaagttttccttgaacttcatacatatgtttccaaattt cctgcgtgtacctaaggcttgcattacttccaaagcttcataaaa cgcaactcatttttgttattctgtctcccttgcattccctgaga ggcaagtccctggtgagttatatacaactcctcccttgctccaaacctg agagtaagtaacattcatttaacatatttaggaagctgaggcttagaca gttttaagtaactcaagcatggttacacaacttagcttagggcagagctaaa atgtcaggctaggcttctgtgactccaaagcccttctcacttagcata tcatcacttatttttttttaatcacatatatgattttttttttta agagatagaatcttgcttatcacgtggctggagtgca gttggcacaat catagctcaactgtaaccccttgaacttggctcaagtgatcctcgcctt agcctactgagtagctaggctacagacacacaccatgcctagcta attttattttattttattttattttttgagacagagactctcactctgtca cccaggctggagtgcagtggcgcattttggctactggaaacctctgct gccccgggttcaagcgatttcctgcctcagcctcctgagtagctggat tacaggtgcctgccactgtgccagctaattttgtatttttagtagag acggggtttaccatcttggccaggcttgcatttgcactcctgacctcg gatccactcgccctcggcctccaaagtgcgtggattacaggtgtgagcc accacgcctggccacctacctaatttttaattttttgttagagacaggg tctcaactacgttgcctggcaggcttgcatttgcactcctgatc 10 20 30 40
--	--

【表 15-18】

ctcctgcctcgacaccccaagtgcagggattacaggcatgagtcattgc  
cagctgacctgtatatatgattttagtatgtaaatacatatattat  
ttaaatgtaaatataatataatgtgtggagtgatccattgaaatgt  
ttaaacatagttctcagtggtacaactacaggtgattctctttctta  
tttctgggtttctgtgtttccaaatttcttcaaattgtgtcttctgtaa  
tcagaaataaaagttattagtaacaacagtcttccactggtacaagtgc  
ttattggataaaagtcacccacttctaagcatgataactcacaactttagg  
ttaatagccttgcacccatatacatctgatccagccactcaca  
ccattcctgagatataatttggccttgcctaaatcattgtgcatt  
cagatccatcttcctggAACACCTATAACCATTCTTAGTCCTGTGAAA  
tcctacttacatccttcatagcctagcatgtatgtcatttattggta  
agggtgagttgggtttctgtgaatgtactgcatatgacgtgggtgt  
atttcaattgttagcaccagtcattgcaatattaaattcggttgcatt  
ctcccatgttaggtttgaagtagttcttaacacagagattactca  
ataaaatatttattagataaataatgaataaggaaataacaatgcctt  
tgtctcattttaaaatactttcattgttagctaccatataataaaaaaa  
ctaaaaggcagtagtttcagcatgattgttatgtatgccttaaaaga  
attttgaaaacctatgtaccctgacacacttttaagttaacttataaa  
ttttcaacatagtttaagtggggcaatgatgttagttcttgcatt  
ttttaactgcttaagtatgctatacatggatttcttcaaaaccctgaa  
gctgcagttcagtgcatcaatttatggaaaagaaattaatttataaa  
attgggttcttattgtcaagtcaatcagctaaatataacttgcttctgt  
caggaaaagtctgactttaaaatacagataagtaataactattataat  
taattaaatttattaaaattaaaataattaaataattgttaattaaaat  
gccttattccctacttatttgcattttgcattttttatggggagccctttcaagaaaa  
acatgttagattgccttaggtttgaaatctgggtgaaataagataactgccc  
tccttcagttttctgccttgcattttatggggagccctttcaagaaaa

【表 15-19】

		<pre> agt catt ct ct cat gg tc cc tt gt tt gag t cc ag gg tt cc t act cc ag aa agt gca ac gt agt gag act agt act a ct cc ct gcat gg ta agt gaga agg ct gt ct gtataaa at gag gg aagg act cat gag ag gg aa gt ag gt cagg gag aat gat agt tt ct cagg cagg tt aattt tagg aag agt ga a tag a gat cc ct taaa aca ag gt gcat ct gctt cc ct gat caa tctt tagg act gt tt act tt gat tt ga aag acc act at gct a a gct tcc cac ggggg caa tagt gag gg aat tt taaa aagg gaattt act tctt cgt ag ct act tt gt gaa at ga attt cattt ga attt at ct gg ca at ct ct tc at attt at attt ca aca aata attt act taa a gaa at gctt gag ct tct cag agg agg gt gct acc agt gt gat gg agt gaa attt cag attt gg gt tag tg act tt a a gct gt gt gact tt tagt cattt a ct gct gat gtc ac agt c tac ag ct t gaa a gagg agg attt a a a t ct at ct cat gt taa t gct g a a gat taa aata a tagt gt tt at gt ac ccc gctt atagg gaa a gagg gt g tg t a t t c a g t c t t a c t g a a a t t a a a a t c t t a a c t t g a t a t g g g c a a a t a t c t t a g t t t a g a t c a t g t c c t c t a g a a a c c g t a t g c t a t a a t t a t g t a c t a a a g t a a t a a t g t a t a c a g t g t a a t g g a t c a t g g g c a t g t g c t t t c a a a c t a a t t g t a c a t a a a c a a g c a t c t t g a a a a t a t c t g a c a a a c t c a t c t t t a t t t g a t g t g t g t g t g t g t g t g t g t g t g t g t g t g t g t g t g t </pre>
36	エクソン 10	<pre> GAUUUGGGAAUUUUUGAGAAAGCAAAACAAAACAAUACAAUAGAAA AACUUCUAAUGGUGAUGACAGCCUCUUCAGUAUUUCUCACUUCUU GGUACUCCUGUCCUGAAAGAUUUUUCAAGAUAGAAAGAGGACAGU UGUUGGCGGUUGCUGGAUCCACUGGAGCAGGC </pre>
37	イントロン 10	<pre> tctttgttcttactattaagaacttaattgggtgtccatgtctctt ttttttctagttgttagtgctggaggattttggagaaatttcttaca tgaggcattaggagaatgtatgggtgttagtgcttgcataatagaatattg ttccactgataatttactctagtttttatttcctcatatttattttcag </pre>

【表 15-20】

【表15-21】

		tcttaaatgactttatactccaagaaaggctcatggacaatattacc tgaatatgtctctattacttaatctgtacctaataatgaaggtaatc tactttgttaggatttctgtgaagattaaataatataatgttaaagc acatagaacagcactcgacacagagtgagcacttggcaactgttagctg ttactaaccttcccattttcccaaaccttattccaactatctgaat catgtgccccttctctgtgaacctctatcataataacttgcacactgta ttgttaattgtctctttactttccctgtatctttgtcatagcagag tacctgaaacaggaagtatttaatatttgaatcaaataatgagttata gaatcttacaaataagaatataacttctgcttaggtataattgga ggcaagtgaatcctgagcgtgatttgataatgacctaataatgat	10
38	エクソン 11	CUUCACUUCUAAUGGUGAUUAUGGGAGAACUGGAGCCUUCAGAGGUAA AAUUAAGCACAGUGGAAGAAUUUCAUUCUGUUCUCAGUUUUCUGGAAU AUGCCUGGCACCAUUAAAGAAAAAUCAUCUUUGGUGUUUCCUAUGAUG AAUAUAGAUACAGAACAGCUAUCAAAGCAUGCCAACUAGAA	20
39	イントロン 11	aaactatgtaaaaacttttgattatgcatatgaacccttcacactacc caaattatatattggctccatattcaatcggttagtctacatataattt atgtttcctctatggtaagctactgtgaatggatcaattaataaaaca catgacctatgcttaagaagcttgcaaacacatgaaataatgcaatt tatttttaataatggttcattgatcacaataatgcattttatga aatggtgagaattttgttcactcattgtgagacaaacgtcctcaatgg ttatttatggcatgcatataagtgatgtggatcttttaaaaga taccacaaaatgcatcttaaaaataactccaaaaattattaagat tatttaataatttaataataactatagcctaattgaaatgagcattgat ctgccagcagagaatttagagggtaaaattgtgaagatattgtatccct ggcttgaacaaataccatataacttcttagtgcattttgatg cagaggcaaaatgaagatgtcattactcatttcacaacaatattgg agaatgagctaattatctgaaaattacatgaagtattccaagagaaacc	30 40 50

【表 15-22】

【表15-23】

		ggtaaagcaatgtgtatgtattacattagaagatgtgcc tttcaaattcagattgagcataactaaaagtgactctctaatttc
40	エクソン 12	ACAUCCAGUUUGCAGAGAAAGACAAUAGUUCUUGGAGAAGGUGG AAUCACACUGAGUGGAGGUCAACGAGCAAGAAUUCUUUAGC
41	イントロン 12-5'	<p>taactaattattggtagcaagcattgtgtaaatgtcattcatgtaa aaaaaattacagacattctctattgtttatattctgtttctggatt gaaaaaatcctggggtttatggctgtgggttaagaatcacattaa aactataaataatggtatgtatccagattggtagagattggttac tcagaatctgtgcccgtatcttgggtcagtgtattgtttgcctcata gtatagtttactacaatggaaaactctaggattctgcataatactgga cagagaagatgtaaatatctgttagtccatcatagaccctgccactcc aatgtacacaccagctttaggcttggtagataaaacatacatttt caaaattttcatcataatttcataacaaaataggaaggcaaatgt tcacttggcttaaatctataatattaaaataacaggacaaatgcatt taacattgttggggaggaggtcccttagtagaaacactcttggtccaa gcattttaaagctgtcaaagagatgtaaatatagataatgtatgtcaag gagagagcttggttaaactgttaactttcagttaaacaattattgg tgactctgatgtcaaatgtttcaagctttagtgcataacaaaatttt tcactttgttgc当地aaatgtttcaacaaagatcacattgactcattgat gtttggctcccttccctactttctgttgc当地ccaaatgttagaca ggaaaactaaccctaactgagcacctgcaattgcctggtagtattctgt catgtgtactttgtgttatgtatcccttacagctctgcaaagt aagaattgttccctgctttacagaagagatcataagataattggaggc tgttagatgttaacttgccaaaagccatacaggaaaatggtagagtac agtttgaaccaggtcctttgattttacattaaaccatgcttgc当地 ttggaaataactgttaaggcaataatcaatagataacggataattcaca ggcttctaaataatggaaagttgattgtttatctgtgagccaaagta</p>

【表 15-24】

agacttattctaagaattccacaaatttagataagatagatataatggc  
ttctagacatccaacatagaactgagttgttatcagttaaagattt  
ggtttgctgtaaggtgcacacactttaggaaactaaaataattgtct  
gttcttattctgatcagaatgtgtaatgtgttgcagttggatgat  
gaatttcttatttctaattctcataagaaacttgtcatagatgtgaggga  
gagaattaagaacagagtgtgggaagaaaactgtgtacatttgatgg  
atccattatgttagcttgcatactgtctcaaaaataagttacactat  
aaagggttttagactttaaagtttgcattggttttaaaaaat  
ttttaattggctttaaaaatttctaattgtgtgctgaatacaatttt  
cttattacagaagtaccaacaattacatgtataaacagagaatcctat  
gtacttgagatataagtaaggttactatcaatcacacctgaaaaattta  
aatgttatgaagaaattatctcatttctattaatatggaaactgtgtct  
tcatttttattactgttctaaggtaactcaatgttagatttacttgct  
tatggttcatatttagctaaatagtaaaataatatggatatacattt  
tgttgacttactcatactttccttatttggaaactttatgaatatga  
tatagagactgaaactacaaggaacaaaatgcaatataattacagt  
tgtggcagcactgctatcaatttggatagtggtaacacttagaaaaa  
acattttaaaaataattcacataagtaatgtatatttagctgtctc  
tgacattttacagttggaatagttatatttctttgggtgcctcacc  
aaaacccaacatctcaagggcaggaactgtataatttgcattgtat  
tttgagcacatagcatggtacttgcctctaaatagataactatttt  
aatatttttaaggtaatattttaagtgtatgtatggtacagttcag  
tttgtactttgcttagttatgccacttacagtttagcaaaatcacttc  
agcagttcttggaatgtgtgaaaagtgataaaaatctctgcaactta  
ttccttattcctcattttaaaataatctaccatagtaaaaacatgtata  
aaagtgtacttctgcaccactttgagaatagtgttatttcagtgaat

【表 15-25】

【表 15-26】

【表 15-27】

【表 15-28】

【表 15 - 29】

	ttaaatataaagataagagttttaatagatttataataatgttaag agattaaaaactgaaaatagaaggctttattgattgaaattaaag gccaggcatggtggttcatgcctgtaatcccagaattttaggagactga gtggggaggattgctttagccagggtcaagaccgcctggcaacac agtgagacaccgtatctacaaaataattaaaaattagctggcatgg gtgtgtgcctgtatgctaccattaactaaggaggctgaggtggagaa tcgctttagcctgggaggtcaaggctgcctgaactgtgattgtgccat tgcattccagcctggtgccagagagagaccctatctaaataataa ataagtaaataaataaacagcaacaacaaaacactcaaagcaaactg tactaaatttgaattcattctgagaggtgacagcatgctggcagtcct ggcagccctcgctcactctcaggcctcctgacccctgaccccactct ggctgtgcgtgaggagccct.....tagaacagagcacagatgatctaa atataaaaagaactacaaaaatcacagttttaaaaaggtttttgtt tgtttatatatggtgcaaacatttttttagccaaatgttccacc ttgagaaagctatagagattctatgttagtccttagtaccaataatgtt ttaacctgaatgtaccttatcttattcataaactgtgacttttacac tgctgaaacttttttttaagacaatctcactctgtcgtccagtctgg agtgcagcagtggtgtgatcttggctcactgcaacctctacccctgt ttcaagcaattctggtgccctggccacctgagtagttggatcacagg gtacaccaccaggcctggctaatacgatggatattcttagtagagatg atggccacattggccaggctggctgaaactcctggctcaagtgt tctgcctgcctggcctccaaagtgttggattacaagtgtgagccac tgtgcctggcctgaaactcataattttccattaaatattaatctcac ctttccaataattaattgatttcacaagtatttagtcccctataatcat tgaatggctaataaaattttagcaaaacagattaattatctgcccag cagtctgagatttagttttttaaaaatgttattttaaaacattca gctgtgatctggcttctgtgaggtcaatagttctattgagtaaa
	10
	20
	30
	40

