

(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 I

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)  
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/113 (2010.01)  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088  
 A 6 1 K 48/00 Z N A  
 C 1 2 N 15/113 Z  
 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 1 1 7 2 4 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 プレmRNA) を有し、該RIC プレ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 プレmRNAは、標的タンパク質または機能RNAをコードし；

ASOは、RIC プレ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 プレ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mRNA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、のいずれによっても標的タンパク質または機能RNA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RNAをコードするmRNAが、全長成熟mRNAまたは野生型成熟mRNA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ロ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RNA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RNA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、腎多嚢胞病、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、嚢胞性線維症、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RNAおよびR I C プレ m R N Aが、ADAMTS13、TSC1、PKD1、IKBKAP、IMPDH1、PRPF31、CFTR、RB1、HBG1、HBG2、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 1 5】

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 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 1 6】

細胞が、エスクピ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。

【請求項 1 7】

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 1 8】

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 1 9】

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 1 8 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【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。

【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。これらの方法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 (splicing) 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。

【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プレmRNA (RIPC プレmRNA) 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 (spliced 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、細胞質に続けて輸出され、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、核内のプレmRNAにおけるすべてのイントロンの完全なスプ

10

20

30

40

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（RIC）プレmRNAを結果としてもたらず。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（ASO）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ざることができ、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、該方法は、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み、ここでRIC 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RIC プレmRNAの標的とされた部分に相補的なASOと接触させる工程を含み、それによって、保持されたイントロンは、標的タンパク質または機能RNAをコードするRIC 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、ASO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RIC 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RIC 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



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 かた + 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。

10

【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。

20

【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。

30

40

【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、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、

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、RIC 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ロ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、ホスホロ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。

10

#### 【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 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。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。

20

#### 【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 RIC プレ mRNA の集団を含むことができ、ここで、RIC 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、RIC 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、RIC 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。

30

#### 【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 RIC プレ mRNA の集団を含み、ここで、RIC 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、RIC 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、RIC 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。

40

#### 【0024】

前の方法では、疾病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、腎多嚢胞病、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、嚢胞性線維症、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

50

症。関連する実施形態では、標的タンパク質およびRIC プレ mRNA 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、IKBKAP、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RIC プレ mRNA 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、細胞はエスキボにある。

【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 - 3 e から - 1 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 + 1 e 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】

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 RNA に関係する被験体の疾病を処置するために、細胞によって標的タンパク質または機能 RNA 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 RNA 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 RNA 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) 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 RNA は、(a) 不足した RNA；または (b) 被験体において不足した機能 RNA を機能的に増強または交換する、補償機能 RNA であり、ここで、RIC プレ 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、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 RIC プレ mRNA 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 RNA の生成または活性を増加させる。

【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 RNA 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 RNA 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 mRNA (RIC プレ mRNA) を有し、RIC プレ mRNA は、標的タンパク質または機能 RNA 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 RNA をコードする RIC プレ mRNA 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 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。

## 【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、腎多嚢胞病、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、嚢胞性線維症、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。ADAMTS 13、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。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。

20

## 【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。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。

30

## 【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。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。

40

## 【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。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

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は意図されていない。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

、すべての構成要素が標識付けされてはいない。

【 0 0 4 4 】

【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 m R N A 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、- 3 e から - 1 e 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、- 1 5 から - 1 および + 1 e (「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。A S O 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 - 1 6 (右の矢印) までのヌクレオチドを含む。実施形態では、A S O 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 + 1 0 0 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 - 1 6 から - 1 0 0 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 + 2 e から - 4 e 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 + 2 e から - 4 e 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 2 A】図 2 A は、核内遺伝子出力の標的とされた増強 ( T a r g e t e d A u g m e n t a t i o n o f N u c l e a r G e n e O u t p u t ) ( T A N G O ) のアプローチの略図を示す。図 2 A 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 m R N A 転写は、m R N A を生成するためにスプライシングを受け、この m R N A 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 m R N A 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 2 B】図 2 B は、核内遺伝子出力の標的とされた増強 ( T A N G O ) のアプローチの略図を示す。図 2 B 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 ( A S O ) による処置は、イントロン 1 のスプライシングを促進し、m R N A の増加を結果としてもたらし、m R N A 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、R T - P C R 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 F 1 と R 1、F 2 と R 2、F 3 と R 3、F 4 と R 4、F 5 と R 5、および F 6 と R 6 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、R T - P C R 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

10

20

30

40

50



ースプライマーは、「R1」、「R2」、または「R3」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RNA-seq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、イントロンは介入線（intervening lines）を示す。フォワード（「F」）また、リバーズ（「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%のエチジウムブ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。

10

【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、イントロンは介入線を示す。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%のエチジウムブロマイド染色したアガロースゲル中で分離された。

20

【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%のエチジウムブ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：介入配列（イントロン）。

30

【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%のエチジウムブ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%のエチジウムブ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：介入配列（イントロン）。

40

【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）にもたらしする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

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8B】図8B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8Bは、野生型(WT)および変異体のHBBレポーターの放射性RT-PCR産物の代表的なゲルを示す。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。

【図8C】図8C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8Cは、GFPに正規化されたHBB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 HBB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。

10

【図9A】図9Aは、実施例3に記載されるように、HBB I V S 1' 5スプライス部位のすぐ下流のASOを標的とする配列がHBB mRNAを増加させることを示している。図9Aは、HBB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 ASO(「+6」)を示し、灰色の線はI V S 1 + 7 ASO(「+7」)を示す。黒色の線は、HBB転写物のPCR増幅に使用されるフォワード(「F」)またリバー(「R」)プライマーを示す。

【図9B】図9Bは、実施例3に記載されるように、HBB I V S 1' 5スプライス部位のすぐ下流のASOを標的とする配列がHBB mRNAを増加させることを示している。図9Bは、示された濃度での、未処理(-)、模擬処理された(RiM、RNAiMAXまたはEP、EndoPorter)、非標的(NT)、またはI V S 1 + 7 2' - O - Me(ゲルの左の部分)またはPMO(ゲルの右の部分)のASOで処理された、野生型HBBレポーターの放射性RT-PCR産物の代表的なゲルを示す。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。

20

【図9C】図9Cは、実施例3に記載されるように、HBB I V S 1' 5スプライス部位のすぐ下流のASOを標的とする配列がHBB mRNAを増加させることを示している。図9Cは、GFPに正規化されたHBB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 - Me ASOによる処置に対応し、オレンジ色のバーは、I V S + 7 PMO ASO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。

30

【図10A】図10Aは、実施例4に記載されるように、HBB 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 - Me ASOを標的とする配列がGFP-HBB-T7タンパク質レベルを増加させることを示している。図10Aは、U2OS細胞のゲノムに統合されたGFP-HBB-T7レポーター遺伝子の略図を示す。「GFP」と標識された長方形はGFP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HBBエクソンを示し、介在線はイントロンを示し、および「T7」と標識された長方形はT7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 ASOを示す。

【図10B】図10Bは、実施例4に記載されるように、HBB 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 - Me ASOがGFP-HBB-T7タンパク質レベルを増加させることを示している。図10Bは、50nMの濃度での、模擬処理された(RiM、RNAiMAX)またはI V S 1 + 7 2' - O - Me ASOで処理された、野生型GFP-HBB-T7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、4-20%のSDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離された。GFP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。

40

【図10C】図10Cは、実施例4に記載されるように、HBB 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 - Me ASOがGFP-HBB-T7タンパク質レベルを増加させることを示している。図10Cは、2つの生物学

50

的複製物から チューブ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 1 1】図 1 1 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取密度を示す。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 . アイス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 ( 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。T H L E - 3 細胞におけるイントロン 2 5 に対する読取密度は、下の写真に詳細に示される。

10

【図 1 2】図 1 2 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証を示す。図 1 1 に示される生物情報学的予測を確証するための放射性 R T - P C R アッセイの略図は、図 1 2 に描写される。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 ( 「 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tron - 2 5 保持に関する定量化の概要は、右の表に示される。

20

30

【図 1 3】図 1 3 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 1 4】図 1 4 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 の結果を描写する。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 1 3 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。

40

【図 1 5】図 1 5 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

50

た、S M N対照処理された、A D A M - I V S 2 5 + 2 1 処理された、A D A M - I V S 2 5 + 2 6 処理された、またはA D A M - I V S - 4 6 処理された、H e p G 2 細胞からの放射性R T - P C R A D A M T S 1 3 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A D A M T S 1 3 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、A D A M - I V S 2 5 + 2 1 およびA D A M - I V S 2 5 + 2 6 A S OによるH e p G 2 細胞の処置から結果として生じるA D A M T S 1 3 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、A D A M - I V S 2 5 + 2 1 処理された、またはA D A M - I V S 2 5 + 2 6 処理された、H e p G 2 細胞からのA D A M T S 1 3 タンパク質生成物を示す。タンパク質生成物は、8 %のS D S - ポリアクリルアミドゲル上で分離された。A D A M T S - 1 3 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。下記の棒グラフは、チューブリンに正規化された、A D A M - I V S 2 5 + の2 1 処理された細胞からのA D A M T S - 1 3 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。A D A M - I V S 2 5 + 2 1 は、用量依存的様式でA D A M T S 1 3 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 - M e および5' - M e - C y t o s i n e A S Oを使用して、A D A M - I V S 2 5 + 2 1 およびA D A M - I V S 2 5 + 2 6 A S Oの領域において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 m i c r o w a l k のグラフ表示を示す。A S O 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A D A M - I V S 2 5 + 2 1 およびA D A M - I V S 2 5 + 2 6 の領域を標的とするA S O - m i c r 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、H e p G 2 中の60 n Mの濃度での(図17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2' - O - M e、5' - M e - C y t o s i n e A S O 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。2つの独立した実験からの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、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、I V S 2 5 2' - O - M e A S O A D A M - I V S 2 5 + 2 1 およびA D A M - I V S 2 5 + 2 6 を示す。

【図19】図19は、実施例13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、T S C 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、H C N (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T S C 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、T S C 1 遺伝子のすべてのr e f s e q . アイス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10に対する読取密度は、H C N 細胞およびA S T M (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