【表15-30】

		ggagagaaaatggcagagaatttacttcagtgaaattgaattccattaa cttaatgtggtctcatcacaataatagtacttagaacacacctacag ctgctggaccaggAACACAAAGCAAGGAAGATGAAATTGTGTACCC TTGATATTGGTACACACATCAAATGGTGTATGTGAATTAGATGTGGG CATGGGAGGAATAGGTGAAGATGTTAGAAAAAAATCAACTGTGT	10
48	エクソン 16	UGGCUGCUUCUUUGGUUGUGCUGUGGUCCUUGG	
		tattccatgtcctattgttagattgtgtttatttctgttattaaat attgtaatccactatgttttatgttattgtatccactttgttatt ctcccaagcattatggtagtgaaagataaggTTTTgtttaatgat gaccattagttgggtgaggtgacacattcctgttagcctagtcctcca caggctgacgcaggaggacttgagccaggagttcaggctgttagt gttgcattgttagtgccaccgcactccagcctggacaatatagtg agatcctatatctaaaataaaataaaataatgaaataattgtgagca tgtgcagctcctgcagttctaaagaatatagttctgttagttctgt gaaacacaataaaatattgaaataacattacatatttaggTTTCT tcaaatttttaatttaataaaagaacaactcaatcttatcaatagtga gaaaacatatctatttcttgcaataatagtatgatttgaggtaagg gtgcattgttctaaatgcaaaatattgtattttagactcaagttt agttccatttacatgtattggaaattcagtaagtaactttggctgcca ataacgatttc	20
49	16 イントロン		30
50	エクソン 17	ACUCCUCUUCAAGACAAAGGGAAUAGUACUCAUAGUAGAAUACAGCU AUGCAGUGAUUAUCACCAGCACCAGUUCGUUUUAUGUGUUUACAUUUA CGUGGGAGUAGCCGACACUUUGCUUGCACAGGGAUUCUUCAGAGGUCUA CCACUGGUGCAUACUCUAAUCACAGUGUCGAAAAUUUACACCACAAAA UGUUACAUUCUGUUCUCAAGCACCACUGUCAACCCUCAACACGUUGAA AG	40

【表15-31】

51	17	ttacttaggtctaagaaatgaaactgctgatccaccatcaatagggcctg tggtttgggtttctaatggcagtgcggctttgcacagaggcat gtgcccttggtaacccattgactggcatgcacatgtctcagata ttatagtttatcatatattgttgcctaatttctgtgttagataat tagagtagctgggttgaagaatgtgatgtggactgttagcaga acaagaaggccctatgggtcagtcataccctctttcaaatattgg tctagctctttctggcatcttgcataatatagtattgctcaaa agggcaggagatttgaagtgatcaaggaaatatttttctattgat taagtctttgatgggtagaataatctaattcatgtaactgctcaaa gttatatggtaggggatccaaatgtatttaaaactattttatatc atcatatttgaagtaatagaaagtcaagtagcagaataaaggtaactaa aaattttaaaaactaataaggtaactttgaaagaaatcaattatgttcat tcctcattaaacaaattgcacttaagactgaggttaataaggatttc cccaagttttcatagcaacctgtgagcacttctgttggaggcatt tatggatgaaaagatgagtaaggcacagttccctggagaaggc acaggtgagaggaggatgacacagaaacattgatataagcaagga ataaattccaagactaaaatttcagaaatctaaaaactcaagataag aaaaaccattatatttctggtaacaaaatttcagtttattatcat gttaggaagatcttgcataactcatcaccatcctgtttggagctaag attgccgcatttgcataactcatcaccatcctgtttggagctaag aatttagactcaagatgtctaattaagttgatccattgattttat ttatggaaatctgagacccacagaaggcagggatttgcacatttct agaagagtcaagatgagcgatgaggcacagttggaaagaacatgagcat tgcctgagctctgagttggcgctataagagcagtgcattttggcaagtg actcttgcatttgcatttttttttttttttttttttttttttttt ttcagaagatcttgcataactcatcaccatcctgtttggagctaag catagccaatggaaatcaatataagttccccgtggtccctctgtgg
		10
		20
		30
		40

【表15-32】

	ggttttgttcccacagagggtgcactggccattccacttcttctttcc aagctcctcattcccttaacgcgttcatagttggccaaaccattt gaaatataataaggcaccaggatggttttcttccaccaagcaaattt tcattttctaaacactgtttataaatatcaatggctattttcaattt ttgattatcatgaaaatatacaaataatgttaattaaatatgctaaaga atgtattaataatgttattaaataattcctacatataaggcctttt gcttgggtatgggtgataaaaataatgtggcatgaaccactgacc tctagcaatttataacctagaaaaagagttatgatatgttataagttc ctgtatataagacatgcatatagtattataacagagggtgcaaacaag atgtatcaagtatgtccagaggagagatataccagctggagga aacactgatgcttcttcgcagcagggcatttgagttgagaaaggagg aaacatagatttgacaatgagagctgagggaaaggggttcaggtgg agggaccgcatgtggaaagcagggaggttaggaaagtgttagagtgttt taaagaatagaccagttggctgaaacaggatattgagcagaggaagc ttgtacttaggttaggtgggtgaggccaaattatgcaaggcattaaatata taaacttaggaatttgactttatcctgcagttatgggggtaaatgata tagattcaatatactttatgtacagtattatgttacattttatct aattgtttgttaattcctgtctagacaatgaattcctcaagggcaagg agcatggcttattcacctcagtaatttcagtgccatgtgcctgg tacaaagtggacacttgtatataaccttttaattgaagcaacaagtt gtcaaccttacaaatgtgaatccgtgattcagatgacaggttggaaatgt agattgtctgcgaagagggcagaaagagagatgacaaaggaggacaag acagtggggcaggcagggagagagcagccagggtttcggttagaggt tgtcaaaaaggtatggaaagtgcagggagaaggagacccctatgttata aatacaaatggaagggaaatgtacaaacagtaagttgtcattaaatgc aagggttgcaaaagtaagattgtaaagcaggatgagtgaccacccattcc tgacataattatagtaaaagctattcagagaaattggcggtacttg
	10
	20
	30
	40

【表15-33】

		aatcttacaagaatctgaaactttaaaaaggttaaaagtaaaagaca ataacttgaacacataattattnaaatgttggaaagaaacaaaatt tctaagtctatctgattctattgctaattcttattgggttctgaatg cgtctactgtgatccaaacttagtattgaatataattgatatactttaa aaaatttagtgtttttaggaatttgtca	10
52	エクソン 18	UGGGAUUCUUAAUAGAUUCUCCAAAGAUUAUGCAAUUUGGAUGACUU CUGCCUCUUACCAUUAUUGACUUCAUC	
		taaaaaataagtaccgttaagtatgtctgtattattaaaaacaataac aaaagcaaatgtgatttgcatttttatttgcatttttgcatttttgcatttt gtcctgtctattgcatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttt acataagtttagtaattcaataataagtcagaactgcttacgtggccc aaacctgaggcaatcccacattttagatgtaatagctgtctacttggag tgatttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttt tgaggccacaaaggaccatcttccaaaatcacttggccacaa agtgtgacatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttt ccccaaggccgttatttttttttttttttttttttttttttttttttttttt acttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttt catt tt tt ctgtccctgactgtgatagatgtgatagatgtgatagatgtgatagatgt gaggctgacttt agaaaaaggggagggtggaggagggtggagggtggagggtggagggtgg cataagtgcatt ggtttaaggcacttcctgacttcctgacttcctgacttcctgacttcct agagagcaatgccacagtcactgtgatgtgatgtgatgtgatgtgatgt ataggatgttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgcctt cccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgcctt aaaaggattatcacataagtatgtatataaccacatggcagg	20
53	イントロン 18	taaaaaataagtaccgttaagtatgtctgtattattaaaaacaataac aaaagcaaatgtgatttgcatttttatttgcatttttgcatttttgcatttt gtcctgtctattgcatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttt acataagtttagtaattcaataataagtcagaactgcttacgtggccc aaacctgaggcaatcccacattttagatgtaatagctgtctacttggag tgatttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttt tgaggccacaaaggaccatcttccaaaatcacttggccacaa agtgtgacatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttt ccccaaggccgttatttttttttttttttttttttttttttttttttttt acttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttttgcatttt catt tt tt ctgtccctgactgtgatagatgtgatagatgtgatagatgtgatagatgt gaggctgacttt agaaaaaggggagggtggaggagggtggagggtggagggtggagggtgg cataagtgcatt ggtttaaggcacttcctgacttcctgacttcctgacttcctgacttcct agagagcaatgccacagtcactgtgatgtgatgtgatgtgatgtgatgt ataggatgttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgcctt cccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgccttgcctt aaaaggattatcacataagtatgtatataaccacatggcagg	30

【表15-34】

	tgcaaaaaaccagactgtcagttgcctcatctgaaatgattgacaca aacaatataatttactgtcccaagtgaactttggcatttggatatcct tcagttgtctgtttaaagatataacttagaaggcagctgatggaatatt taaatccatgcgttgaattcatgcattcaaagaaacatgtcctgagtca ctaaatgctgacattgttttcatgttaagagtgtaaataactggtcc caaataataattattacatcagataaaaactggaatgtgaacctctta acttgattgtgaaagtattgccaatggcctcttgcataattttga ggctcacttcagaactcctctggaaggtaattttaaatagtcat tataaattaacattttgacatgtgatggctctcaaattttctt tatgccagttgaatcattctgctcaatttttttaattggatg gagtctcactctgttgcaggctggagtgcaatctggct gactgcaacccacccacccacccctcggttcaagcgattctctcgcatcagcct ccagagtagctggattacaggcgccaccaccatgcctggataattt tgtattattactagagatggggttaccacgttggccaggctggctt gaactcctgaactcctgacctaagtgatccacctgcctcagcctctta aagagctggaattataagggtgagccactgcaccaggccctgtcaact tttaatgctaagattcattgttgcatttgcataatttttttttttttt gtctttatattaatttaccatatttttttttttttttttttttttt aggaagcataatataatgacaatccaaatacagtacaatggtaatt ttgattttgttaataatttacacaggggtccttcaaatttgagctc ctctggttatacttatgtttacctctggttatacttaatttcaacaaa atgaaatttcattctattcatgatattcagaaggcagatctgtgcaca aaataaagcataacctataatttttttttttttttttttttttttt cactctattttctattttttcttttttttttttttttttttttttt ggcaagtccacttaacatgagattaccctcttaacagattttatgt taaaatacaatattgttaccatggtaatgtgcacagcagatctc ggaacttattcatttgcactactgaaattttatacctgttgcatttt
	10
	20
	30
	40

【表15-35】

	tctccccattccctctccctgtcctgttaccatggttctgttct ttgcttcttgagttgagtttgcatacctcatgtaatcttcattct atttctaaacttgacaatgttctgacaaatttgcttccggattggag cactgtatgtgaaaattgaaaatcttggttatttctacagattccca ctatttaccttgagcagacacttatcttgaagggtctcagattgtca cttggtagaatggggatataaacctgataatggcccttcagttctaa agttatcatgttgcataatgtgtcacttatggtaacgggttagaga actggctcactgaacagcatatggatattataaagtggtttttaat cctttctgcagacagttactttactttatttatttatttatttattt gcatgagaaaatatgctccgaaaggtagatagctgcctaaatgacaa gcttgtatttcaagcagaactttctgaatcaaaagactccaagacgaat gcccagcttcaaaaactgtctaaccaaaataatcctaagattcacct tcatactaaaatttatttatttatttatttatttatttatttattt aaaatgtatttatttatttatttatttatttatttatttatttattt tccaaagatcaaagaacaccatgtttcaacttcaaaaatgttatcag tgacctaaacaattttaaaattttcatagagcctatgaaaaatgtact tgcaaatggctactttctgacttaggaatagaatggggagagttatgt ccaacaatgatagactggattaagaaaatgtggcacatatacaccatgg aacactatgcagccataaaaaatgatgagttcatgtcctttagggac atggatgaaattggaaaacatcattctcagtaactatcgcaagaacaa aaaaccaaacaccgcatttctcactcataggtggaaattgaacaatga gatcacatggacacaggaagggaaatcacactctgggactgttgc gggtggggggggggggggatagcactggagatatacctaattgtca gatgacgagtttagtgggtgcagtgcaccagcatggcacatgtatacata tgtaactaacctgcacaatgtgcacatgtaccctaaaactttaagtata	10
		20
		30
		40

【表15-36】

		ataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagttgaggtgtttaagtatgcaaaaaaaaaaaaaaaagaaataaatcactgacacactttgtccactttgcaatgtgaaaaatgttactcaccaacatgtt
54	エクソン 19	UGUUAUUUUUUGUGAUUGGAGCUAUAGCAGUUGUCGCAGUUUUACAACC CUACAUUUUGUUGCAACAGUGCCAGUGAUAGUGGUUUUUUAUGUUG AGAGCAUAUUUCUCCAAACCUACAGCAACUAAACACUGGAAUCUG
55	イントロン 19	acagtgaatgtgcatactcatctgtaaaaagctataagagctattt gagattcttattgttaatctactttaaaaattctgtttaaactt ttacatcatataacaataatttttctacatgcattgttatataaaag gaaactatattacaaagtacacatggattttttcttaattaatgacc atgtgacttcatttggtttaaaataggtatataagaatcttaccacag ttgggtacaggacattcattataataacttatcatgcaattaa acaaggatagtgcattactaaaggttcttggttccaaatga tacttgaccaaatttgccttggcttgcattcagacacccttc ttcatgtgtggagctgccattcgtgtcccccaactctacttgagc tgttaggaaatcacatttgcagtgcacagccttagtgtgggtgcattt caggcaatactttcagtatattctgcttgcatttgcatttgcattt tcaagtacataacttcatttgcatttgcatttgcatttgcattt aaagaaaatttttttagtaagaattaatttagaatttagccagaaaactc ccagtggttagccaagaaagaggaataatattgggtggtaatttttaag ttcccatctgttagccaagtaaaaaaagagggtaactcattaataaa ataacaaatcatatctattcaaagaatggcaccagtgtgaaaaaaagct tttaaccaatgacattgtgatattctatttgcatttgcatttgcattt aggtacaagatattatgaaattacatttgcatttgcatttgcatttgcattt gtttctat