測を確認するための放射性 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 (「F1」) およびリバー (「R1」) 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 A172 (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、A172 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認した。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。

10

【図 2 1】図 2 1 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 2 2】図 2 2 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、A172 細胞中の 60 n M の濃度での、図 2 1 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。

20

【図 2 3】図 2 3 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、A172 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 結果を確認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。

30

【図 2 4】図 2 4 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 A172 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、A172 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。

40

【図 2 5】図 2 5 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)

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取密度を示す。このパネルの下部に、IMPDH1 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トロン14（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ず。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14に対する読取密度は、ARPE19細胞に対する下の写真に詳細に示される。

10

【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エクソンイントロン構造は、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、イントロン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60nM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標的のイントロン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。

20

【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。ARPE19細胞からの IMPDH1（保持され正しく切り出されたイントロン-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トロン-14）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）。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。

30

40

【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。ARPE19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

50

y t o s i n e A S Oを使用して、I M P D H 1 I V S 1 4 + 4 8 A S Oの領域における I M P D H 1 I V S 1 4を標的とする配列のために実行されたA S O m i c r o w a l k のグラフ表示を示す。A S O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。I M P D H 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m i c r o w a l kから結果として生じるM P D H 1発現レベルの増加を示す。R T - q P C Rは、A R P E - 1 9細胞から抽出された全RNA上で実行され、A R P E - 1 9細胞は60 n MのA S O濃度で処理された。I M P D H 1遺伝子のC t値は、c t値の アクチン(左)およびR P L 3 2(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。m i c r o w a l kは、I M P D H 1転写物レベルをさらに増加させる2つの追加のA S Oを同定した。

【図32】図32は、実施例26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、RNA配列決定(R N A s e q)を使用するP K D 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、主要なヒト腎上皮細胞(R E N)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、P K D 1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、R E N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 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P K D 1 I V 37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、一続きの4つのグアニンがA S O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。P K D 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、H E K 2 9 3(ヒトの胚腎上皮)細胞における60 n Mの濃度での、図33に記載されている、模擬処理された(C)、S M N対照のA S O処理された、または2'-O-Me A S O標的のイントロン37で処理された、P K D 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P K D 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、P K D 1 m R N Aレベルの最も高い増加につながるA S O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、P K D 1 - I V S 37 + 29 A S OによるH E K 2 9 3細胞の処置から結果として生じる用量依存的様式でのP K D 1遺伝子発現レベルの増加を示す。H E K 2 9 3細胞からのP K D 1(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。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P K D 1 - I V S 37 + 29 A S O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(P I R)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、P K D 1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の結果を確認し、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36】図36は、実施例30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10,000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37】図37は、実施例31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の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38】図38は、実施例32に記載されるような、A R P E - 1 9、H e L aおよびU 2 O 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 O 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35%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認した。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39】図39は、実施例33に記載されるように、2'-O-Me 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40】図40は、実施例34に記載されるように、図39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、60nM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。RT-qPCRは、IKBKAP発現レベルを測定するために実行され、IKBKAPからのct値は、アクチン産物の対応するct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41】図41は、実施例35に記載されるように、示された濃度でIKB-IVS7+26またはIKB-IVS8-16 ASO、あるいは各々45 nM (合計90 nM) で両方のASO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IKBKAP転写物レベルの増加を示す。ARPE-19細胞からの細胞質RNAを使用する、エクソン6-8 (IKB-IVS7+26、上) またはエクソン8-10 (IKB-IVS8-16、下) に対応する放射性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。IKBKAP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。

10

【図42】図42は、実施例36に記載されるように、示された濃度でIKB-IVS7+26またはIKB-IVS8-16 ASO、あるいは各々45 nM (合計90 nM) で両方のASOの組み合わせにより処理されたARPE19細胞におけるIKAPタンパク質レベルの用量依存的増加を示す。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抽出され、分離された。IKAP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。IKAP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。

20

#### 【0045】

##### < 配列 >

本出願は、ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: 1-374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11~20にリストされる。表11~20にSEQ ID NO: 1-102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SEQ ID NO: 103-374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。

30

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0046】

ヒトのタンパク質をコード化する遺伝子の85パーセント(85%)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1~316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mRNAだけが、細胞質中の続く翻訳のために核膜孔を通して輸出される。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mRNA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、より効率的になされる場合、完全に切り出された成熟mRNA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RNA)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。

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する。本明細書で使用するように、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】

本明細書で使用するように、「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

団における最も豊富なイントロンであり、ここで、RIC プレ mRNA の集団は、2 つ以上の保持されたイントロンを含む。実施形態では、標的タンパク質をコードする RIC プレ mRNA 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 mRNA が生成される。用語「成熟 mRNA」および「完全に切り出された mRNA」は、標的タンパク質をコードする完全に処理された mRNA（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、mRNA）または完全に処理された機能 RNA 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 mRNA (productive mRNA)」も、標的タンパク質をコードする完全に処理された mRNA 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 RIC プレ mRNA 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 RIC プレ mRNA 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、RIC プレ mRNA の集団は、2 つ以上の保持されたイントロンを含む。実施形態では、標的タンパク質をコードする RIC プレ mRNA 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）RNA 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、RIC プレ mRNA 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、RIC プレ mRNA 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、RIC プレ mRNA 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）RNA が生成される。

30

#### 【0054】

幾つかの実施形態では、RIC プレ mRNA 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、RIC プレ mRNA 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、RIC プレ mRNA 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 - 3 e 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 - 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 での 16 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、生物学および科学的情報の NCBI 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。

10

#### 【0056】

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 プレ m RNA の一部に相補的である ASO 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 RNA 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、ASO と細胞が相互作用するように、ASO を細胞に近接させる方法を指す。ASO で接触させられる細胞は、ASO 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 ASO 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、ASO は、ASO を細胞型に対して標的とする、ASO と疾病または疾患に関係する又は疾病または疾患に関連する細胞との間の接触を増強する、または ASO の取り込みを増強するために、さらに修飾され得るか又は別の分子に結合され得る (例えば、共有結合される)。

20

#### 【0057】

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 RNA 転写物は、m RNA を生成するためにスプライシングを受け、ここで m RNA は、核から m RNA 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 RNA 転写物の例において、RIC プレ m RNA が生じて、これが核内で維持され、RIC プレ m RNA 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 RNA 転写物の標的とされた部分に相補的である ASO 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 RNA の量が増加される (図 2 B)。

30

#### 【0058】

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 RNA 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、RIC プレ m RNA を発現する細胞を RIC プレ m RNA 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、プレ m RNA 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 ELISA を含む。

40

#### 【0059】

幾つかの実施形態では、細胞を RIC プレ m RNA 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、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

、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。

10

#### 【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。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。

20

30

#### 【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

40

50

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。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】

< 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 >

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 RIC 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】

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は、保持されたイントロンを RIC 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 RIC 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 にけ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 RIC プレ mRNA から正しく除去し、ここで、RIC 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 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は、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を正しく除去し、ここで、RIC 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 RIC プレ mRNA から正しく除去し、ここで、RIC プレ mRNA は、等価な野生型タンパク質ま

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。

#### 【0067】

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。

#### 【0068】

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mRNA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mRNA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。

#### 【0069】

実施形態では、該方法は、RIC プレmRNAが、野生型プレmRNA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mRNAが、野生型プレmRNA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mRNAは、全長プレmRNA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mRNA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。

#### 【0070】

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。これらの実施形態では、全長成熟mRNAは、野生型成熟mRNA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mRNA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。

#### 【0071】

##### <アンチセンスオリゴマー>

本開示の一態様は、RIC プレmRNA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 사용되는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mRNA)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mRNA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

10

20

30

40

50

ままであるように設計されている。典型的に、A S O は、意図した（標的とされた）核酸配列以外の部位にハイブリダイズする場合、標的核酸でない限られた数の配列に（標的核酸以外の少数の部位に）ハイブリダイズする。A S O の設計は、プレmRNA転写物の標的とされた部分の核酸配列、またはゲノムまたは細胞プレ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、A S O が他の部位に結合し「オフターゲット」効果を引き起こす可能性は、限定されている。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、A S O 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（ $T_m$ ）で、好ましくは少なくとも50 °で、および典型的に60 °からおよそ90 °の間で生じる。そのようなハイブリダイゼーションは、好ましくは、厳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、 $T_m$ 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（A S O）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、A S O 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A S O 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。A S O 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】

A S O は、標的配列におけるすべての核酸塩基にハイブリダイズする必要はなく、それがハイブリダイズする核酸塩基は、隣接しているか又は隣接していないかもしれない。A S O 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、A S O 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、A S O は、A S O 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。

10

## 【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。

20

## 【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、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニラデート(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), Steine et al. Nucleic Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al. Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. 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。

30

40

## 【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、

50

2' F; N3' > - P5' ホスホラミデート、2' ジメチルアミノオキシエトキシ、2' ジメチルアミノエトキシエトキシ、2' - グアニジニウム (guanidinium)、2' - O - グアニジニウムエチル、カルバミン酸塩修飾した糖、および二環式修飾した糖などの、2' 置換基を含む。幾つかの実施形態では、糖部修飾は、2' - O - Me、2' F、および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BNA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ロ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修飾およびホスホロ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) のホスホロ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

; 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。

10

【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。

20

30

【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。

40

【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

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。

10

【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、スプ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核酸塩基、12~30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核酸塩基、15~35核酸塩基、15~30核酸塩基、15~25核酸塩基、15~20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。

20

30

40

【0089】

50

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

#### 【0090】

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 (GluNAc)、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。

#### 【0091】

幾つかの実施形態では、ASOによって標的とされる核酸は、真核細胞などの細胞において発現されたRIC プレ mRNA 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、エスクビオにある。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)インビトロにある。

#### 【0092】

##### < 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。

#### 【0093】

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. Berge, et al., J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977)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、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3 - フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバリン酸塩、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、チオシアン酸塩、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、無毒のアモンニウム、第四級アモンニウム、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。

#### 【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。

#### 【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。

#### 【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

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、セロピオース、D(+)マルトース、D(+)ラフィノース、L(+)ラムノース、D(+)メリピオース、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(GluNAc)、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】