【0232】

【表 15-37】

56	エクソン 20	CAGGAGUCCAUUUUCACUCAUCUUGUUACAAGCUUAAAAGGACUAUGG ACACUUUCGUGCCUUCGGACGGCAGCCUUACUUJGAAACUCUGUJUCCACA AAGCUCUGAAUUUACAUACUGCCAACUGGUUCUUGUACCUGUCAACACU GCGCUGGUUCCAAAUGAGAAUAGAAAUGAUUUUUGUCAUCUUCUCAUU GCUGUUACCUUCAUUUCCAUUUUACAA	10
57	イントロン 20	atgaactcattaacttttagctaaggcattaagtaaaaaatttcaatga ataaaatgctgcattctatagtttatcaattttgatatcttttagtt tagtaattaacaaatttgttggttattattgaacaagtgatttcttg aatttccattgtttattgttaaacaataatttccttgaatcggtata tatatatatatgtatatatatatatatatatatatatatatacatat atatatatagtattatccctgtttcacagttttaaaaaccgatgcaca cagattgtcagatagcaattctgtgattgaaggggaaatatgtcacctc ttcatactcatattggtaagggtcctagctcaaaattaatagattcc taaagagggaaatgaaacatccgcatttacacacacacacacac acacacagagttcccttgcgttaagtttttttttaatctcta ctagataaaatttttatctaattgtgatgtttacacaaagaaaaactg tcacagaaaagaaagacagtgtcacattttcaaaagaaaaagaagaaa agaaaagtgccatgttttcaaatacaaatgttctggattgatgtttagga tcttttagtggaaaacaaagtattcataataagtaaaataaaaatctat gttagttaattttcttaatttaagaatttgaatttctgagtattt atgataagtgttgaataacttcttatgtgacagtgaataactggcag agcaaatgccaatcaatgccaatctgttaggatcttgcatttttagga acagaattctactcaaaccgaaagcaggcatggctggatgtttag ggcctcatggaacaccgagaagggtggccattcgactcttaaagaagc tgcaacaggcacaagagagtctgcagctcttcttgagtctata tctgtcctgggtccattcctttgtgggtgcttcattccttctct ctgaagactggtttctggtctaccaggctatgccacattgacttta	20 30 40

【表15-38】

	tgttagtgtctccattctggcctcctgaattacaggagagttcctctgt acaaactcaaagtctggagagaacagaaaacagcttcctttggctca ggggtccaaactgcagtcactctgctatgaggatagtgggttcacc acctttgttctctcagctagggcagtgaaatgactctatgaaag gaatatacatgggcaggcaaatgtactaatcctcatcagtactgtatt ttaagcaactttaaaaattctttaagttattgaaataagatcaa gaaggctgaattacataatgaagattttaacaattaattcaaacca atataacacatgctataacatggtgagtgtgattgagtctgatttat tagggcaataatcaaaacatttaacaatcattatagtagacaactac caatcaaatcagatgctcagccggagtggatgtggccaccagctatt attatccctggctcaattggtcttcagctgtgttaacttgcaaacatta attaactatctaagccctcatttcctcaagtgtaaatagacacaata atattacctattccataggtgtgggtgaatagtaataatttg tccaaaacacttagtatagtgcctggccatggtaataactaaataat gttatctgacttattttaaaatttatcttcagcttaacccattcaga acagtaataattgggtctagataatctgcctatataatgaaaataatt taatactacatgcagatatagtgttatattgccttctgttagag gaattgcagaaacaaaaattcaattaataagatgaattttctc ccaattgtagaatcttgcacaatttatcatgcattacagatgtaga actcttgattggacttgatagtctaacttataataatttaagaacat tcctcttagagaatttctatggccataactgaacacatgaattttaa ttagctgcctcttagccctaaaaaaaattactgttaatttaacact taagtgttgcctccaggtacagtaatcttttttttttttt tttttgcataagggtaatcttctttccaaatggcagaactgtt agtttctgactgtccggtaatcttctttccaaatggcagaactgtt catgcaattagcaaaggcctcctgcaaaggcacagaacacaccta catcttgcagatgctgttggacactcttccctgctttggctcttt
	10
	20
	30
	40

【表15-39】

		gtaaaggcagctcatctggatacaggatctttccccattgccattc taatatatgttaccgttattacttatagaataatagtagaagagacaaa tatggtacctacccattaccaacaacacacctcaataccagtaacattt ttaaaaaggcaacactttctaattcaatcgctcttgatttaaaa tcctgggtgaataacttactatgcagagcattattctatttagatg ctgtgatgaactgagattaaaaattgtaaaattgcataaaattgaa atgtaaatttaatgtgatatgtgccctaggagaagtgtgaataaagtcg ttcacagaagagagaaaataacatgaggttcattacgtct	10
58	エクソン 21	AGAAGGAGAAGGAAGAGUUGGUUUUAUCCUGACUUUAGCCAUGAAUUC AUGAGUACAUUGCAGUGGGCUGUAAACUCCAGCAUAGAUGUGGAUAGC	20
59	イントロン 21	tcttatcattttaactttatgaaaaaaattcagacaagtaacaaa gtatgagtaatagcatgaggaagaactataaccgtatattgagcttaa gaaataaaacattacagataaattgagggtcactgtgtatctgtcatta aatccttatcttcttccttcatacatagatagccactatgaagatcta atactgcagtgagcattttcacctgtttcattcaggattttcta ggagaaaatacctagggttattgtctgggtcataggattcacccatgc ttaactgagtggtgccaaattgtcctaagtctgttactgatata tccccatcaagagagtacaagaattctcatagctatgtatcttcaacaa cacttgggtctggtagatgtgaagtgattactaaaaatataggaaagc tgcatacataattattggctttgtttcttacattaatttcttcat tcatgttattactcattgtcacctagttttcttcatttaatttcaat tgttaggaatttatgaattatggattgatcatcagctctatacattcaa acataatccctcagtcagtggtggcttatagagtctttgtgaaaaaa gaagcttttaagttataaaagttcaatttattgtctttcttcat tttggctttggatcttgattaaagaactccttcattatgggttc tcaaatttagcagcataacatttcataactatttaatttttca cattatttatgtatgcacccatttttattcctaaagtgtttatcattgc	30 40 50

【表15-40】

		cttctgtcttctgctgataaatattgccacacattgtatactttat tagtgttacaagaccacatttagttgttattctctgtttgg ttttctagaatgcagagccattaatattatagtatgcttatgtctaa taccatatcaggggcacaaa.....aaataagagcagtaaaattgtgc taatcagctactaatatctggaaaggattgagccacaggatcaaagatg gtatctttaaaaatagaagttgagtgaattcggtttcaattttc tttttattcattatatttatttactcatttagtatattcattcatttat tcatgtattgttcaaataatattgggtacttattatgccaagttgt ttttaaaatcacattccaaattcccgtaagtataattttagagatg tatgttttttaaaaaattgaacacccttaaaaattatcaagtcct tttatttctgtatgcattaaagataactttactaaatgttacatgaat agatttataaaggcagataatatttataattcaatataacccttatatg caattatatttccttagcactaaaaatgaatatttaagtaatttatat taaaagtgtattatttaactgcagatgtatgccaatgactaaattgt ttaaagattatagcaaagttttaaaattgtctaatcatgaagagttc acttaaccacccgttgacacataaaattatagttactaaggtag ttcgagagaaagagaagaatcttcagtagtggttgaggtgtggtaca ttttattataatataccggttatacagcattgtgcagtgcgtcatag tagaaataaatttctcttgcattgtcatctattccctgtgtggcttac ataactgagaatttaggtgatcacaataacaggcctatacagagcc catttatataagtctggttattcttcagttaaactttattata tccaattatttcctgttagttcattgaaaagccccgacaaataaccaagt gacaaatagcaagtgtgcattttacaagttatttttaggaagcatca aactaattgtgaaattgtctgcattctaaaaacaaaaatgttg
60	エクソン 22	UGCGAUCUGUGAGCCGAGUCUUUAAGUCAUUGACAUGCCAACAGAAGG UAAACCUACCAAGUCAACCAAACCAUACAAGAAUGGCAACUCUCGAAA GUUAUGAUUAUUGAGAAUUCACACGUGAAGAAAGAUGACAUUCUGGCCU

【表 15-41】

【表15-42】

		atctaagctgacatcagaacacagagttggggctctgtgggtcacct ctagcacttgcatttcctcatgcagtgcattgtgcacgttatgtc atgttcttatggtcttaggtacaagaataatttcttcattttcatt actatacatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc gtcagaatgtgatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc ggtaaggcattcgccaaacctgcatttgcatttgcatttgcatttgc aacatatcattgtttattgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc taggtcaacatctaaatattagaactattcatttgcatttgcatttgc gtatccacttgggtactagatcaaatttgcatttgcatttgcatttgc gagcattatgttttagagatgtgcatttgcatttgcatttgcatttgc ttatgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc gataaaggacttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc tatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc tgaaagtgtgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc tgacaggataaaatatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc tatgtttatggcatggcatggcatggcatggcatggcatggcatggcat 10
62	エクソン 23	UGGGCCUCUUGGGAAAGAACUGGAUCAGGGAAAGAGUACUUUGUUACAGC UUUUUUGAGACUACUGAACACUGAAGGGAGAAAUCAGAUCGAUGGUGUG UCUUGGGAUUCAAUAACUUUGCAACAGUGGAGGAAAGCCUUUGGAGUGA UACCA
63	イントロン 23	caaaaggacttagccagaaaaaggcaactaaatttatattttactgc tatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc tgatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc aaaagatgtctctaaaagttggattctcaaattctggatttgcatttgcatttgc gttcatagcttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgcatttgc ccttggctttgttttaacagcttttttttttttttttttttttttttttttttt cctgacctccaagtttagcaatcgccaggttggagaaatgtttgcgagac

【表 15-43】

【表15-44】

		tttacctttaatttatattacattgcttataataaggaaatattgct aggaataaaatttttaatattctacaattaacaattatctcaatttct ttattctaaagacattgggattagaaaaatgttcacaaggactccaaa tattgctgttagtattgtttcttaaaagaatgatacaaagcagacatga taaaatattaaaatttgagagaacttgatggtaagtacatgggtgttc ttattttaaaataattttctacttgaatatttacaatacaataagg aaaaataaaaagttatttaagttattcatactttcttcttctt	10
64	エクソン 24	AAGUAUUUAUUUUUCUGGAACAUUAGAAAAACUUGGAUCCUAUGA ACAGUGGAGUGAUCAAGAAAUAUGGAAAGUUGCAGAU	
65	イントロン 24	gctgctaactgaaatgatttgaagggtaactcataccacacaaat ggctgatatacgatcattctacacactttgtgtcatgtatgt gtgcacaactttaaaatggagtaccctaacacatacctggagcaacaggt ctttgactggacctacccttaactgaaatgatttgaagggtaact cataccacacaaatgggtgatatggctaagatcattctacacactttg tgtgcattgttctgtgcacaacttcaaaatggagtaccctaaaatac ctggcgacaaagtactttgactgagcctacttctcctcactggta tggctcaaccatcaggccatatggccatggctgctaaata aaataccaaagactgagctgcttataagcaatcttggaggctgagaag tcaaagatcaaggtgccagcaggttgctgtcgagagcatacttc ctgggtcattgtatggtgctttcttgctgtgcctcacataatggaaagg gcaagacctctgggtctttacaatggactaattccatcatga gggcttggctcatgacctaattcacccacatgtcctacattctaa tactatcacctggggtaggatttaacatgatgatggaggagtg gcggggggacacaaatatttagaccatgcattcactcctgaccc aaagttcatgtcttcacatgcaaaatacattcattccatccaaata gcccccaagtcttaacttgcagcatcaactacaaggctaaagtc caaggtttcatctaaatcagctaaatcagcacaacagctaaatcag	20 30 40 50

【表15-45】

		<p>gtagagtggacttaaggtgtgattcctcttagcagattgctctcca  actatgaaattgtgaaatcaaaccattatgtactttcaaaaataatg  gtgaaacaggcacaggctag.....ataagattcttctgagccattat  ctcattctatattacagttaggtggagccatcttacccctcataacta  aattcttagacttctcaagggcaggagacaatcatctgtatatctcttg  gccttcatacactcaggagtacttgccaaaataacattaatgcaca  tttatttgaataattgataagatccaataacttcaataactttgtcatat  ttttatagaatgggtttctatatctcattgcatttcaaactttactt  ttactgtctagcttaaaaaaaaaagccttgactctaatacagccctca  tatttacccaatatctaagaggcttatactccctagtggttacca  ctattttaactccagtattttacttcatactttacctatttgcattt  agtttagtttatgaattcaagagatgaatgaatttccatatgtaa  tttaaaaacccacagttgactatttatgctatctttgtcctcagtt  catgacagagtagaagatgggaggttagcaccaggatgtcataacct  ccatccttatgctacattctatctgtctacataagatgtcataact  agagggcatatctgcaatgtatacatattatctttccagcatgcattc  agttgtgttgaataatttatgtacaccttataaacgctgagcctcac  aagagccatgtgccacgtattgtttcttactactttttggatacctg  gcacgtaatagacactcattgaaagttcctaataatgaaatgaaat  ataaaaacaagttatagactgattttttagctgtcaaggtttaata  gacttttgcataatcaattcaaatggtggcaggtagtggttttttag  attggtatgaaaaacataagcttcagaactcctgtgtttatggtag  atgtcaactgctttagtggactctgtgttatctgaactat</p>	10	20	30	40
66	エクソン 25	<p>UUGGGCUCAGAUCUGUGAUAGAACAGUUUCCUGGGAAAGCUUGACUUUGU  CCUUGUGGAUGGGGGCUGUGUCCUAAGCCAUGGCCACAAGCAGUUGAUG  UGCUUGGUAGAUCUGUUCUCAGUAAGGCGAAGAUCUUGCUGCUUGAUG  AACCCAGUGCUCAUUUGGAUCC</p>				

【表 15-46】

67	25	10	tttcagatgttctgttacttaatagcacagtgaaacagaatcattatg cctgcttcatggtacacatattctattaggctgtcatgtctgcgtgt gggggtctcccccaagatataatgcccagtggaaatgagcata aatgcataattccttgctaagagtcttgcgtttccgaagatagg tttagttcatacaaactcttccccctgtcaacacatgtaaagctt taaatacatggcctaattgtatgccttgcattttgcattccat ttataccataaggcatgtttatagccccaaataaagaagttactggatt ctacataatgaaaaatgtactcattattaaagttttgaaatattt gtcctgtttatattatggatacttagtctacccatgggtgaaaagct gattgtggctaacgctatacaacattatgtgaaaagaacttaagaaa taagtaattaaagagataatagaacaatagacatattatcaaggtaaa tacagatcattactgttctgtgatattatgtgtgttatt 20
68	エクソン 26	ACAUACCAAAUAAUAGAAGAACUCUAAAACAAGCAUUUGCUGAUUGCAC CAGUAAUUCUCUGUGAACACAGGAUAGCAAUUGCUGGAAUGCACAA AUUU	
69	26	30	tctttataacttacttaagatctcattgccttgcattttgataac aatctcacatgtgatagttcctgcaattgcataatgtacaatgttt ttcaaaaatgtatcatacagccatccagctttactcaaaatagctgc acaagttttcacttgatctgagccatgtggtgaggtaatatagt aaatctaaaatggcagcatattactaagttatgtttataataggata atatacttttgagcccttatttggggaccaagtcatacaaaatactc tactgttaagatttaaaaaaggtccctgtgattttcaataactaa atgtcccatggatgtggctggacaggcctagttgtcttacagtctga tttatggtattatgacaaagttgagaggcacatttcatttcttagcc atgatttgggttcaggttagtaccttctcaaccacccctctactgttct taaaaaaaactgtcacatggccaggcacagtggcttacatctgtatccc aatactttgggaggctgaggtgggggattacttgaggccaggaattca

【表15-47】

		agaccagccaggcaacatagtgaggccccatctgtctttattaaaaca aaacaaaactgtcacagcttcttcaagtgatgtttacaaattccctat ggtttagtcacaaggaagttctgaggatgatgtatcacgtcattctgt tcaggctttgagccctggaggtaaatggttcctactgaaggct gttattaccatgattatcactaagcttgaagtaacaattagggggca gactcacaaccccttgcctgccatggacaaggtaagaatctaagtaa agtcccttattgtctgatcttggatttgcacaccgtaaacagccagg aggtgtattaaactcaggcacatcctgaccaatttggattcttaagct tcagatcactgtggaagaggctcaactctttatggctgttagacttac gctcattttctaggttaattataagggacctaataatttggtttcaaag caacttcagttctactaaacccctgaagaatcttccagctgctgag agaaaaatcacaactaatttacagatggtagaaccccttagagcaaaa ggacacagcagttaaatgtgacatacctgattttcaaaatgcaaggct ctggacattgcattcttgcattttatcccttgcctgtccagatctactaa ttctgtccctgctctggctgacctgcctctgtcccagatctactaa
70	エクソン 27	UCAUAGAAGAGAACAAAGUGCGGCAGUACGAUUCAUCCAGAACUGCU GAACGAGAGGAGGCCUUCCGGCAAGCCAUCAGCCCCUCCGACAGGGUG AAGCUCUUUCCCCACCGGAACUCAAGCAAGUGCAAGUCUAAGCCCCAGA UUGCUGCUCUGAAAGAGGGAGACAGAAGAAGAGGGUGCAAGAUACAAGGCU U

【0243】

【表 16 - 1】

表 16 : ADAMTS13 標的配列

SEQ	ID	領域	標的配列	
NO				
71	エクソン 25		GCUCUGUUUCCUGUGGGGAUGGCAUCCAGCGCCGGCGUGACACCUGCCU CGGACCCCAGGCCAGGCGCCUGUGCCAGCUGAUUUCUGCCAGCACUUG CCCAAGCCGGUGACUGUGCGUGGCUGCUGGGCUGGGCCUGUGUGGGAC AGGGUACGCCAGCCUGGUGGCCACGAAGAAGCCGCUGCUCCAGGACG GACCACAGCCACCCUGCUGGUGCCUCCUGGAGUGGUCCAGGCCGG GCCUGCUCUUCUCCCCGGCUCCCCAGCCUCGGCGGUCCUGCCGG CCCAGGAAAACUCAGUGCAGU	10
72	インtron 25		guccuguccuccuuccugucaggcaggcugcugcaggagggguggggcaaa ggcaucuuccucuggaaggacuggcacaaggcacuuggucccuggguug ugugccugggaggccgggaucaggcugggcuggccucuuucucccuggcaaa gcaaaaccuccuuuuuacuacuaucucaaggagaaguaacuugaagg aaccaggcuugugagccccuagccucugggcugcucugcaugugcccc cucuugcuggaucaucugguagcagccugugccugagggugugcuc ugaccuaugcagccccuuccugccugagaaggcuuccaggcugggcc uuggaggacaggguccaccuuaccuccugguccuuccucaggcuugg aagccccggagccugcccugcugggaaucggggaaagcacugcuiaccug ucuc	20 30
73	エクソン 26		UGCCUGUGGCAGGCAGCACCUUGAGCCAACAGGAACCAUUGACAUGCGA GGCCCAGGGCAGGCAGACUGUGCAGUGGCCAUUGGGCGGCCUCGGGG AGGUGGUGACCCUCCGCGUCCUUGAGAGUUCUCUCAACUGCAGUG	40
74	エクソン 27		GGACAUGUUGCUGCUUUGGGCCGGCUCACCUGGAGGAAGAUGUGCAGG AAGCUGUUGGACAUGACUUUCAGCUCCAAGACCAACACGCUGGUGGUGA	

【0244】

【表 1 6 - 2】

		GGCAGCGCUGCGGGCGGCCAGGAGGUGGGGUGCUGCUGCGGUUAUGGGAG CCAGCUUGCUCUCUGAAACCUUCUACA
75	インtron 27	<p>gccaggccuucuccaccuccuuggugcuccaguccuggcagggaggc uggugggugcugcuggggaugggccagucccagugggcaguggaa gauacggagggAACugacugagauggaacugggguuggccagugu cagucugcacgugccagggagggucacaggaugaaugcuauauccuc cuuuuugggaccgugcagcaagauggacggauugggacaugguccaca uccucagucaguccucaggccucugccccacaccaccugccccgccc ccacccuccagccuuucaagggcuuuuaggguuuuguggaagccacug uccucagccuguuucagugcacugguguaagcagacaugcuuguaca ugcaugugcacccacaaggcacaccucaggcagaggauugccaccucagg acuccagccuugccguggccucgauauccucugauagccucucug guuguccugggggcuugccucuccaacagcccagcugccgaagu uggcuuccuagcugguuccagagguuccugccuccccaggugucug ggcuuuaguggcaacagggcuiuagccucugcagagaccuagugcgccg ccuccuugccccagaccugccggcagagagccguguauguguccag ugcacaggcgcugcugggccugccaaaaggccacaagcccacugucac cguucacauugcuucucugcuuuccggccagccccgcccacacaggcau cugccuugaaagaggugcaggagguacaggcagguggggcuuccaguga gcucugaggaacagcaguggccgcuagguguggagccuaucuuugugc caguuucaguguuaaacacucuugcagugugacaucauugaguccuaa agaccacucugcucagugcaugccauuguuuccuucaguuacagaggag ggaaccagagcccagaacauuuuagccuuuugccuaaagucacugggccag gaagugguagaggugggguucagcaggauuugccugggaaaccccaauau ugaccacagugccaugcugccugcagggcucccuggcugugaguuugc cuggccucuggcaccaccggcucugcuggguiuccuauguccu</p> <p style="text-align: right;">10</p> <p style="text-align: right;">20</p> <p style="text-align: right;">30</p> <p style="text-align: right;">40</p>

【0245】

【表 1 6 - 3】

76	エクソン 28	AUGUGACAUGCAGCUCUUUGGGCCCUGGGGUGAAAUCGUGAGCCCCUCG CUGAGUCCAGCCACGAGUAAUGCAGGGGGCUGCCGGCUCUUCAUUAAUG UGGCUCCGCACGCACGGAUUGCACAUCCAUUGCCCUGGCCACCAACAAUGGG CGCUGGGACCGAGGGAGCCAUGGCCAGCUACAUC
----	---------	--

【 0 2 4 6 】

【表17-1】

表17：T S C 1 標的配列

SEQ	ID	領域	標的配列	
NO				
77	エクソン 5		ACCUCUUGGACAGGAUUAACGAAUAUGUGGGCAAAGCCGCCACUCGUUU AUCCAUCUCUCGUUACUGGGUCAUGUCAUAAGACUGCAGCCAUCUUGG AAGCAUAAGCUCUCUCAAGCACCUUUUJGCCUUCUUACUAAAUGUC UC	10
78	イントロン 5		auguuuguaaggauuugaaugaaaugguuuuuauagaguauaguuuucugaa auuuuaggcaacuuuaagcaaggaagcuagauuuuuacuuuuuagaguuu aaaaccuuucuaggcauuuggcuumucucaaauagaauuguuguccagagu ugguacuuaguaaguucucaaauacaucacuauugacuauugaaauaccuu guccaugcaaguaugaaaaauuucgaucagauggguucaauguuacau uauuccaaaccucuugauuuucgucaucguuuuagccuucccucauuuaaa aacauccuggauuaucuuuuuggaaaucccuguuucuaaaauuaucuuuuua gcuaauagaaaauggcuaaaguuucuguuuaccauuuaggaguaugg ucugguugcagcuauuaauuaagacuuuguugauguaaaauucuacuaagu ugcauucuauuuuuugcacuaaaauuagugugcauuuuucuauauagggag ucaaaaucuaaaauagaacuuuaugguuuuaguuuuuacaguggcgugca gccaauacucaggguuauuuuguuuaucuguuuuuaguuuccuggacuuugu uucuaucuauaaaaauagaaaaugugguuuauuaacugccuguacc cacagagacaugaaaaauccaaauaguauuuguuccaggauggcaguac cauuggauucaucugcuacagcaccaugcaaaugauuuuugugucugc caagaaggguaacucuuuuauuaucuccuagaggugggucccaaggaguc acaauuggcaggguaauuaauaaaaacaugcauuuaauucagaaaaauagg aacaguuuuuaacaacuuuauguuuuuuuaacaaauggauugaugagaau	20 30 40

【0247】

【表17-2】

		auaaucuaauuauggauuggugagaaauauaaucuaaauggauugauga gaauauaaucuaaauggauuggugagaaauauaaucuaaauggauugaug agaaauauaaucuaauuuugaggcacaucauuuaguucagauugcaaaac acuuauucuuuuccaaaagaguacguuuuguuuaucuaggauaagucuuc aguuagacuguuaggaaaugaaaucagggcuaguucuuucugcugaga aucauuauauagucucauauuuucauuuucuccuaccaauauuuauu cuuacuggauauctuuccguaaugaaaggcuugaugcuugauguaaaaaau caaaauauuuuaaaacuuuauuucccagacucauagauuuccuauuucuaa uaggaauaauggaugucuuuaccuacauaguagucuuugauuuauauc uuguuucauaaaucugaauuucaucuaccuggcaaacauucaugauuuu auuaugggcaggugagcugcugaguagcuagucagagcugauugag uauccauugguguuuagugucuucaguuagccugaaguuuuuuauuug acuuuaauuuuuaacuguaggcgugcugaaagguuuccauauauaua uuuuuauuuuacuggucucuaaaacugcuuugaagugagccuuuaaguu gacuuguuagugcuaauaugaaauuucuccucaauuaacuucuguuugua guucuuuaaaaauaguaaguuacuugucucaaugugcaguuuuuuuuuu uuuuauuuuacaaaaaguaaguauacuuaggauuugguugaaugaaugaaa cagagcagugcuccuguguuuuguugaaaagcagcuccuuuuguuuuuca uccaacugcuaauaaggcauccuaaggcugcaggacuugggugucc ccaagucaaguugaacucgucucccggaugccuuugcauagguguguu guaaaugguccucacugacucauuacaguagaguugggcucaguguuc uguugagucuguuugaauguuauccuuucaguauuccuuagggauggg aaaugaguacgugaguacaacuugugauuugugauuucucucaguguuuag agccucuucauguacuguacaaugccgauccuggugccagugccugaca gacguuuccuguuuga	10 20 30 40
--	--	---	----------------------

【0248】

【表 17-3】

79	エクソン 6	UGGACACUGACGUCGUUGUCCUCACAACAGGGCGUCUUGGUGUUGAUAC CAUGCUACCA AUGAUUCCACAGUCUGGGAAACAGCAUCUUCUUGAUUUC UUUGACAUUUUUGGCCGUCUGUCAUCAUGGUGCCUGAAGAAC
80	エクソン 10	GUGUGCACUUUCUACCCUUACUCCACGUCUCGGCUGAUGUUGUAAA AUGCCAGGGCAGCUACCUUCAGACUCUGAGUUCCCCAUCGACACGGCUGA UAACUGAACCCACCA
81	イントロン 10	gugucaacuagugugccugcucucuccugcuiucuggugaagcugac ccuuuggucagauuuaguaugugguuggaaaaauucacacugcuau uucaggagucacuuuaaggauccaugauuuagcaaagaaaguuacug uugccucuuagauucaucuugaagucuuugauuuacaaaugcaacuug uucuugauacgcuuuuaauaagaugccuuuuuucuagaugaaaaagcuaa auuuuagcugaacacuggcuaggauuaaaccucuguggaugacuuagc auuccuuugccacugcugauguacu
82	エクソン 11	CUACUCUUUGGAGCCCAUCUAUGGUUUGUGGU AUGACCACUCCUCCAAC UUCUCCUGGAAAUGUCCACCUGAUCUGUCACACCCUUACAGUAAAGUC UUUGGUACAA
83	イントロン 11	uaugucuuagguuggauuugauuaguugguuuuggccugccuuuaugg caggaggagcucucuuuaagaucuaagggaccacuugcuguuguaacu uguuuuugacacuuauugcaaauccuugggcuuucagaauguguaaag ugaaccuaaaaacaaaaagagagagacugaucauagaucccagaaagu uaacucuagcagcuuuauuuauaguauuaguauuaggcugaaaaaaau cggcaguuuuucuaauaguuggcucagugucauauauguucu
84	エクソン 12	AGGUGGAAAAGGAACUCCUCUGGGAACCCAGCAACCUCUCCUCCA GCCCCACUCUGUCAUUCGGAUGACUACGUGCACAUUCACUCCCCCAGG CCACAGUCACACCCCCCAGG

## 【表 18】

表 18 : IMPDH1 標的配列

SEQ	ID	領域	標的配列	
NO				
85	エクソン 14		GAUGAUGGGCUCCUGCUGGCCGCCACUACGGAGGCCCUGGCGAGUAC UUCUUCUCAGACGGGUGCGGCUAAGAAGUACCGGGCAUGGGCUCAC UGGAUGCCAUGGAGAAGAGCAGCAGCAGCCAGAACGAUACUU	10
86	14	イントロン	cugaccuugggccccaccuggcagaucccccacaacccuucaggcc cgcucaugccaccgacuuccccagauggcagccagucccauauggugg uucuggaaacugaggcacagggcuaaguagcagacccaggauugucc cuggggcaucugacucagccagugaggugccugggggaccuuccu gggcgguaucccguuuuugccuuuaagagguggggugggguccucugag cuucaagcugcugggcucagucuu	20
87	エクソン 15		GAGGGGGAUAAAGUGAAGAUCGCGCAGGGUGUCUCGGGCUCCAUCAGG ACAAAGGAUCCAUCAGAAGUUCGUGCCUACCUAUAGCAGGCAUCCA ACACGGCUGCCAGGAUAUCGGGCCCGCAGCCUGUCUGUCCU	30