## &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係する疾病、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。

10

## 【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。

20

## 【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病を有し、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。

30

40

## 【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によって引き起こされた疾病を有する。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、

50



i) 標的タンパク質または機能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る、

ii) 標的タンパク質または機能RNA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RNA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る、

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

ここで、RIC プレ mRNA 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、被験体の細胞内において、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。これらの実施形態では、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RNA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mRNA、標的タンパク質または機能RNA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RIC プレ mRNA 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mRNA、標的タンパク質または機能RNA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、ASO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RIC プレ mRNA 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係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
$\beta$ サラセミア (BTI)	HBB	1
$\beta$ サラセミア	HBG1/2	2
鎌型赤血球症	HBG1/2	2
嚢胞性線維症	CFTR	26
血栓性血小板減少性紫斑病	ADAMTS13	2
結節硬化症	TSC1	3
X 型網膜色素変性症	IMPDH1	1
腎多嚢胞病	PKD1	4
家族性自律神経不全	IKBKAP	2

10

20

30

## 【 0 1 0 7 】

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プレ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プレ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プレ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。

## 【 0 1 0 8 】

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、エキスピボで細胞に投与される。

40

## 【 0 1 0 9 】

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

50

記載される疾患のいずれかなどの疾患を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	ctgtccttgtaaccttgat	104
HBBIVS1+7	cctgtccttgtaaccttga	105
HBBIVS1+8	acctgtccttgtaaccttg	106
HBBIVS1+9	aacctgtccttgtaacctt	107
HBBIVS1+10	aaacctgtccttgtaacct	108
HBBIVS1+11	taaacctgtccttgtaacc	109
HBBIVS1+12	ttaaacctgtccttgtaac	110
HBBIVS1+13	cttaaacctgtccttgtaa	111
HBBIVS1+14	ccttaaacctgtccttgta	112
HBBIVS1+15	tccttaaacctgtccttgt	113
HBBIVS1+16	ctccttaaacctgtccttg	114
HBBIVS1+17	tctccttaaacctgtcctt	115
HBBIVS1+18	gtctccttaaacctgtct	116
HBBIVS1+19	ggctctccttaaacctgtc	117
HBBIVS1+20	tggtctccttaaacctgt	118
HBBIVS1+21	ttggtctccttaaacctg	119
HBBIVS1+22	attggtctccttaaacct	120
HBBIVS1+23	tattggtctccttaaacc	121
HBBIVS1+24	ctattggtctccttaaac	122
HBBIVS1+25	tctattggtctccttaaa	123
HBBIVS1+26	ttctattggtctccttaa	124
HBBIVS1+27	tttctattggtctcctta	125
HBBIVS1+28	gtttctattggtctcctt	126

表 3 は、P R P F 3 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、P R P F 3 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。

【 0 1 1 3 】

## 【表 3】

表 3. P R P F 3 1 遺伝子を標的とする A S O のリスト

ASO	配列	SEQ ID NO
P31-IVS10+6	accggacccccagggccc	127
P31-IVS10+11	tgcctaccggacccccag	128
P31-IVS10+16	cccatgcctaccggacc	129
P31-IVS10+21	atgacccccatgcctacc	130
P31-IVS10+26	cctccatgacccccatgc	131
P31-IVS10+31	tctcccctccatgacccc	132
P31-IVS10-41	gaggaggacgccggcttc	133
P31-IVS10-36	gctgggaggaggacgccg	134
P31-IVS10-31	agtcggctgggaggagga	135
P31-IVS10-26	cagggagtcggctgggag	136
P31-IVS10-21	ggcgccagggagtcggct	137
P31-IVS10-16	tgggcggcgccagggagt	138
P31-IVS12+6	ccccacctgggtctggcc	139
P31-IVS12+11	cccagccccacctgggtc	140
P31-IVS12+16	cggtccccagccccacct	141
P31-IVS12+21	tccctcggtccccagccc	142
P31-IVS12-16	ggaggctgcatctgggc	143
P31-IVS12-21	ctgcatctgggctcccc	144
P31-IVS12-26	atctgggctccccccacc	145
P31-IVS12-31	ggctccccccaccttgtg	146
P31-IVS12+26	ttgtgtccctcggtcccc	147
P31-IVS12+31	ccaccttgtgtccctcgg	148
P31-IVS12+36	tccccccaccttgtgtcc	149

## 【 0 1 1 4 】

表 4 は、A D A M T S 1 3 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

10

20

30

40

50

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. ADAMTS 13 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	151
ADAM-IVS25+16	agcugccugacaggaagg	152
ADAM-IVS25+21	gcagcagcugccugacag	153
ADAM-IVS25+26	cuccugcagcagcugccu	154
ADAM-IVS25+31	cacccuccugcagcagc	155
ADAM-IVS25+36	uugcccacccuccugca	156
ADAM-IVS25+41	ugccuuugcccacccuc	157
ADAM-IVS25+46	gaagaugccuuugccac	158
ADAM-IVS25-16	gagacagguaagcagugc	159
ADAM-IVS25-21	agguaagcagugcuuccc	160
ADAM-IVS25-26	agcagugcuuccccgauu	161
ADAM-IVS25-31	ugcuuccccgauucccag	162
ADAM-IVS25-36	ccccgauucccagcaggg	163
ADAM-IVS25-41	auucccagcagggcaggc	164
ADAM-IVS25-46	cagcagggcaggcuccgg	165
ADAM-IVS25-47	agcagggcaggcuccggg	166
ADAM-IVS25-62	gggcuuccaagcugagga	167
ADAM-IVS27+6	agguggagaaggccuggc	168
ADAM-IVS27+11	aaggagguggagaaggc	169
ADAM-IVS27+16	cacccaaggagguggag	170
ADAM-IVS27+21	uggagcacccaaggagg	171
ADAM-IVS27+26	aggacuggagcacccaag	172
ADAM-IVS27+31	cugccaggacuggagcac	173
ADAM-IVS27+36	ccuccugccaggacugg	174



【表 4 - 2】

ADAM-IVS27+41	cccagccucccugccagg	175
ADAM-IVS27-16	agggacauaggaacccag	176
ADAM-IVS27-21	cauaggaacccagacaga	177
ADAM-IVS27-26	gaacccagacagaccggu	178
ADAM-IVS27-31	cagacagaccgguggugc	179
ADAM-IVS27-36	agaccgguggugccagag	180
ADAM-IVS27-41	gguggugccagaggccag	181
ADAM-IVS27-46	ugccagaggccaggacaa	182
ADAM-IVS27-51	gaggccaggacaacucac	183
ADAM-IVS25+17	cagcugccugacaggaag	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	cccuccugcagcagcugc	195
ADAM-IVS25+29	ccccuccugcagcagcug	196
ADAM-IVS25+30	acccuccugcagcagcu	197

10

20

30

40

## 【 0 1 1 7 】

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。

## 【 0 1 1 8 】

【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	ucaaauccuuacaaacau	198
TSC1-IVS5+11	uucauucaaauccuuaca	199
TSC1-IVS5+16	accuuuucuucaaaucc	200
TSC1-IVS5+21	auaaaaccuuuucuuca	201
TSC1-IVS5+26	uacucauaaaaaccuuuc	202
TSC1-IVS5+31	aacuaauacucauaaaacc	203
TSC1-IVS5+36	ucagaaacuauacucaua	204
TSC1-IVS5+41	aaauuucagaaacuauac	205
TSC1-IVS5-16	ucaaacaggaaacgucug	206
TSC1-IVS5-21	caggaaacgucugucagg	207
TSC1-IVS5-26	aacgucugucaggcacug	208
TSC1-IVS5-31	cugucaggcacuggcacc	209
TSC1-IVS5-36	aggcacuggcaccaggau	210
TSC1-IVS5-41	cuggcaccaggauccggca	211
TSC1-IVS5-46	accaggauccggcauugua	212
TSC1-IVS5-51	gaucggcauuguacagua	213
TSC1-IVS10+6	aggcacacuaguugacac	214
TSC1-IVS10+11	agagcaggcacacuaguu	215
TSC1-IVS10+16	aggagagagcaggcacac	216
TSC1-IVS10+21	agcagaggagagagcagg	217
TSC1-IVS10+26	cagaaagcagaggagaga	218
TSC1-IVS10+31	uucaccagaaagcagagg	219
TSC1-IVS10+36	ucagcuuaccagaaagc	220
TSC1-IVS10+41	aaggguccagcuuaccag	221
TSC1-IVS10-16	aguacauccagcaguggca	222

【表 5 - 2】

TSC1-IVS10-21	aucagcaguggcaaagga	223	10
TSC1-IVS10-26	caguggcaaagggaugcu	224	
TSC1-IVS10-31	gcaaagggaugcuaaguc	225	
TSC1-IVS10-36	ggaaugcuaagucaucca	226	
TSC1-IVS10-41	gcuaagucauccacgagg	227	
TSC1-IVS10-46	gucauccacgagguuuau	228	
TSC1-IVS10-51	ccacgagguuuauaucca	229	
TSC1-IVS11+6	aauccaaccuaagacaua	230	
TSC1-IVS11+11	aaucaaauccaaccuaag	231	
TSC1-IVS11+16	caacuaaucaaauccaac	232	20
TSC1-IVS11+21	aaaaccaacuaucaaaau	233	
TSC1-IVS11+26	aggccaaaaccaacuau	234	
TSC1-IVS11+31	aaggcaggccaaaaccaa	235	
TSC1-IVS11+36	cauuaaaggcaggccaaa	236	
TSC1-IVS11+41	ccugccauuaaaggcagg	237	
TSC1-IVS11-16	agaacauauaugaacacu	238	30
TSC1-IVS11-21	auauaugaacacugagcc	239	
TSC1-IVS11-26	ugaacacugagcccaacu	240	
TSC1-IVS11-31	acugagcccaacuauuag	241	
TSC1-IVS11-36	gccaacuauuagaaaaa	242	
TSC1-IVS11-41	acuauuagaaaaacugcc	243	
TSC1-IVS11-46	uagaaaaacugccgauuu	244	40
TSC1-IVS11-51	aaacugccgauuuuuuuu	245	