【0250】

【表 19 - 1】

表19：PKD 1 標的配列

SEQ ID NO	領域	標的配列	
88	エクソン 32	AGGCCUUUGUUGGACAGAUGAAGAGUGACUUGUUUCUGGAUGAUUCUA	10
89	イントロン 32	uuccuagagaaaccucgagcccuggugcaggucacugugucuggug ccggggugugcgggcugcuguccuugcugggugucuguggcuccaug uggucacaccacccggagcagguuugcucggaaagcccagguguccgu gcgugacuggacggggugggcugugugugacacauccccugguacc uugcugac	20
90	エクソン 33	CUGGUGUGCUGGCCUCCGGCGAGGGAACGCUCAGUUGGCCGGACCUGC UCAGUGACCCGUCCAUUGUGGGUAGCAAUCUGCGGCAGCUGGCACGGGG CCAGGCAGGCCAUGGGCUGGGCCAGAGGAGGACGGCUUCUCCUGGCC AGCCCCUACUCGCCUGCCAAUCCUUCUCAGCAU	
91	イントロン 33	cuggggugagaggaggggcucugaagcucacccuugcagcuggggccca cccuaugc	30
92	エクソン 34	UGAAGACCUGAUCCAGCAGGUCCUUGCCGAGGGGUACAGCAGCCCAGCC CCUACCCAAGACACCCACAUGGAAACGGACCUGCUCAGCAG	
93	エクソン 37	UCUUGCUGGAAGCCCUGUACUUCUCACUGGUGGCCAAGCGGCUGCACCC GGAUGAAGAUGACACCCUGGUAGAGAGAGCCGGCUGUGACGCCUGUGAGC GCACGUGUGCCCCGCGUACGCCACCCACGGCUUUGCACUCUCCUGG CCAAGGAAGAAGCCCGCAAGGUCAAGAGGUACAUUGGCAUGCUG	40
94	イントロン 37	ccuggggugcggccugugccccugccaccuccgucucuugucuccaccu cccaccccaugcagcaggacacuccugucccccuuuccucaccucagaa ggcccuuaggguucaaugcucugcagccuuugccggucuccuccua	

【0251】

【表19-2】

		ccccacgcccccacuugcugccccaguccugccaggcccagcucca augcccacuccugccuggcccugaaggccccuaagcaccacugcagugg ccugugugucugccccaggugggguuccgggcagggugugugcugcca uuacccuggccagguagagucuuuggggcgccccugccagcucaccuuc cugcagccacaccugccgcagccauggcuccagccguugccaaagccu gcugucacugugggcuggggccaggcugaccacagggc	10
95	エクソン 38	GCCUCCUGGUGUACAUGCUUUUUCUGCUGGUGACCCUGCUGGCCAGCUA UGGGGAUGCCUCAUGCCAUGGGCACGCCUACCGUCUGCAAAGCGCCAUC AAGCAGGAGCUGCACAGCCGGCCUUCCUGGCCAUCAC	
96	イントロン 38	ggcauccggugcacuggugcugucuuucugggcuuuaaguuuugccuuuagu ccagccagaccuagggacauguggacauguguagauaccuuuguggc ugcuagaacuggagguaggugcugcuggcaucaguaggcagagggagg gacacagguccgugucuugcagugcacaggacgggcccuaugacagaca cugucugccccagaacauccccaggauaaggcugagaagccaggucua gccguggccagcagggcaguggagccauguuccuggucucuggugg ccgcucacucgaggcggcaugggcaguagggcuggagcugug 30	20
97	エクソン 39	UCUGAGGAGCUCUGGCCAUGGAUGGCCACGUGCUGCUGCCUACGUCC ACGGGAACCAGUCCAGCCCAGAGCUGGGCCCCACGGCUGCGGCAGGU GCGGCUGCAGG	

【0252】

## 【表20-1】

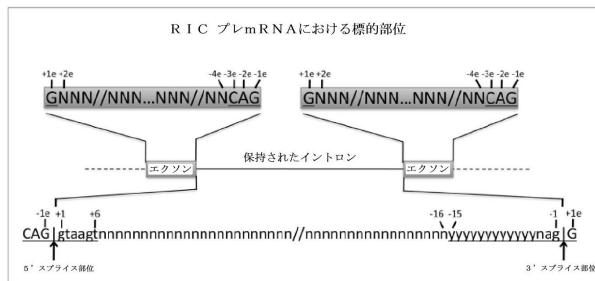
表20：IKBKA P標的配列

SEQ ID NO	領域	標的配列	
98	エクソン 7	AUGAGUCUGCUUUGCCCUGGGAUGACCAUAGACCACAAGUUACCUGGCG GGGGGAUGGACAGUUUUUUGCUGUGAGUGUUUGCCCAGAAA	10
99	イントロン 7	gaaaauauauugcaguuaacaacaauaaaaauuuuuauuuuuauaaaa uuaggaaaaauuuuucuuuucuuuugcuuugaguaggguauuaauaca uaugaggcaaggcaugugcugcuuuaaugugaaaugagguuagaguua gaauuagaagaguccuuugaggccauuugguccauccuccuaccuggug gacacaauuuuguaacaaaauuaucuaauuuggcuauguaaaaccaugg caguuuuuauuuuguaaggcaugguuugaaauaguucugaaauugacaacu uuuaucuaauauguuuuuaaguguguauguguguuugac	20
100	エクソン 8	GGCUCGGAAGGUCAGAGUGUGGAACCGAGAGAGUUUGCUUUGCAGUCAACC AGUGAGCCUGUGGCAGGACUGGGACCAGCCCUGGCUUG	30
101	イントロン 8	ugggagaagaaaccuuuagagaaaauucuuggaaccagaguagagguggug guacacauggauacagaugauacagauguuuguguaacacaaaaggauu uuuacgguuuucuuucauuugguuauaaggcuguaucuaucuuuguuucuuc uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuccugaagucugaauucaacucugaaauaguag auuuuacgcuucuucacagauuucauuguuccaaggccgcauaauuuuu gcauuccuaacucuuaaaaggcugugguuuaaggcaggguaauauauga agccauuguacagagcagaaaaugguguuuagaaggaaaggcccaguuu gcaaggcucuguggggcaaauggugcuuuuguggaaauuaggaaagag ccuccuuccuuggcacaauuuuccuacagcagaggauugcugccaaag gagcaugcaggcuggauucagacccugcucuuuccuuccauucuccu uuggcccaguaccuugugcagguuacaauuuugccugucuauguggcu	40

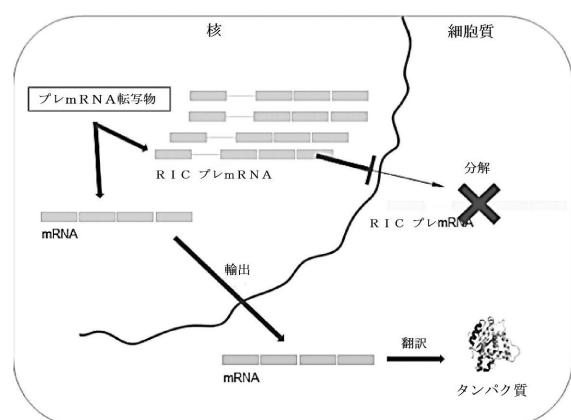
【表 20 - 2】

		gccugauuuuagauagaagauguaucuccucuguuucggugauaucugu uguauguagaccucuuguuucccaccaguaucugaaugguaauuauga uagagcagaagagaaauguauuugaauuaaaaccuagagacaaaaua aauaagaugaggcaauuaagauguuucaacauuuggugaagucuu aaagaccuacuggagcauagaaauuugcugaaguuguauauggaagg agaaaauagauuuugauuuuaggacauuaaccuggaaugguuuagaua acuuauuauuuuaagucauccaaaugcaauguaauuauguaagg uguggcaaauggagccucugugaaaaacaggaaaaggcacucuuucc cugggcaaguacagucccacagugggaugaaccgcucgccgagagaca gggacacaugggauuuuacuuccuuggauaaagauauucauuu guucauucauucauucauguuugcuggaaaaaacucuucuggauuu aucuaauucuuuaguuaggugagcuiucgauauuguaacacuc	
		10	
102	エクソン 9	CCCUUCAGGCAGUUUGAUUGCAUCUACACAAGAUAAACCCAACCAGCAGG AUAUUGUGUUUUUUGAGAAAAAUGGACUCCUCAUGGACACUUUACACU UCCCUUCUUAAAGAUGAGGUU	20