## 【 0 1 2 0 】

表 6 は、I M P D H 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、I M P D H 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。

## 【 0 1 2 1 】

【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	cugaagggguugugggcug	250
IMP-IVS14+38	gggcccugaagggguugug	251
IMP-IVS14+43	ugagcgggcccugaaggg	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	ucagaggacccccaccca	259
IMP-IVS14-46	ggacccccacccccaccucu	260
IMP-IVS14-51	ccacccccaccucuuaagg	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	ucgguggcaugagcgggccc	270

【表 6 - 2】

IMP-IVS14+53	gucggugggcaugagcgagg	271
--------------	----------------------	-----

## 【 0 1 2 3 】

表 7 は、P K D 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、P K D 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。

## 【 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	cgagguuucucuagggaa	272
PKD1-IVS32+11	gggcucgagguuucucua	273
PKD1-IVS32+16	caccagggcucgagguuu	274
PKD1-IVS32+21	accugcaccagggcucga	275
PKD1-IVS32+26	cagugaccugcaccaggg	276
PKD1-IVS32+31	agacacagugaccugcac	277
PKD1-IVS32+36	acccagacacagugacc	278
PKD1-IVS32+41	ccggcaccccagacacag	279
PKD1-IVS32-16	gucagcaagguaccaggg	280
PKD1-IVS32-32	gggaugugucacacacac	281
PKD1-IVS32-37	gugucacacacacagccc	282
PKD1-IVS32-42	acacacacagcccacccc	283
PKD1-IVS32-47	cacagcccacccccgucc	284
PKD1-IVS32-52	cccacccccguccaguca	285
PKD1-IVS32-57	ccccguccagucacgcac	286
PKD1-IVS32-62	uccagucacgcacggaca	287
PKD1-IVS33+6	ccccuccucucaccccag	288
PKD1-IVS33+11	agagccccuccucucac	289
PKD1-IVS33+16	gcuucagagccccuccu	290
PKD1-IVS33+21	ggugagcuucagagcccc	291
PKD1-IVS33+26	gcaagggugagcuucaga	292
PKD1-IVS33-31	cagcugcaagggugagcu	293
PKD1-IVS33-26	gggccagcugcaaggggu	294
PKD1-IVS33-21	aggguggggcccagcugca	295
PKD1-IVS33-16	gcauagggugggcccagc	296

【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	ggagguggggagacaagag	302
PKD1-IVS37+44	ggguggggagguggggagac	303
PKD1-IVS37+49	ugcaugggguggggaggugg	304
PKD1-IVS37-16	gcccuguggucagccugg	305
PKD1-IVS37-21	guggucagccuggcccca	306
PKD1-IVS37-26	cagccuggcccccagccca	307
PKD1-IVS37-31	uggccccagcccacagug	308
PKD1-IVS37-36	ccagcccacagugacagc	309
PKD1-IVS37-41	ccacagugacagcagggc	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	ggcaaaacuaaagcccag	318
PKD1-IVS38+36	cuaaaggcaaaacuaaag	319
PKD1-IVS38+41	cuggacuaaaggcaaaac	320
PKD1-IVS38-16	ucacacgcuccagccccc	321
PKD1-IVS38-21	cgcuccagcccccucugc	322
PKD1-IVS38-26	cagcccccucugccccc	323

【表 7 - 3】

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

10

【 0 1 2 7 】

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。

【 0 1 2 8 】



【表 8 - 1】

表 8. I K B K A P 遺伝子を標的とする A S O のリスト

ASO	配列	SEQ ID NO
IKB-IVS7+6	uuaacugcaauauuuuc	329
IKB-IVS7+11	guuguuuuacugcaauau	330
IKB-IVS7+16	uuauuguuguuuuacugc	331
IKB-IVS7+21	auuuuuuuuuguuguuuu	332
IKB-IVS7+26	uaaaaauuuuuuuauuguu	333
IKB-IVS7+31	uaagauaaaaauuuuuu	334
IKB-IVS7+36	uuuaauaagauaaaaauu	335
IKB-IVS7+41	uuauuuuuuauaagauaa	336
IKB-IVS7-16	gucaaacacacauacaca	337
IKB-IVS7-21	acacacauacacacuuaa	338
IKB-IVS7-26	cauacacacuuaaaacau	339
IKB-IVS7-31	acacuuaaaacauuuga	340
IKB-IVS7-36	uaaaacauuauugauaaaa	341
IKB-IVS7-41	cauuauugauaaaaguugu	342
IKB-IVS7-46	ugauaaaaguugucaauu	343
IKB-IVS7-51	aaaguugucaauucagaa	344
IKB-IVS8+6	cuaagguuucucuccca	345
IKB-IVS8+11	uuucucuaagguuucuc	346
IKB-IVS8+16	aagaauuucucuaagguu	347
IKB-IVS8+21	guuccaagaauuucucua	348
IKB-IVS8+26	cucugguuccaagaauuu	349
IKB-IVS8+31	cucuacucugguuccaag	350
IKB-IVS8+36	accaccucuacucugguu	351
IKB-IVS8+41	guaccaccaccucuacuc	352
IKB-IVS8-16	gaguguuacaauaucgaa	353

【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	uaaagaauagauaaauc	359
IKB-IVS8-51	aaauagauaaauccagaa	360
IKB-IVS7+22M	aauuuuuuauuguuguuu	361
IKB-IVS7+23M	aaaauuuuuauuguuguu	362
IKB-IVS7+24M	aaaaauuuuuauuguugu	363
IKB-IVS7+25M	aaaaauuuuuauuguug	364
IKB-IVS7+26M	uaaaaaauuuuuauuguu	365
IKB-IVS7+27M	auaaaaauuuuuauugu	366
IKB-IVS7+28M	gauaaaaauuuuuauug	367
IKB-IVS7+29M	agauaaaaauuuuuauu	368
IKB-IVS7+30M	aagauaaaaauuuuuau	369
IKB-IVS8-16M	gaguguuacaauaucgaa	370
IKB-IVS8-17M	aguguuacaauaucgaaa	371
IKB-IVS8-18M	guguuacaauaucgaaag	372
IKB-IVS8-19M	uguuacaauaucgaaagc	373
IKB-IVS8-20M	guuacaauaucgaaagcu	374

## 【 0 1 3 0 】

## &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

10

20

30

40

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mRNA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係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の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つのエクソン分離し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つのエクソン分離し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。

#### 【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。

#### 【0133】

多くのプレmRNA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、ディープシーケ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。

#### 【0134】

##### II. 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

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。RT-PCR 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】

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。各反応からの RT-PCR 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】

#### III. 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 mRNA における他のイントロンに対する持続性の (persistent) 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 mRNA 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、RNase 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 RNA プローブ（例えば、放射標識された RNA 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、RNA 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 RNA 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 RNA は、プローブが二本鎖 RNA の領域を形成するプレ mRNA の領域にハイブリダイズする条件下で、対の RNA プローブでインキュベートされる。プレ mRNA と RNA プローブの混合物は、RNase A 及び / 又は RNase T1 などの、一本鎖 RNA を分解する RNase で消化した。二本鎖 RNA は分解から保護されている。

#### 【0138】

RNase 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。RNA プローブの全長（例えば、150 のヌクレオチド）に対応する RNA 分子の量は、プレ mRNA 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 RNA プローブに対応する RNA 分子（例えば、およそ 50 のヌクレオチドの長さの RNA 分子）の量は、RNA プローブがハイブリダイズするイントロンがプレ mRNA 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 RNA の量を表わした。切り出された RNA（分解された RNA プローブの量、例えば、50 のヌクレオチド RNA 分子）に対するイントロン保持（全長 RNA プローブの量、例えば、100 のヌクレオチド RNA 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 mRNA 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 mRNA 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 mRNA 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。

## 【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pre-mRNA、特に標的イントロン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。pre-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、標的イントロン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。イントロン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、保持されたイントロンに隣接しているエクソンまたは保持されていないイントロンにおける標的とされた領域への結合によって、保持されたイントロン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。

10

## 【0140】

ASO「walk」と呼ばれる、1ラウンドのスクリーニングは、pre-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、保持されたイントロンの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/保持されたイントロンの上流に位置するエクソンの配列の一部)から標的とされた/保持されたイントロン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トロンの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/保持されたイントロンの3'スプライス部位の下流のおよそ100ヌクレオチド(例えば、標的とされた/保持されたイントロンの下流に位置するエクソンの配列の一部)まで、5つのヌクレオチドごとに敷き詰められ得る。例えば、15のヌクレオチドの長さの第1のASOは、標的とされた/保持されたイントロンの5'スプライス部位に対するヌクレオチド+6から+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/保持されたイントロンの5'スプライス部位に対するヌクレオチド+11から+25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、pre-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。

20

30

## 【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ていない配列である、スクランブル配列を有するASO)は、例えばトランスフェクションによって、標的pre-mRNA(例えば、本明細書で別記されるRIC pre-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pre-mRNAに対する切り出されたpre-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pre-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

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、本明細書に記載されるように、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、インビボで試験され得る。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 (ヒトの上皮子宫颈癌) 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% のエチジウムブ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)。

10

**【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。

20

**【0149】**

## 【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

【 0 1 5 0 】



## 【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（XI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pre-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

サラセミアに関係する、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ン化した。変異を、完全なコンセンサス配列にもたらしめるために、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得ることを示す。

30

40

## 【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

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でトランスフェクトし、タンパク質抽出物をウェスタンブ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-ポリ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ブ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、polyA+RNAをTHLE-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

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した。ADAMTS13に対する配列決定の結果を、図11に示す。簡潔には、図11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、Rosenbloom, et al., 2015, "The UCSCのゲノムブラウザーのデータベース: 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のゲノムブラウザー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のゲノムブラウザーによって、(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、THLE-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トロン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つのイントロン(矢印によって示された、25および27)を同定した。これは、両方のイントロンが保持されること、およびイントロン-25およびイントロン-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トロン含有(RIC)ADAMTS13 pre-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トロン保持事象の確証

ADAMTS13(血栓性血小板減少性紫斑病)遺伝子におけるイントロン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、イントロン保持を評価し、これは、イントロン-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、ホスホリメーキング(phosphorimaging)によって視覚化した。イントロン25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-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トロン保持(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%がイントロン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。

【0159】

実施例7: ADAMTS13のイントロン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トロン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トロン25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-79に及ぶ3'スプライス部位のイントロン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 ( c o n c e n t r a t e ) という知識に基づいて、これらの標的部位を選択した。

【 0 1 6 0 】

実施例 8 : A D A M T S 1 3 イントロン 2 5 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 A D A M T S 1 3 イントロン 2 5 のスプライシング効率を改善することによって、A D A M T S 1 3 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 1 4 )。この目的のために、H e p G 2 細胞を、模擬トランスフェクトしたか、または 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 1 3 および表 4、S E Q I D N O : 1 5 0 ~ 1 6 7 に記載される標的 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。4 8 時間 ( 図 1 4 に示されるように ) 6 0 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、+ 2 1 および + 2 6 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、A D A M T S 1 3 転写物レベルを増加させることを示している ( 図 1 4 )。標的 A S O でトランスフェクトされた細胞からの A D A M T S 1 3 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、対照 A S O 処理された細胞からの正規化された A D A M T S 1 3 P C R 産物に対してプロットした。この分析の結果は、標的 A S O ( + 2 1 および + 2 6 ) の両方が、A D A M T S 1 3 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 1 4 )。これらの結果は、A S O を使用して A D A M T S 1 3 遺伝子における律速のイントロンのスプライ

【 0 1 6 1 】

実施例 9 : A D A M T S 1 3 イントロン 2 5 を標的とする A S O の用量反応効果

+ 2 1 および + 2 6 の A S O の他に、逆効果を示した ( 図 1 4 ) - 4 6 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 1 5 )。H e p G 2 細胞を、模擬トランスフェクトしたか、あるいは 4 8 時間、図 1 5 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、3 つの 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。放射性 R T - P C R の結果は、+ 2 1 および + 2 6 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、A D A M T S 1 3 転写物レベルを増加させ、一方で、- 4 6 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、A D A M T S 1 3 転写物レベルを減少させることを示している ( 図 1 5 )。標的 A S O でトランスフェクトされた細胞からの A D A M T S 1 3 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、対照 A S O 処理された細胞からの正規化された A D A M T S 1 3 P C R 産物に対してプロットした。この分析の結果は、標的 A S O ( + 2 1 および + 2 6 ) の両方が、A D A M T S 1 3 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 1 5 )。これらの結果は、A S O を使用して A D A M T S 1 3 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。

【 0 1 6 2 】

実施例 1 0 : A D A M T S 1 3 イントロン 2 5 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

+ 2 1 または + 2 6 の A S O による A D A M T S 1 3 イントロン 2 5 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 1 6 )。H e p G 2 細胞を、模擬トランスフェクトしたか、あるいは 4 8 時間、図 1 6 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、3 つの 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。簡潔には、H e p G 2 に処理された細胞からのタンパク質抽出物を、8 % 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 A D A M T S 1 3 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ADAMTS 13および チューブリンを検出するために使用した。図16は、ADAMTS 13（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ブ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ADAMTS 13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ADAMTS 13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、ADAMTS 13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、ADAMTS 13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。

10

#### 【0163】

実施例11：ADAMTS 13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）。

20

#### 【0164】

実施例12：ADAMTS 13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ADAMTS 13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、ADAMTS 13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）（Invitrogen）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、ADAMTS 13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ADAMTS 13 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ADAMTS 13 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、ADAMTS 13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ADAMTS 13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：次世代シーケ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、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 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のゲノムブラウザー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に、(読み込み信号の下)UCSCのゲノムブラウザーによって、(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取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取密度を有しているか又は読取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】

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、ホスホルイメージ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。

#### 【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。

#### 【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。

10

#### 【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RT-qPCR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。

20

30

#### 【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ブ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

40

50



、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：次世代シーケンシングを使用するRNAseqによるIMP DH1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IMP DH1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。IMP DH1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のゲノムブラウザー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IMP DH1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)UCSCのゲノムブラウザーによって、(一定の比率の縮尺で描かれた)すべてのIMP DH1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取密度を有しているが、(図25の下)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取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)IMP DH1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：IMP DH1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、1 ASO、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：IMP DH1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IMP DH1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、IMP DH1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対照でトランスフェクトした。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、模擬トランスフェクトされた又は非標的のASOと比較して、IMP DH1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でトランスフェクトされた細胞からのIMP DH

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処理された細胞からの正規化されたIMP DH 1 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、IMP DH 1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IMP DH 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。

#### 【0174】

実施例22: IMP DH 1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)(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、+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、IMP DH 1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IMP DH 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、模擬処理された細胞からの正規化されたIMP DH 1 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、IMP DH 1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、IMP DH 1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IMP DH 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確認している。

#### 【0175】

実施例23: IMP DH 1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IMP DH 1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)(Invitrogen)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-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IMP DH 1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IMP DH 1、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、IMP DH 1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ブ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IMP DH 1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IMP DH 1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、IMP DH 1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、IMP DH 1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。

#### 【0176】

実施例 24 : IMPDH1イントロン14の+48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 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

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対照でトランスフェクトした。48時間(図31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、ASO標的の+46および+47が、模擬トランスフェ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、microwalk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(腎多嚢胞病)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、polyA+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 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のゲノムブラウザー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のゲノムブラウザーによって、(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取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取密度を有しているか又は読取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 (RIC) PKD1 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。

#### 【0179】

実施例 27: PKD1 のイントロン 37 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 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 ASO、PKD1-IVS37+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-Me RNA、PS 骨格、18-me

10

#### 【0180】

実施例 28: 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、転写レベルを増加させる

ASO を使用して PKD1 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、PKD1 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、HEK293 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 33 および表 7 の SEQ ID NO: 297 ~ 312 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 34 に示されるように) 60 nM の ASO を使用して、実験を行った。放射性 RT-PCR の結果は、+29 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、PKD1 転写物レベルを増加させることを示している (図 34)。標的 ASO でトランスフェクトされた細胞からの PKD1 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 PKD1 PCR 産物に対してプロットした。この分析の結果は、+29 ASO が、PKD1 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、ASO を使用して PKD1 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

20

30

#### 【0181】

実施例 29: PKD1 イントロン 37 を標的とする ASO の用量応答効果

+29 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 35)。HEK293 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、RNAiMAX (RiM) (Invitrogen) 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。放射性 RT-PCR の結果は、+29 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、PKD1 転写物レベルを増加させることを示している (図 35)。標的 ASO でトランスフェクトされた細胞からの PKD1 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 PKD1 PCR 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 ASO が、用量依存的様式で PKD1 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、PKD1 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 倍を超える増加、および ASO 処置に対する用量依存反応を示している (図 35、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 37 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 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、ASO を使用して PKD1 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

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)(Invitrogen)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応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。

#### 【0183】

実施例31：次世代シーケンシングを使用するRNAseqによるIKBKAP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IKBKAP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、polyA+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した。IKBKAP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のゲノムブラウザー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IKBKAP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)UCSCのゲノムブラウザーによって、(一定の比率の縮尺で描かれた)すべてのIKBKAP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取密度を有しているが、(図37の下の方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取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)IKBKAP pre-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。

#### 【0184】

実施例32：IKBKAP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

IKBKAP(家族性自律神経不全)遺伝子中のイントロン7-保持事象の確証を、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

10

20

30

40

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、ホスホル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、IKBKAP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認した。

10

#### 【0185】

実施例33: IKBKAP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。

20

#### 【0186】

実施例34: IKBKAP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IKBKAP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、IKBKAP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、IKBKAP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、IKBKAP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IKBKAP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。

30

#### 【0187】

実施例35: IKBKAP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、IKBKAP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

40

50

からのIKBKAP 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IKBKAP PCR産物に対してプロットした。この分析の結果は、IVS7+26およびIVS8-16を標的とするASO、およびそれらの組み合わせが、IKBKAP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40)。これらの結果は、ASOを使用してIKBKAP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。

#### 【0188】

実施例36:IKBKAPイントロン7または8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

IVS7+26 ASOまたはIVS8-16 ASOによる、それぞれ、IKBKAP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42)。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42)。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-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IKAP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IKAPおよびカテニンを検出するために使用した。図42は、IKAPが、IVS7+26 ASOまたはIVS8-16 ASO、または両方のASO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ブ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IKAP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IKAP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 IVS7+26およびIVS8-16が、IKAP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42)。これらの結果は、IKBKAPイントロン7の5'スプライス部位の下流の領域またはIKBKAP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

#### 【0189】

## 【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	UGGGCUACGAACUGAAGGAUGAGAUCGAGCGCAAUUCGACAAGUGGCA GGAGCCGCCGCCUGUGAAGCAGGUGAAGCCGCUGCCUGCGCCCCUGGAU GGACAGCGGAAGAAGCGAGGCGGCCG	10
2	イントロン 10	gggcccuggggguccgguaggcaugggggucauggaggggagaagccgg cguccuccucccagccgacucccuggcgccgcca	20
3	エクソン 11	UACCGCAAGAUGAAGGAGCGGCUGGGGCUGACGGAGAUCCGGAAGCAGG CCAACCGUAUGAGCUUCGGA	
4	エクソン 12	UCGAGGAGGACGCCUACCAGGAGGACCUGGGAUUCAGCCUGGGCCACCU GGGCAAGUCGGGCAGUGGGCGUGUGCGGCAGACACAGGUAAACGAGGCC ACCAAGGCCAGGAUCUCCAAGACGCUG	30
5	イントロン 12	ggccagacccagguggggcugggggaccgagggacacaaggugggggggag cccagaucgcagccucc	40
6	エクソン 13	GGACCCUGCAGAAGCAGAGCGUCGUUAUAUGGCGGGAAGUCCACCAUCCG CGACCGCUCCUCGGGCACGGCCUCCAGCGUGGCCUUCACCCCACUC	

【 0 1 9 0 】



表 1 2. R B 1 標的配列

**【 0 1 9 1 】**

【表 1 2 - 2】

	<p>aaccagggacaaagaccaaatatctttcaatgataccatgtatgtatgt  acataacctcacaggaatctttataaaacaattttgaaattcactcatt  atgagtgtgatttgaaatgagatactccaaaatgtaagcccgatatcca  aatgtcaccagcctgtccctgcctactgggtctccttcatacatatgca  ctttttgcttgtccttcctctcagacttctaggatattctttttctgggt  10  aactgattaggaattgtttgcatgagatcctgcctcagtgaagtggc  agagcttcattctaggagatccaagggaaagctttgctttgaaacattt  attctaggctgcaaatccacaaccctagttggccttcattaaagtcac  taattcagcagtcacatattcaatatgcattactgttaatatgttgcac  catctccattcccctgagagcttatatttttaatttttaaatatttatt  20  tttagagacagtgtctcactctgtcacctacttattataacctcaaact  cctcggcccaagcagtcctctcaccttagcctcccaagttgccaggact  acaggcatgcaccaccatgtccagctaatttttaaatTTTTTgtagaga  cagggTTTTctatgttgccagattgggtattgaactcctggcttccacg  ataccccgctctcagcctcccaaagaactgggattacagatgtgagccac  tgcacctggccagagagcttatattcttataggaatgggaagactgcct  30  atgttatgtgttgctacataatacattacccccaaacttagtgacttaa  aacaacgcttattatctccatttctgtgggtcaataatctaggcatga  cttagctgggccagagtttctccaaagtctgtgatcaaggtgtcagttg  ggctgggcctgcagtcattctcaaggctccactagaggagcattcactgg  cagacttattcaaattggctgttggtgatcctcgatggctattggcccc  40  tctattggtttcttgcccttgggcccctccatagtagtactgcttgctattc  acaacatggcagcttgctttgccagagcagggactctgagggaggcag  ggaaataaagagcaagagagaggtcacagtcttattgtaatctaattct  ggaaatgacagcccattacttttggcatattattttggttagaagcaag  acaacagtagatctagcccacacacgaggggaggaggatcacacaagga  ggtgaataccaggaggtgggggtcattgggagccatctgagaggctgccc</p>	
--	--	--

		<p>accacactgcctcaagtaactagggagaggtaaaagtttatatgccaga</p> <p>tgaccaaatattaaaatgtgtgttacaaatagttcacgatgggctcagc</p> <p>tgtcagactttacaaaggagctatgggaccttataaggacagttggaac</p> <p>tggctaggtatcacatagtggtcttcaaacatttttgcttgccataacc</p> <p>tctaaaataattgggaaaaagttgaatgtacttccatatcttaaagctg</p> <p>ataattttaaataattatacattttaatagcagcacgggatttagtttttg</p> <p>ttaaattgtatatgtgctccaaatagatttaccatcaaaacctgttttg</p> <p>aatttaatatattgggagaattcgctagtttaatttttgaaaaataaagta</p> <p>taattggcaaagctaatacctcactggtgaatctatccgtcaaatcagat</p> <p>ataatttctatcagaaagtctatatgacttgtcaacataatacccataa</p> <p>agtgaatcaaaaattattattcattgaacacatcatctcttatcaaatt</p> <p>cttgtgaccttccttctggttgataatagcctaataaaaaacaaaaaagg</p> <p>acaaaagcaagtttccagaaagctggtctgacttgccacttctgaaaa</p> <p>gtagtcctgtatgggtgggttctgaaaatgaggaaccaggacttgagag</p> <p>taggcagttgctggaggaagaatgtgagctgcatgggaaaagacaggag</p> <p>gatttacaaagagtgggtgtttaattggggatggaattaggtagttatt</p> <p>ctgatttttagatttttcatatcttttatttggtccaatgaagcagaaa</p> <p>atttaaataaggttattacctttgcctgatttttgacacacctcaaact</p> <p>ataacttgaggttgctaactatgaaacactggcatttaatgatttaaag</p> <p>taaagaa</p>
9	エクソン 25	<p>CUUCUGAGAAGUCCAGAAAAUAAAUCAGAUGGUAUGUAAACAGCGACCG</p> <p>UGUGCUCAAAAGAAGUGCUGAAGGAAGCAACCCUCCUAAACCACUGAAA</p> <p>AAACUACGCUUUGAUUAUUGAAGGAUCAGAUGAAGCAGAUGG</p>

## 【表 1 3】

表 1 3. H B B 標的配列

SEQ ID NO	領域	標的配列
10	エクソン 1	AUGGUGCAUCUGACUCCUGAGGAGAAGUCUGCCGUUACUGCCCUGUGGG GCAAGGUGAACGUGGAUGAAGUUGGUGGUGAGGCCCUUGG
11	イントロン 1	tatcaagggttacaagacaggtttaaggagaccaatagaaactgggcatg tggagacagagaagactcttgggtttctgataggcactgactctctctg cctattggtcta
12	エクソン 2	CUGCUGGUGGUCUACCCUUGGACCCAGAGGUUCUUUGAGUCCUUUGGGG AUCUGUCCACUCCUGAUGCUGUUAUGGGCAACCCUAAGGUGAAGGCUCA UGGCAAGAAAGUGCUCGGUGCCUUUAGUGAUGGCCUGGCUCACCUGGAC AACCUCAAGGGCACCUUUGCCACACUGAGUGAGCUGCACUGUGACAAGC UGCACGUGGAUCCUGAGAACUUC

10

20

## 【 0 1 9 4 】

30

【表 14 - 1】

表 14. HB G 1 / HB G 2 標的配列

SEQ ID NO	領域	標的配列	
13	エクソン 1	ACACUCGCUUCUGGAACGUCUGAGGUUAUCAUAAGCUCCUAGUCCAGA CGCCAUGGGUCAUUCACAGAGGAGGACAAGGCUACUAUCACAAGCCUG UGGGGCAAGGUGAAUGUGGAAGAUGCUGGAGGAGAAACCCUGGG	10
14	イントロン 1-5'	ctctggtgaccaggacaagggaggggaaggaaggaccctgtgcctggcaa aagtccagggtcgcttctcaggatttgtggcaccttctgactgtcaaact gttc	20
15	エクソン 2	CUCCUGGUUGUCUACCCAUGGACCCAGAGGUUCUUUGACAGCUUUGGCA ACCUGUCCUCUGCCUCUGCCAUCAUGGGCAACCCCAAAGUCAAGGCACA UGGCAAGAAGGUGCUGACUCCUUGGGAGAUGCCACAAAGCACCUGGAU GAUCUCAAGGGCACCUUUGCCCAGCUGAGUGAACUGCACUGUGACAAGC UGCAUGUGGAUCCUGAGAACUUC	30
16	イントロン 2	tccaggagatgtttcagccctgttgcccttagtctcgaggcaacttaga caacggagtattgatctgagcacagcagggtgtgagctgtttgaagata ctggggttgggggtgaagaaactgcagaggactaactgggctgagacc agtggtaatgttttagggcctaaggagtgcctctaaaaatctagatgga caattttgactttgagaaaagagaggtggaaatgaggaaaatgactttt ctttattagattccagtagaaagaactttcatctttccctcatttttgt tgtttttaaaacatctatctggaggcaggacaagtatggctcgttaaaaag atgcaggcagaaggcatatattggctcagtcaaagtggggaactttggt ggccaaacatacattgctaaggctattcctatatcagctggacacatat aaaatgctgctaattgcttcattacaaacttatatcctttaattccagat gggggcaaagtatgtccaggggtgaggaacaattgaaacatttgggctg	40

		<p>gagtagatTTTTgaaagtcagctctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgcgcgcgcg</p> <p>cgcggtgtgtgtgtgtgtgtgtcagcgtgtgtttcttttaacgtcttcagcc</p> <p>tacaacatacagggttcattggtggcaagaagatagcaagatttaaatta</p> <p>tggccagtgactagtgtgtgaaggggaacaactacctgcatttaattggg</p> <p>aaggcaaaatctcaggctttgagggaagttaacataggcttgattctgg</p> <p>gtggaagcttggtgtgtagtattctggaggccaggctggagctctcagc</p> <p>tcactatgggttcattctttattgtctc</p>
17	エクソン 3	<p>UCCUGGGAAAUUGCUGGUGACCGUUUUGGCAAUCCAUUUCGGCAAAGA</p> <p>AUUCACCCCUGAGGUGCAGGCUUCCUGGCAGAAGAUGGUGACUGCAGUG</p> <p>GCCAGUGCCCUGUCCUCCAGAUACCAC</p>

20

【 0 1 9 6 】

【表 15 - 1】

表 15. C F T R 標的配列

SEQ ID NO	領域	標的配列	
18	エクソン 1	AAUUGGAAGCAAAUGACAUCACAGCAGGUCAGAGAAAAAGGGUUGAGCG GCAGGCACCCAGAGUAGUAGGUCUUUGGCAUUAGGAGCUUGAGCCCAGA CGGCCCUAGCAGGGACCCCAGCGCCCGAGAGACCAUGCAGAGGUCGCCU CUGGAAAAGGCCAGCGUUGUCUCCAAACUUUUUUU	10
19	イントロン 1	aaggtggccaaccgagcttcggaagacacgtgcccacgaaagaggagg gcgtgtgtatgggttgggtttggggtaaaggaataagcagtttttaaaa agatgcgctatcattcattgttttgaaagaaaatgtgggtattgtagaa taaaacagaaagcattaagaagagatggaagaatgaactgaagctgatt gaatagagagccacatctacttgcaactgaaaagttagaatctcaagac tcaagtacgctactatgcacttgttttatttcatttttctaagaaacta aaaatacttggttaataagtacctaagtatggtttattggttttccccct tcatgccttggacacttgattgtcttcttggcacatacaggtgccatgc ctgcatatagtaagtgtcagaaaacatttcttgactgaattcagccaa caaaaattttggggtaggtagaaaatatatgcttaaagtatttattgtt atgagactggatatacttagtatttgtcacaggtaaatgattcttcaaa aattgaaagcaaatttggttgaaatatatttttgaaaaaagttacttca caagctataaatttttaaaagccataggaatagataccgaagttatatcc aactgacatttaataaattgtattcatagcctaattgtgatgagccacag aagcttgcaaactttaatgagatttttttaaaatagcatctaagttcgga atcttaggcaaagtgttggttagatgtagcacttcatatttgaagtgttc tttggatattgcatctactttgttcctgttattatactgggtgtgaatga atgaataggtactgctctctcttgggacattacttgacacataattacc	20 30 40