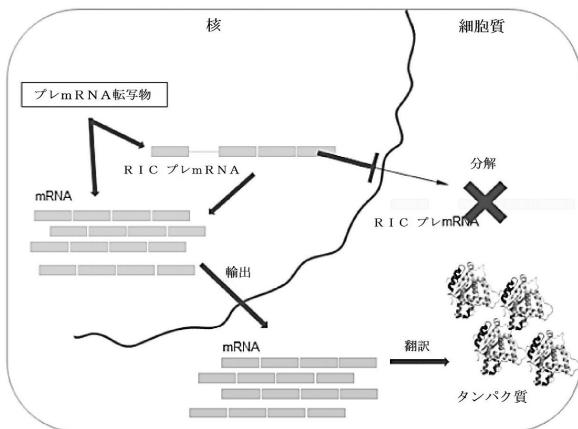
【図1】



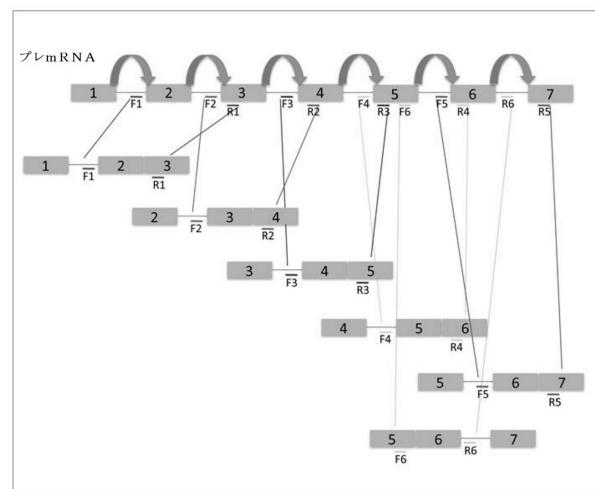
【図2A】



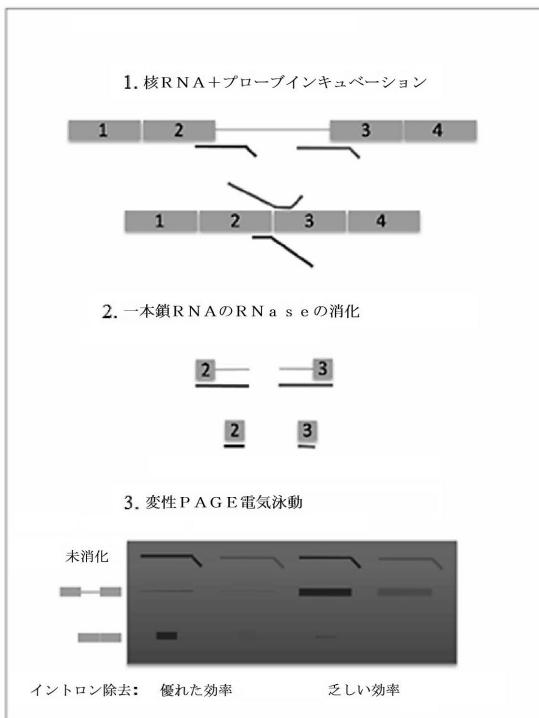
【 図 2 B 】



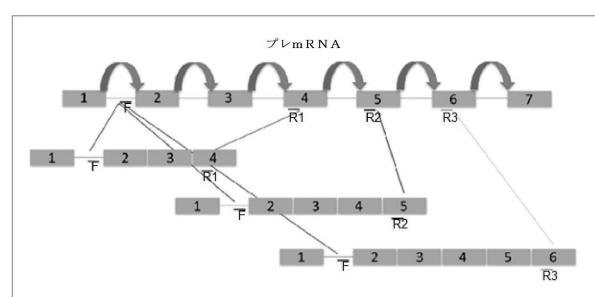
【図3】



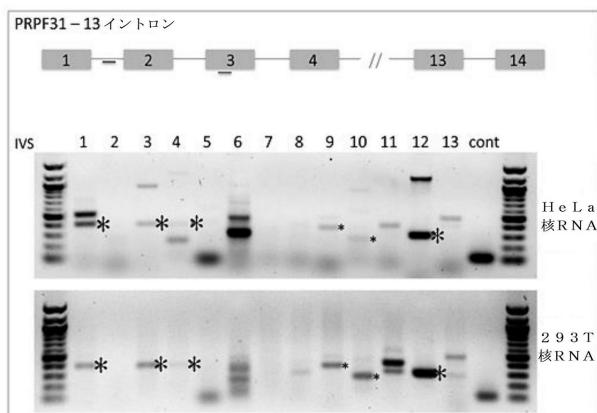
【 四 5 】



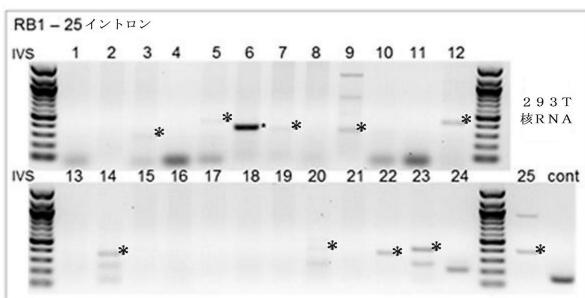
### 【圖 4】



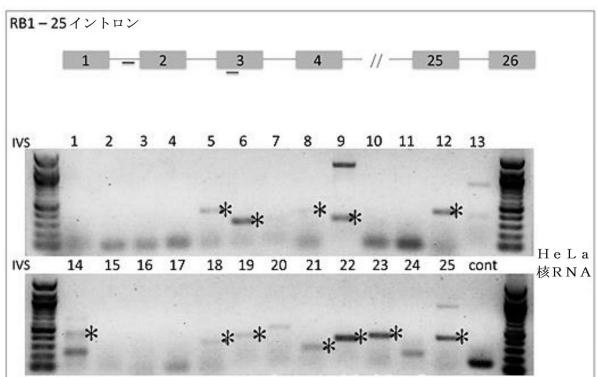
【図 6 A】



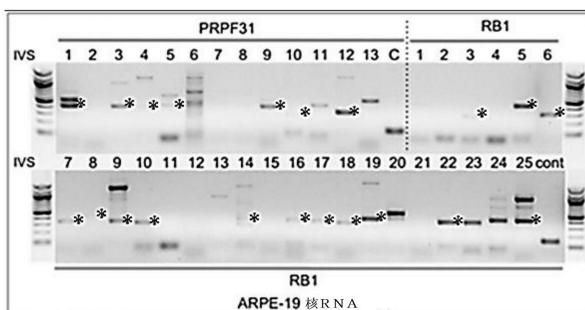
【図 6 C】



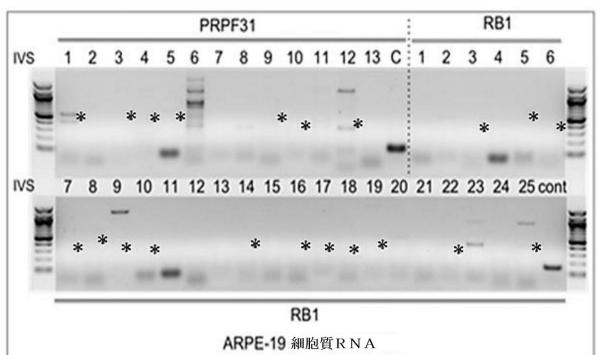
【図 6 B】



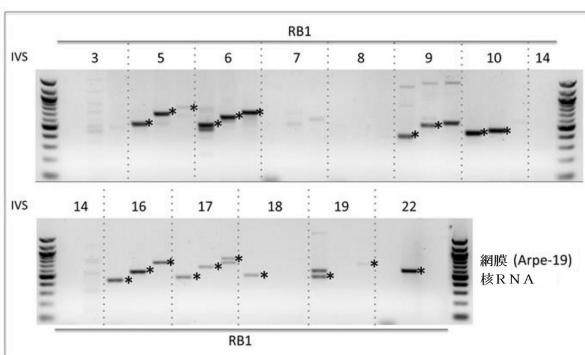
【図 6 D】



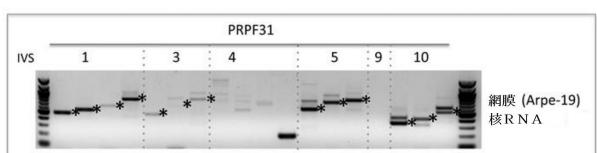
【図 6 E】



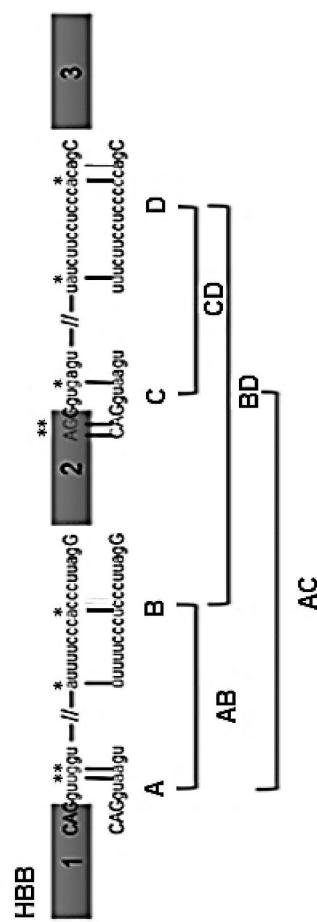
【図 7 B】



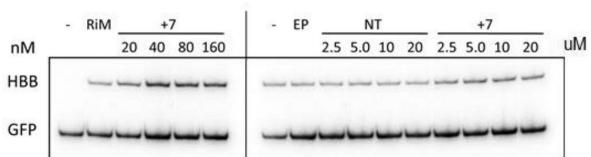
【図 7 A】



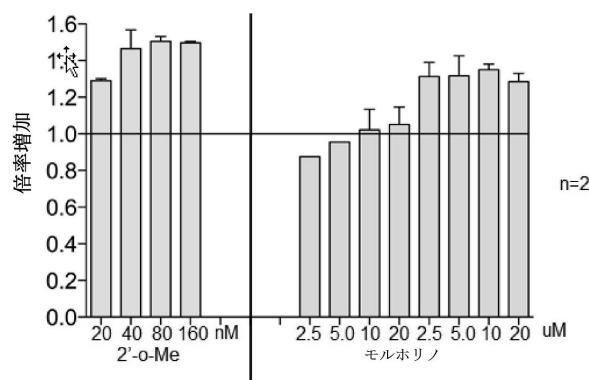
【図 8 A】



【図9B】



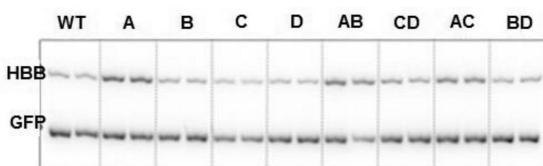
【図9C】



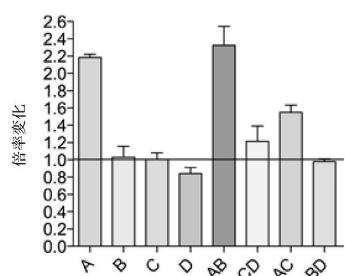
【図 10A】



【 図 8 B 】



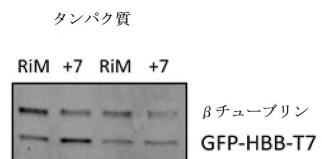
【 义 8 C 】



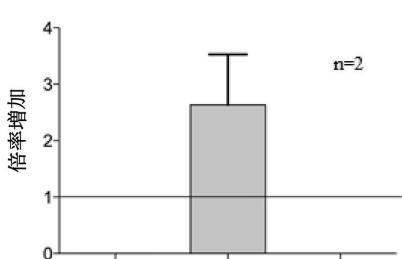
【図 9 A】



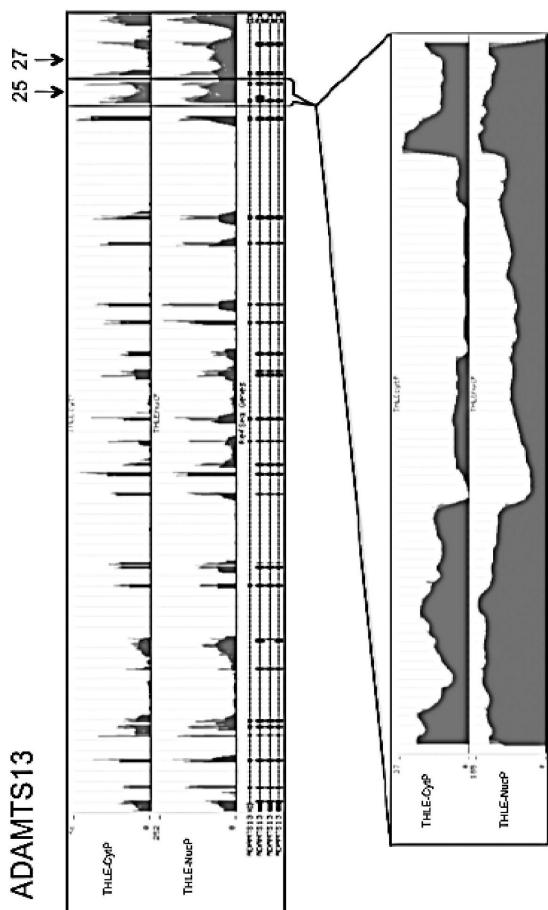
## 【図10B】



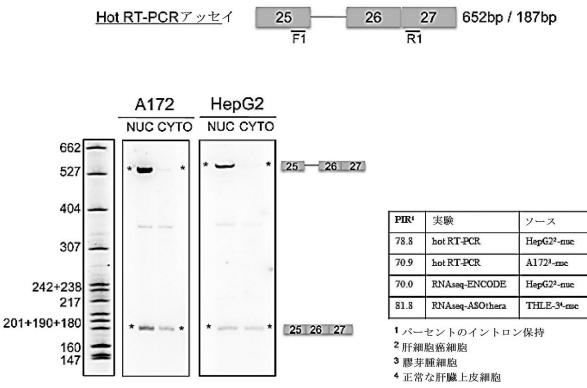
【図 10 C】



【図 1 1】

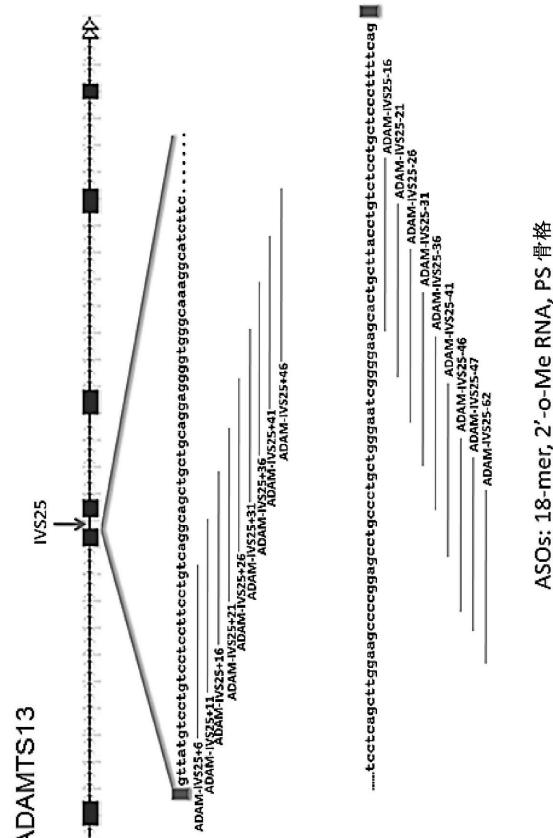


【図 1 2】

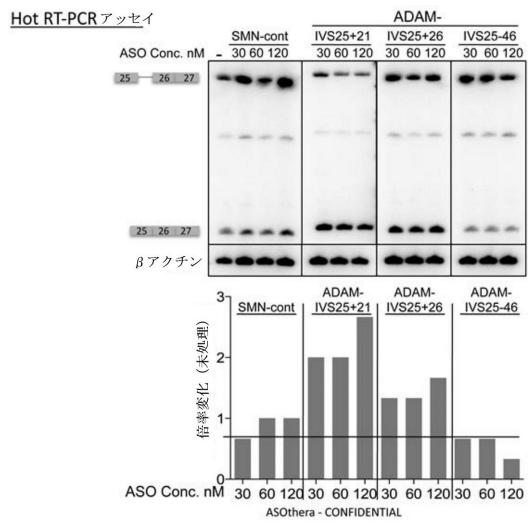


ADAMTS13

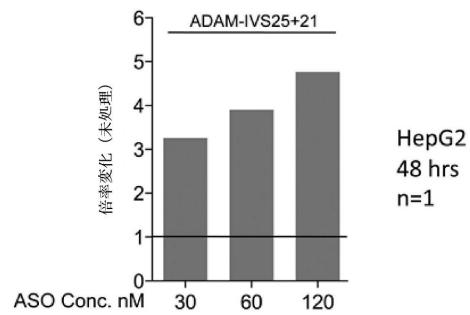
【図 1 3】



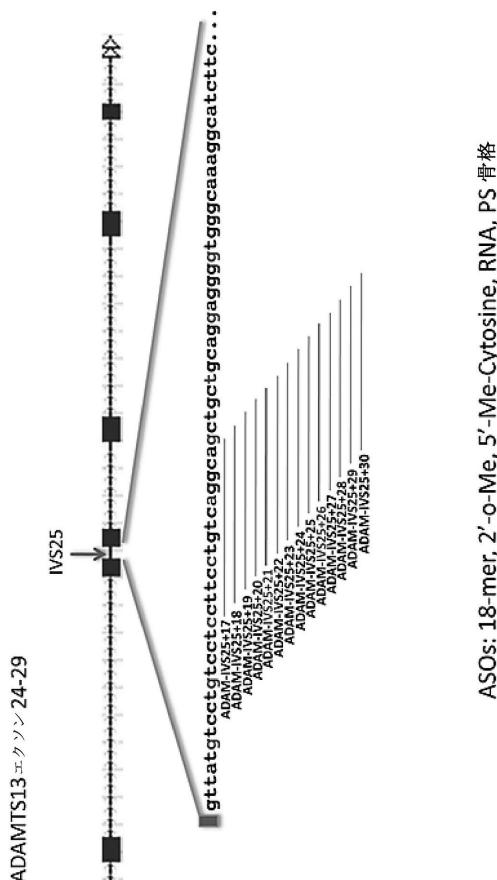
【図15】



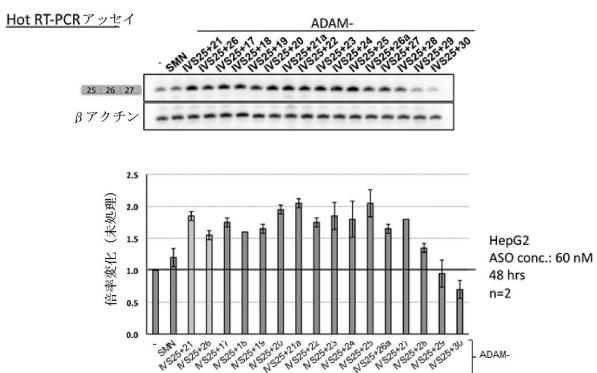
【図16】



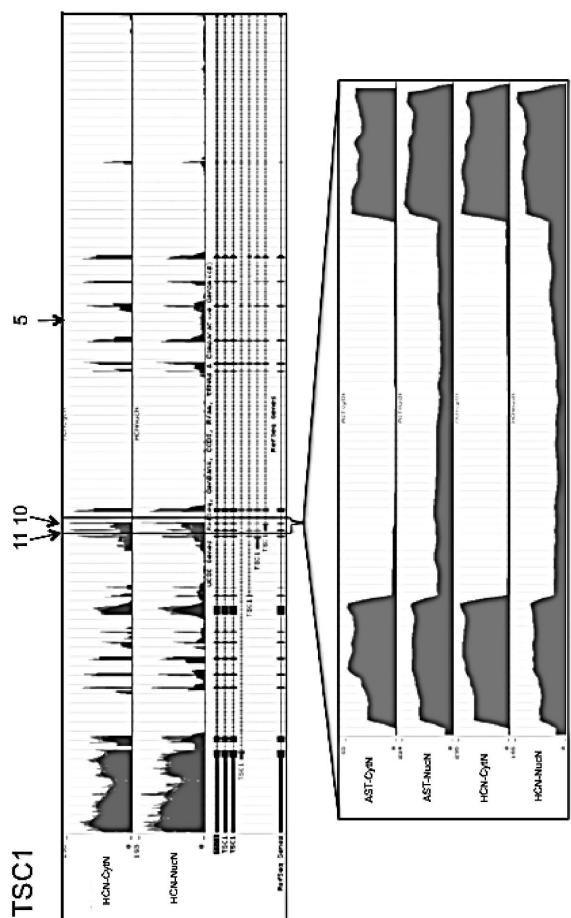
【図17】



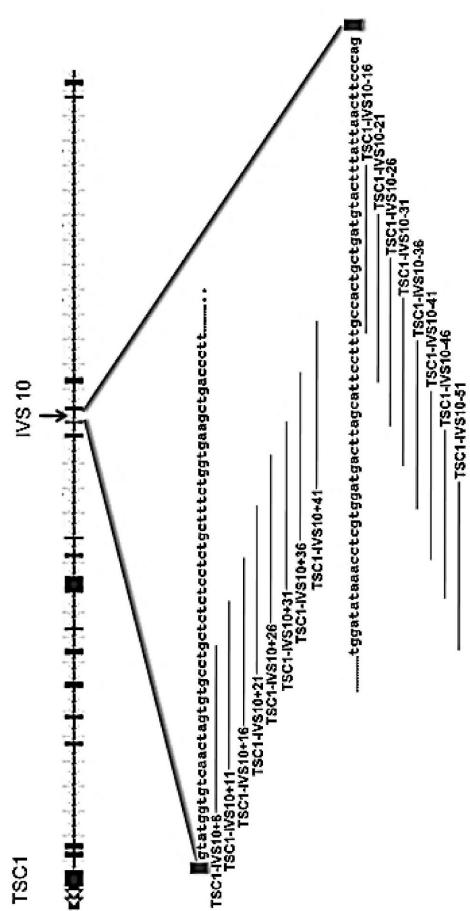
【図18】



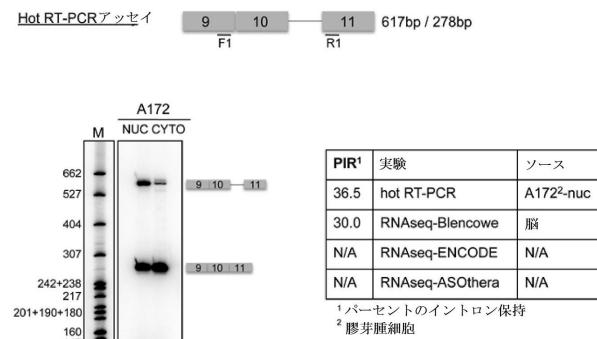
【図19】



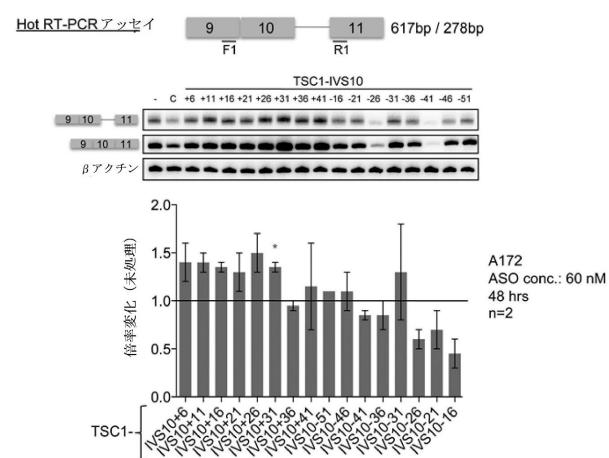
【図21】



【図20】

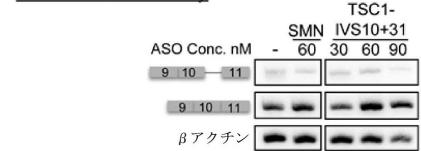


【図22】



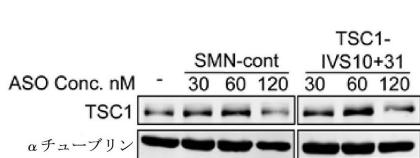
### 【図23】

## Hot RT-PCR アッセイ

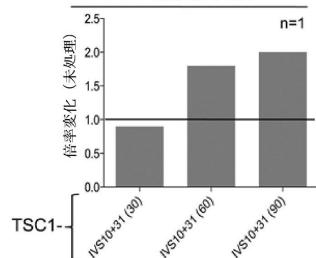


【 図 2 4 】

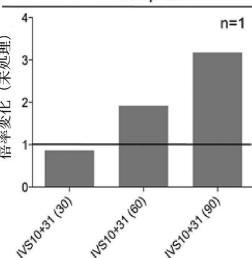
## ウェスタンプロット解析



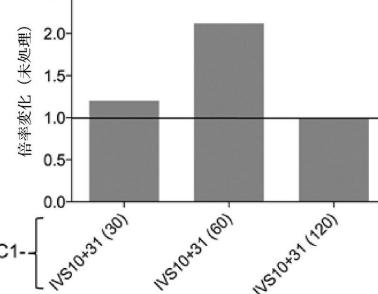
#### Hot RT-PCR



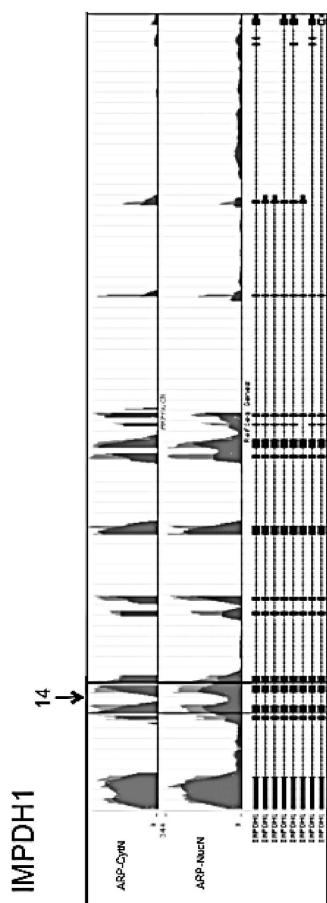
## RT-qPCR



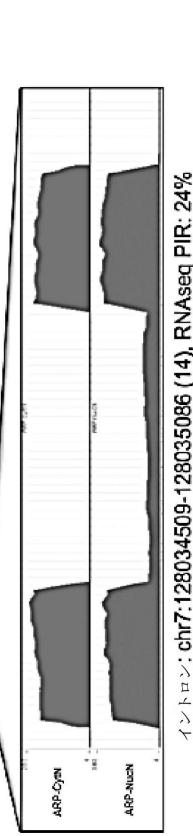
2.3



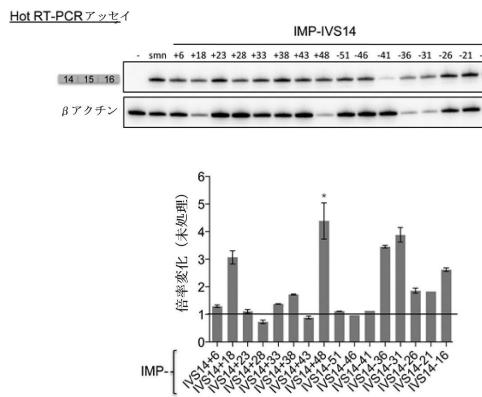
【図25】



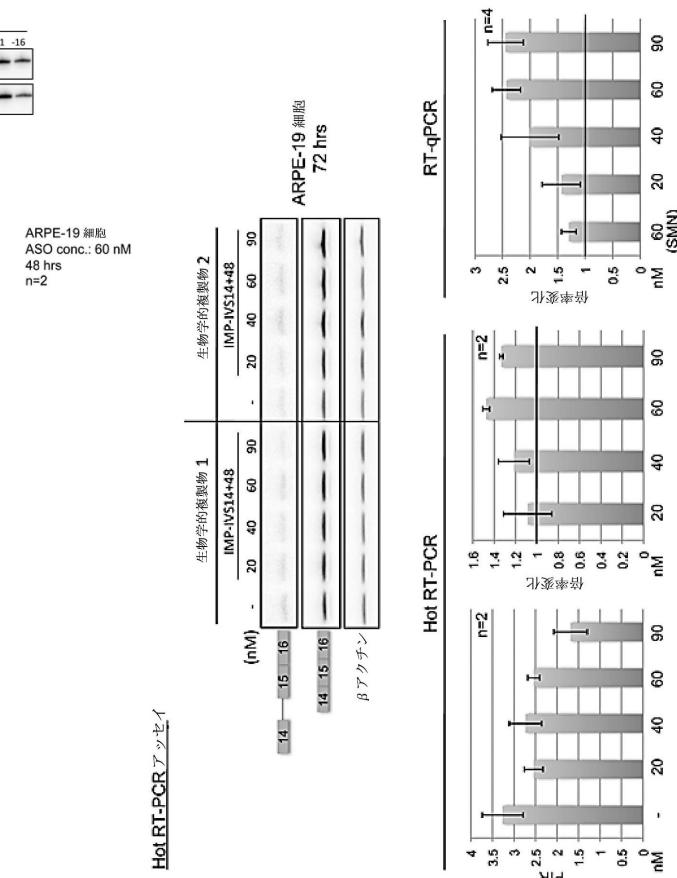
〔 図 26 〕



【図27】

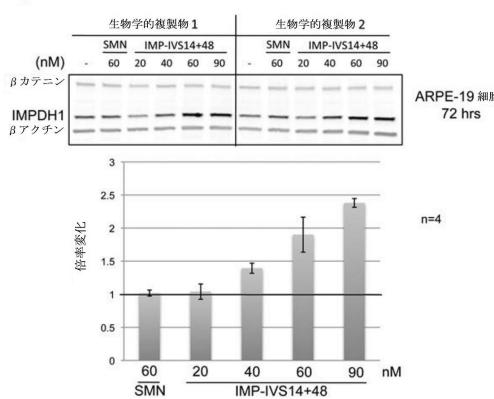


【 図 28 】

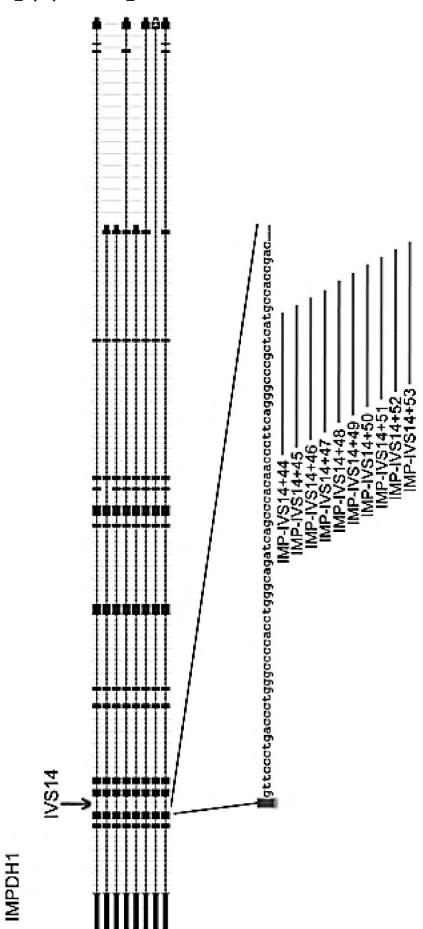


【図29】

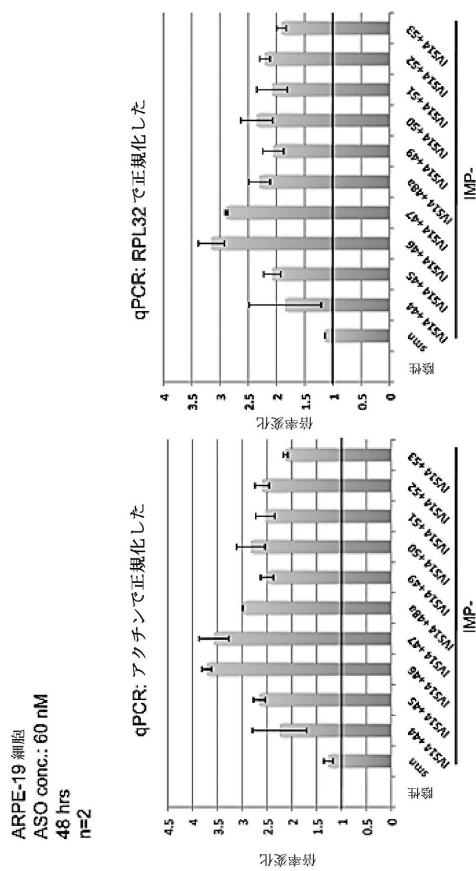
ウェスタンプロット解析



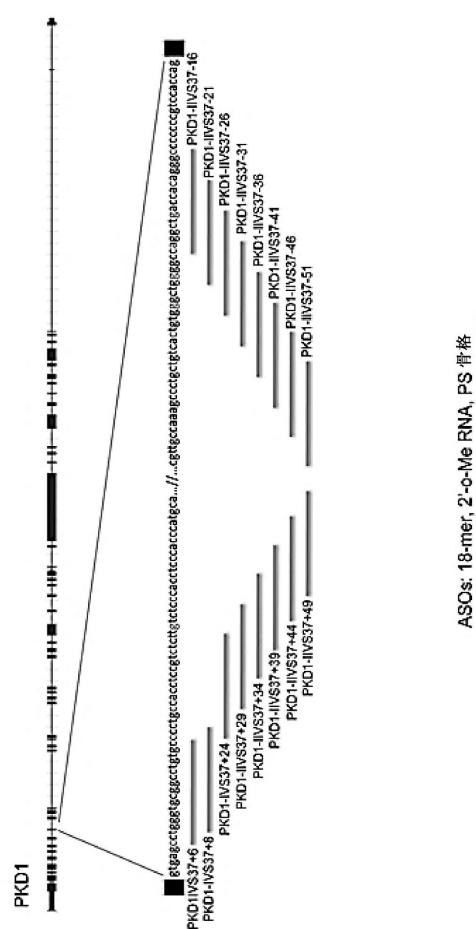
( 図 30 )