		<p> caatgaataagcatactgaggtatcaaaaaagtcaaatatgttataaat  agctcatatatgtgtgtaggggggaaggaatttagctttcacatctctc  ttatgttttagttctctgcat.....ccaaataaggtctgaatgaca  caaattttagaactctccagagaaaagaaagatgctgagggaaaaagca  taggtttgggactcactaaatcccagttcaattcctttctttaataaat  atattcaattttacctgagaaagctctcgtgctctcgaattttatttag  aaatttctctttgtacatgattgatttcacaatccttcttctgcctcct  cttctactttcttctttctagattttcctatctttatgaagattattct  gccttatcctcaacagttagaacaatatTTTTGAAAATCactacggta  tcctgcatagtgatttcccatgccaaactttactaatttccattataaat  tattattttattgatgcctagagggcagatgagtgtagctgctatggagt  gaggagacaaaacataagaaagttatgatccctaccctcaggtaatgatt  cagacatgataattaagtcaacaaattgatagaaactaatcactaactc  tctggctatagtcattctttcaatgaatagctcattactgagtatgcat  gctacagtaacaaaattatataaggctgttgattaaatgttgattaagt  gcatgtcttattcagagtttttttatatttgaaatggaagaggctggac  ttcagtaatttgctataaactgctagtatatgattatttgggggcagtt  atTTTTTaaagaataattttaaatatggaatgttttagcagtttgTTTTT  ccctgggaaaaaccatactattattccctcccaatccctttgacaaagt  gacagtcacattagttcagagatatgtatgttttatacaggtgtagcct  gtaagagatgaagcctggatTTTtatagaaattgacttattttattctca  tatttacatgtgcataattttccatatgccagaaaagttgaatagtatc  agattccaaatctgtatggagaccaaatcaagtgaatatctgttcctc </p>
20	エクソン 2	<p> UGGACCAGACCAAUUUUGAGGAAAGGAUACAGACAGCGCCUGGAAUUGU  CAGACAUAUACCAAUCCCUUCUGUUGAUUCUGCUGACAAUCUAUCUGA  AAAAUUGGA </p>



【表 15 - 3】

21	イントロン2	<p>ttcatgtacattgttttagttgaagagagaaattcatattattaattatt tagagaagagaaagcaaacatattataagtttaattcttataatttaaaa ataggagccaagtatggtggctaatgcctgtaatcccaactatttggga ggccaagatgagaggattgcttgagaccaggagtttgataccagcctgg gcaacatagcaagatgttatctctacacaaaaataaaaaagtttagctggg aatggtagtgcattgcttgcattcccagctactcaggaggctgaagcagg agggttacttgagcccaggagtttgagggtgcagtgcagctatgattgtg ccactgcactccagcttgggtgacacagcaaaaccctctctctctaaaa aaaaaaaaaaaaaggaacatctcattttcacactgaaatgttgactgaa atcattaacaataaaatcataaaagaaaaataatcagtttcctaagaa atgattttttttcctgaaaaatacacatttggtttcagagaatttgtct tattagagaccatgagatggattttgtgaaaactaaagtaacaccatta tgaagtaaatacgtgtatatttgctttcaaacctttatatttgaataca aatgtactccctgggaagtcttaaggtaatggctactgggttatcaaaca aatgtaaaaattgtatatttttgagtacctgttacatgccaggtagaat atctcctctcagccactctgagtggaaagcatcattatctctattttac agaaaagcaaactgaggctcagagagataataactttgccagttaatg aatgatggagccatgattccagctgaggctctgtattgccttgctctcta ggaatggtagtccccccataaagaatctctcagtttcctttccaatca aaaggttaggatccttttgattgccagtgcagaaacccaatttactag cttaagtaataaaaaggaac.....gccgccttggcctcccaaagtg ttgggattagtggcgtgagccactgccccggcctattactcctttagag tgatttagagccatgtttacttatggtaacttgacagtaatgggaataa ccactgatgaaacgtaaaagcctttgtctaattgtttacctagttcttcc ttgtggttcatgaaatttttcatctctgtacagtttgaaaattaagatg ataatatttagagatattttattcctttgtgaagagaaaaaggctttc attaacagaaatcagtggcaataacttaataaatacaatcagctgggtgt</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
----	--------	---	---

【表 15 - 4】

		<p>tcctatagtatTTTAAAGAAAACAGAAAGTTTactagatttcagccagt  tttcagactatTTTaATgtctattcttactataatagaaaatatataatt  tgatcttggtctcattTTTcaaagacctTTaatacatgatttttagtagt  tgaaaatgaagTTTaATgatagtTTtatgcctctactTTTaaaaacaaag  tctaacagattTTTtctcatgtTaaatcacagaaaaagccacctgacatt  TTaacttgTTTTtgatttgacagtgaaatcttataaatctgccacagtt  ctaaaccaataaagatcaaggtataagggaaaaatgtagaatgTTTgtg  tgTTtatTTTTTccaccttgTTtctaagcacagcaatgagcattcgtaaa  agccttactTTtatTTgtccaccctTTTcattgTTTTTTagaagcccaac  actTTTctTTaACacatacaatgtggcctTTTcatgaaatcaattccct  gcacagtgatatatggcagagcattgaattctgccaaatatctggctga  gtgTTTggtgTTgtatggtctccatgagattTTgtctctataaacttg  ggTTaatctccttggaataacttgTgtgaatcaaactatgTTaaggga  ataggacaactaaaatatTTgcacatgcaacttattggtcccactt</p>	10
22	エクソン 3	<p>GAAUGGGAUAGAGAGCUGGCUUCAAGAAAAAUCCUAAACUCAUUAUG  CCCUUCGGCGAUGUUUUUUCUGGAGAUUUUAUGUUCUAUGGAAUCUUUUU  AUAUUUA</p>	30
23	イントロン 3	<p>gatctcatttgTACattcattatgtatcacataactatattcattTTTg  tgattatgaaaagactacgaaatctggtgaataggtgtaaaaatataaa  ggatgaatccaactccaacactaagaaaccacctaAAactctagtaag  gataagtaaaaatcctTTggaactaaaatgtcctggaacacgggtggca  atttacaatctcaatgggctcagcaaaataaattgcttgcttaaaaaat  tattTTctgttatgattccaaatcacattatcttactagtacatgagat  tactggtgcctTTtatTTTgctgtattcaacaggagagtgtcaggagaca  atgtcagcagaattaggtcaaatgcagctaattacatatatgaatgTTt  gtaatatTTTgaaatcatatctgcatggtgaattgTTTcaaagaaaaac  actaaaaattTaaagtatagcagctTTaataactaaataaataacta</p>	40

10

20

30

40

【表 1 5 - 6】

		ctcccactgttgctataacaaatcccaagtcttattttcaaagtaccaag atattgaaaatagtgctaagagttttcacatatggtatgaccctctatat aaactcatttttaagtctcctctaaagatgaaaagtcttgtgttgaaatt ctcaggggtatttttatgagaaataaatgaaattttaatttctctgtt	
24	エクソン 4	AAGUCACCAAAGCAGUACAGCCUCUCUACUGGGAAGAAUCAUAGCUUC CUAUGACCCGGAUAACAAGGAGGAACGCUCUAUCGCGAUUUUUCUAGGC AUAGGCUUAUGCCUUCUCUUAUUGUGAGGACACUGCUCCUACACCCAG CCAUUUUUGGCCUUCAUCAUUGGAAUGCAGAUGAGAAUAGCUAUGUU UAGUUUGAUUUUAUAAG	10
25	イントロン 4-5'	acttccttgcacaggcccatggcacatatattctgtatcgtacatggt ttaatgtcataaattaggtagtgagctggtacaagtaagggataaatgc tgaaattaatttaatatgcctatttaaataaatggcaggaataattaatg ctcttaattatccttgataatttaattgacttaaactgataattattga gtatcttctgtaaactgcctctgttgtagtttttttttctcctaataca tggtatcatTTTTTTTggaatccatgggttctgttaagatgactcacac agcctacataaaaagtaattgacaaaatatcatcttatagtaaaatgcc catatctttatgttcagcaagaagagtataatatatgattgttaatgat aacccaaacaacaaaagatttcaccttaactgggtgtcataagtagtag tatccaccgccttattttgagttggatttttatcatcctatgagcccta caaatttaaagtttttggacagcacgtgcattgaaccataagaacct actctgcttttctgcatgtattgtccagacaagagaccaaattgccgag gcatcatttaggtgaattctaattaacatttagctaccttacaaccaca attcaagggtgtttcaaaggcatgtgcttgcatcatcctgattcactac catgtgttactaacttggatctgcaaagtcattataaaaagctgttttg atggacttatttggatattgctttacccttcttctctcttttcttttat caatgtaaaaacattatatgttaaataacttggcttttaagagcatagat ctgaaatctgcctctagcaaataaccataacacttctaagatatacct	20 30 40 50

【表 1 5 - 7】

	<p>gcaagggtcaattgtgttgtaaaaccttgataaccatactttattgtttca  aaaaagccttttatgaaggcagaagttaaaaaaaaaaaaacaaaaaac  agagtccacagttatcacctcagctacaatctcatcagttcacaagtac  cagcaaaacatgtgataagtcaacaaatgttttatttcaatctgaacat  tttacgtaagtgaagactttgttagatatcatttggaatgtggaatcta  cacagttggcatatcagagaagggtgaattcagtttaataaatgtttat  agaaagtgcttgttatcataatgataatagctcaggatgtgcatgacaa  gcttttaagcgattgggtacactatctcatttgatcttctgcacaacta  ttaatggtaggtactattatccctatcttatggataagtaaactaagat  ttaaaaagtacagaacatgggtgtgaacactgcttcaaaatttctaaat  aggtaaatacagatctctaaactggagggtgtccaaccactagggaca  atagagtactgatatttagtggtcagactgtaatgcgggaagagacagg  catgggctaaacgggtgtagagatcaaataaggggcagggttagtttgta  aacatgtccatatgtaacatttagcacaaatacaggatataggtgcttt  cagaccagctgcattgataaaaagttaggtgggtattgtatctgtcttc  ctttctcaatgttgcatatctgtgttcttgcccagtttgcttcatctct  ctagccacacttattggcctacaatggcatcatcaccaaagaaggcaat  cccatctccgtgtggctttgggttgctccctaaagtaaacttggtgttt  acttttcccagggtctcatgctttcccatatctgacctgttttgcctca  tggccaggatatgtgggacctttcctacaatgttccaaagtttgtaata  gagctcttctctgctttgttccaaattctgcaacattttactttaaata  atgaatttaaatacaaaacaaacttgagctttgcctatacttttcaagaa  tgcagagataactaaattaataaaaatattcattgagtccttactgtgc  acacagctctatgttaagccttggtgcagaactcaaagtcactcgagatt  aagcctgttactaagttatgtgcaatttagctcagtggtttccccac  ttcatattgctctgataatgttttggaattaactgccttgattccttct  tttctctgcttgctctatacactatttattattctacaccatctcaaatt</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---

【表 15 - 8】

		ctaactcctcaagaaaatccttccagatgatttttctaaccaggagttt taacttccttttaactaccctattacttttctacttccttaactcatcta tcatattataatthagttatttatatactaggtcgccttgaagaagggat tgtgttttcataaatcttaataatccctgaggcatcaagtacagtgatt tgcatttactaaatgctcaacaaatatgtgagggattcacttgaaacta atattagataattcccagtc aaagtgatctaataagcaaatcaattcttc agttttataggcaaagtatgactctggttttccataatcataattaatt tgtcaactttataattttaattaagtaaatttaattggtagataaataa gtagataaaaaataatttacctgcttaactacgtttcatatagcattgc atttttctttgtaaaatttaagaattttgtattaataaacttttttaca aaagtattaattattcagttattcatcatatacttttattgacttaaaa gtaattttattcaaaagagtttagtataggactacatgaaaaattcaagg ccaaggcttaatttcaaatttactgcctttggctctatcttttaaaac aaaacaaaaaactcccgcacaaatatcaatgggtattttaagtataatatc attctcattgtgaggagaaaaaataattatttctgcctagatgctggga aataaaacaactagaagcatgccagtataatattgactggtgaaagaaa catttatgaacctgagaagatagtaagctagatgaatagaatataattt tcattacctttacttaataatgaatgcataataactgaattagtcatat tataattttacttataatatatttgatttttgtttgttgaaattatcta acttt	10
26	エクソン 5	CUUUAAAGCUGUCAAGCCGUGUUCUAGAUAAAAUAAGUAUUGGACAACU UGUUAGUCUCCUUUCAACAACCUGAACAAAUUUGAU	20
27	イントロン 5	tacctattgatttaatcttttaggcactattgttataaattatacaact ggaaaggcggagttttcctgggtcagataatagtaattagtggttaagt cttgctcagctctagcttccctattctggaaactaagaaagggtcaattg tatagcagagcaccattctggggctctggtagaaccaccaactcaaagg caccttagcctgttggttaataagatttttcaaaacttaattcttatcag	30

[illegible]

【表 15 - 10】

		agaatttctttataaatatgttgattcagttcatttttgtagattataa aacaggtaaaaaaggataaaaacattttatgtgaattaaagggaataccta atttttgtgtagagtttatttagcttttactactctggtttatggatcat cacaccagagccttagttactttgtgttacagaataactaatatgagtg aatgaatgacttacacaagtcactgcttaggataaagggttgagtttg tcagctagagtatgacagaaagtatctaagttttggagtcaaatagcac tttgtttgaatcccagattgcatgcttactagttatgtgaccttagtca agccacttcacctcactgagtccttgcttttttcatctctaaaatagag ataccaccgctcataggctgtcataagggatagagatagcatatggaa tgagtctgtacagcgtctggcacataggaggcatttaccaaacagtagt tattatttttgttaccatctatttgataataaaataatgcccatctggt gaataaaagaaatatgacttaaaaccttgagcagttcttaatatagataat ttgacttgtttttactattagattgattgattgattga	10
30	エクソン 7	GAUCAGAGAGCUGGGAAGAUCAGUGAAAGACUUGUGAUUACCUCAGAAA UGAUUGAAAAUAUCCAAUCUGUUAAGGCAUACUGCUGGGAAGAAGCAAU GGAAAAAUGAUUGAAAACUUAAG	30
31	イントロン 7	ttgttccaataatttcaatatgttagtaattctgtccttaatttttta aaaatatgtttatcatggtagacttccacctcatatttgatgtttgtga caatcaaatgattgcatttaagttctgtcaatattcatgcattagttgc acaaattcactttcatgggctgtagttttatgtagttgggtccagggtgt tattttatgctgcaagtataattatactgatacgttattaaagaatttcc tacatatgttcactgctgctcaatacattttatttcgttaaaacaattat caagatactgaaggctgattggtaactcacatggaactgggagagtata caattctgaaccaaatagatgattctctattattatatcttaatttatg tgttatgggtatattaaacatgaaaaaattgtatttggttagaatatgt ttgctcttccttaactcgggaatgacatagggtaatattcacagattgg gttcctataaatcctccacttgaagtgaagtcagttcaagtaatgaaag	40



【表 1 5 - 1 1】

		<p>ctacctcctgagatagaatcagtacttggcacctatctctagtgttctt</p> <p>tcacctcatataaccttttactgattagtaaagattatatccaacaaag</p> <p>aaagtacagcacagactgagatatgattactgagataaatttgggcaaa</p> <p>atataaactacagcatttctgtagcaatgagaccatttttcttcagttg</p> <p>agctccatgttctacaaacttcaatcaaaaaagggttctaggagactcag</p> <p>tgaaagttgatacactgttcaaggaacaaataatttcagcacatgggaa</p> <p>tttcacagggaaaaatataactaaaaagagaggtaccattttggatggtg</p> <p>tcaatatgggttatgaggaattcaggctgctgagtccagtggtacaatgg</p> <p>aaactgagctgcaggtgtgtgattgtaacaacaaaagaaatgctgaaat</p> <p>attaagtcctttgccatgtaaataaaaaagagtattttatttcccaaac</p> <p>attattgctcacctgtttttgttatgcctttcaagataaatccaggaaa</p> <p>ggaattgcatttttctttccagaaaacaagttcttgggggaattgttcaa</p> <p>ttggtagatgttgtttttctcattaacaagtgagtgtccatcacactt</p> <p>gctgagtgtccatcacacttgctctctgcattactcctctgcctgcaa</p> <p>acacatatatagcaaggggtgatgacaaggatatcagaggggtctggtttt</p> <p>ctcaaactcatgataaactcatggctgggtcattcttggtgctgatttt</p> <p>actttgttttttgttgttattgttccctcttccctcaaaagatgaaatct</p> <p>atccctcttacttggaatttctctttgatatatagcgaatgtttgggtg</p> <p>taacctgtataatctggcatgaaattgtcactcgaaaaggctagaagtg</p> <p>ttgacataaatatgggacagcaagagttgctcctactcaagagagcaaa</p> <p>tataatgttctggaagagattggcagaattcacatcaaaggagtgatta</p> <p>cttcagcctgggccaactgttgtactgggtcaaaaggctgtgcaaagctct</p> <p>ctgaaaatccactcttttattgctcttttagtaataaagtcactttcaat</p> <p>tttaaaaataacaaactgatataatttttatgactcataaaatgttagca</p> <p>attatattatggagaatctactttctgggtgattcttacaatgttctt</p> <p>ggatctatttttttttcttatagtacctattcttccatttttctcagc</p> <p>tctagttaatatatttcaacaacagttcaacaaatttaacatttttata</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---	---

【表 1 5 - 1 2】

	<p> aaaagtgtttcctatcattttataaataccagcctagtcctatgttattc  cttttcttggttgaggagaaaggacacacattgtaaattcaaatatagac  ctctactgtgctatttaatcttggttaacaactccacaaaggagatgaca  tgttttccttctatagaggttagattctgtaaagttagagggaagagtga  cttgcttaagatggcataagctgtaactggcagaaccaggattcaaagc  caggtgggatgccaaaatcataatctgtcttcagtggtcaagttactgaa  attggtaaacattagacctaataatagacggaattgcaatccgggttgggc  acattaaactccattttcttcatcaatgtgctcagattacattttactt  ttcaggctaaaaatggaaaaaagagtcctcttagttctgcacttgag  aatgagaatagcttttctgaattatacaaggaagaagaactaatgccca  aatgccaggtacccacatgcactatgccatggcacagctgttgccccct  ttcaccagagccctctctctgtatcctgggttgacctttccttgggcaag  agctgggtggggaggatcacaagtgactccaatttggttggttcggga  agactgggaccgagctgaaggcagtggtgtcctctgcactccctgtttt  ctgtctgctggagcactgaagcctcacatatgtattaaaaaataattt  ccatttgcatttcagactagaagattgaacgtatagtgtaatgtgattg  caaataattatattgaaatgagacagagaggatgtagtatctactgtca  taatttttcaaaaccacctgcaacttgaattaaaagaaccacttgggt  tttttttttgtttcaaacgcaaactcctggaaacctactgagactcatt  cagtcagtatctctaagaggcaagcttgagactgtatatttaaaagca  tctcaggtgatttttacacatgctaaggcttaagaaccacttctctgta  gcttatatgttattttcaatgttcctcaaagccaagttagaatttccaa  agtgttaagaatccattagacaatcacagaattgtctttttcctttata  aatcttgcaatgttggttctcatttccatacttaattacttaaaacacca  accaaccaacaagcaaaaaatgattagtctaactaatattacaagttaa  taatgaagtaaagggtttaaaaataatgtcataataatgttaataacaaa  ttattaattataattttaaaaataatatttataattttaaaaataatattt </p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---

【表 15