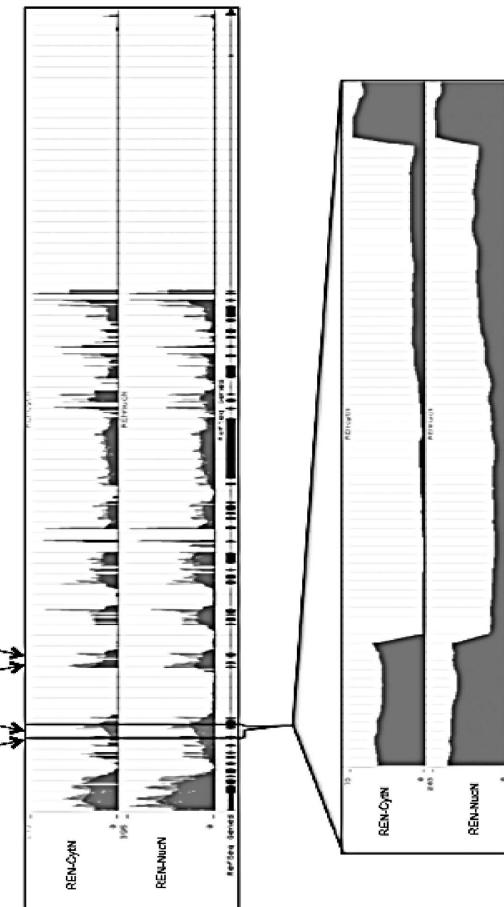
【 図 3 1 】



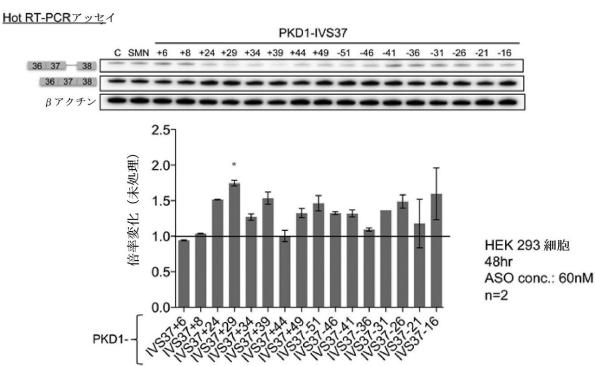
〔 図 3 3 〕



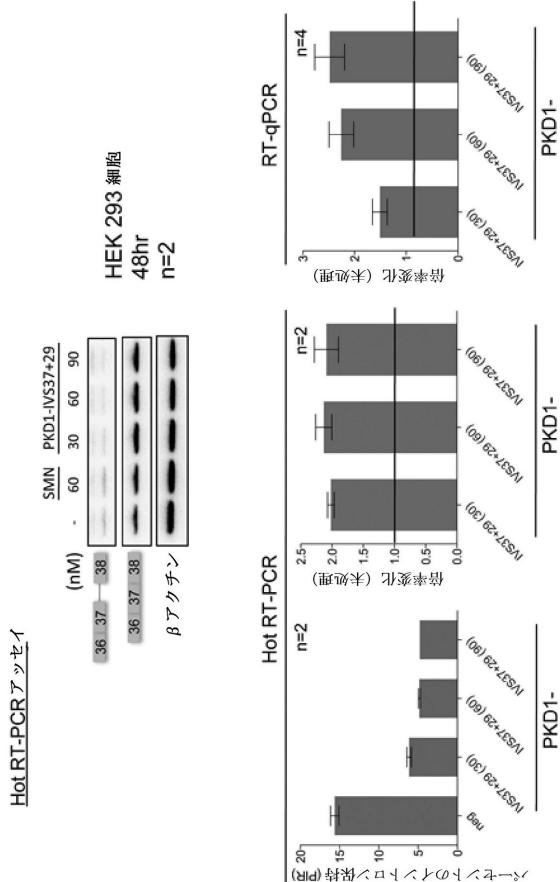
【図32】



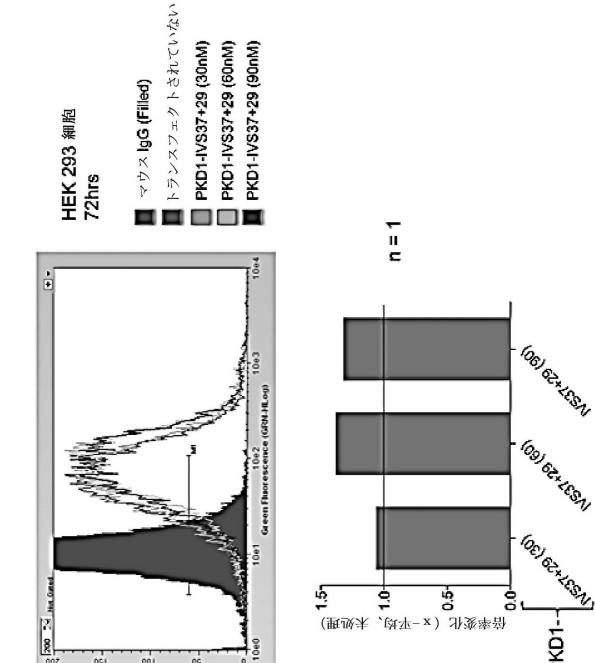
〔 図 3 4 〕



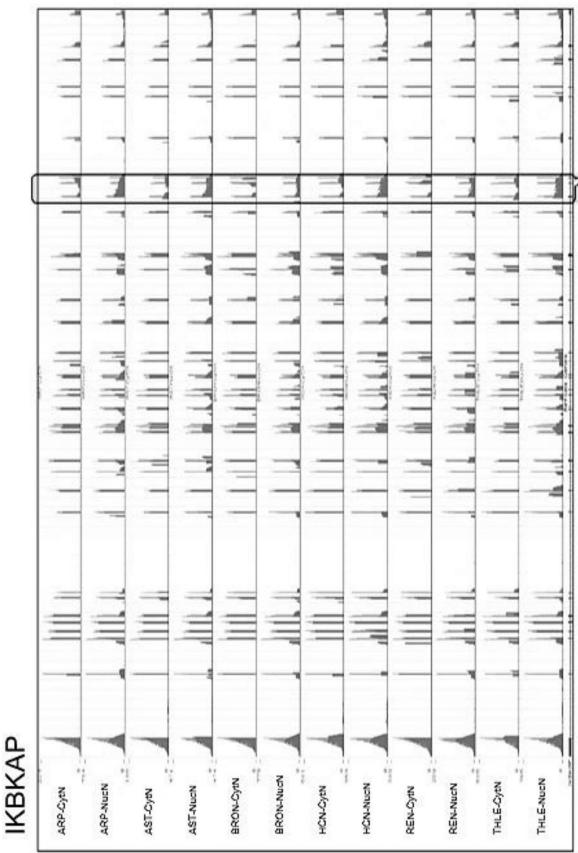
【図35】



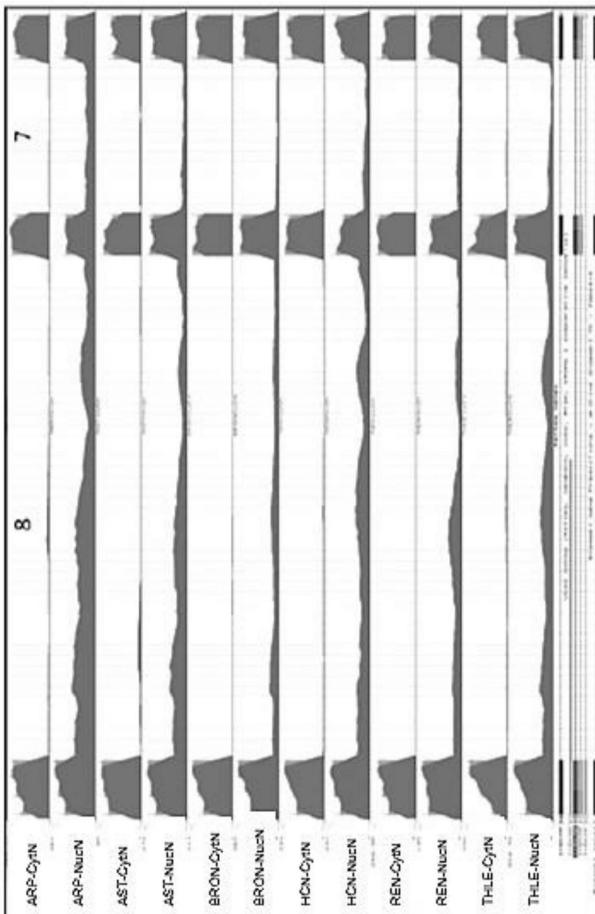
【図36】



【図37-1】

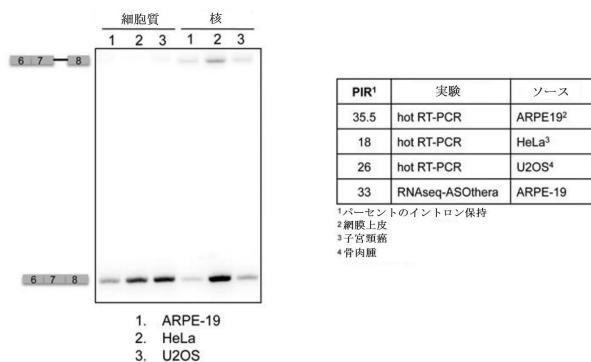


### 【図37-2】

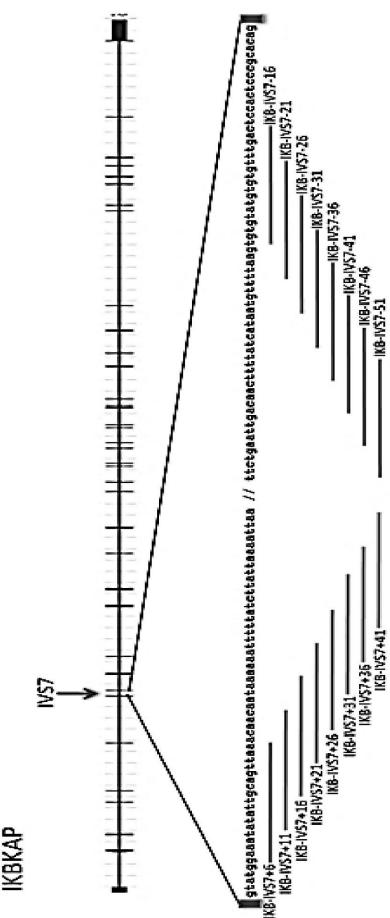


【図38】

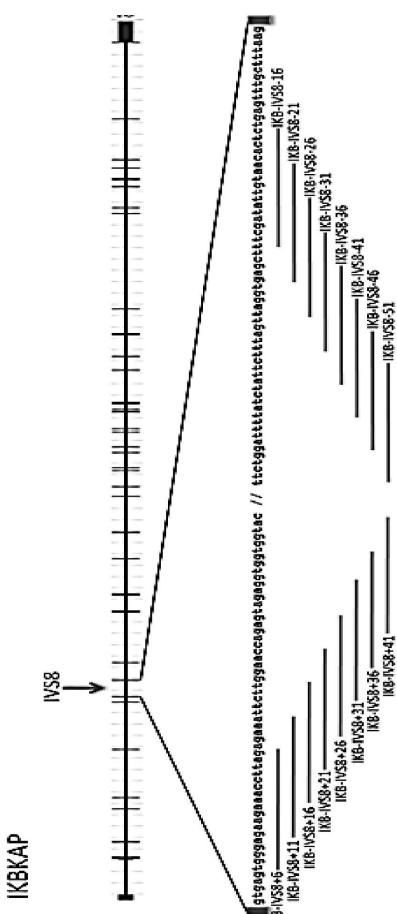
### Hot RT-PCR 分析



### 【図39-1】

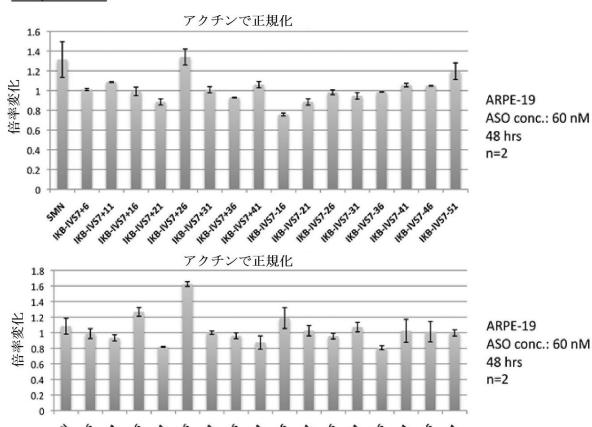


【図39-2】

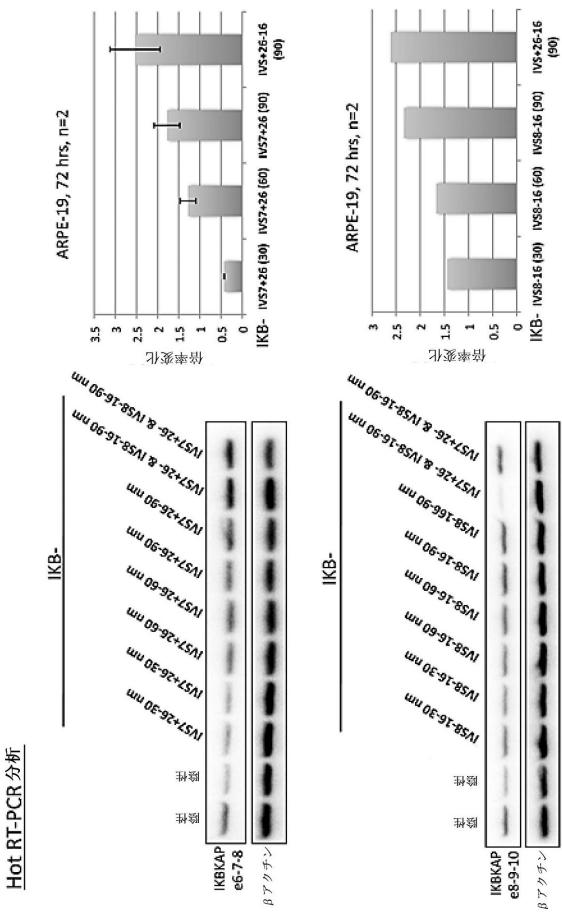


【図40】

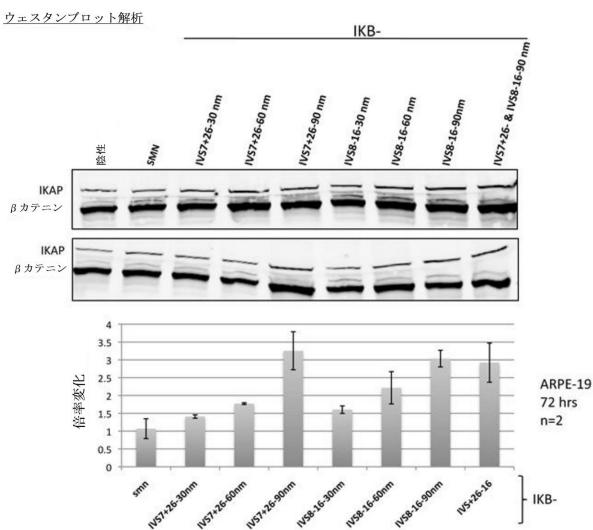
### RT-qPCR 分析



【図41】



【図42】



【配列表】

[0006867945000001.app](http://0006867945000001.app)

---

フロントページの続き

(74)代理人 100122644

弁理士 寺地 拓己

(72)発明者 クライナー,エイドリアン

アメリカ合衆国 11746 ニューヨーク州 ハンチントン・ステーション ホワイト・パイン  
・コート 4

(72)発明者 アズナレス,イザベル

アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 ケンブリッジ マガジン・ストリート 55  
アパートメント 12エー

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 國際公開第2013/106770 (WO, A1)

米国特許出願公開第2014/0128449 (U.S., A1)

SIERAKOWSKA H, SAMBADE MJ, ET AL, REPAIR OF THALASSEMIC HUMAN  $\beta$ -GLOBIN mRNA IN MAMMALIAN CELLS BY ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES, PROC NATL ACAD PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1996年11月, V93 N23, P12840-12844, URL, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8917506>

Nucleic Acids Research, 2017年 6月, Vol.42, No.12, p.8161-8173

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1999年, Vol.274 No.51, p.36193-36199

WIREs RNA, 2013年, Vol.4, p.247-266

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 31/00

A 61 K 48/00

C 12 N 15/00

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )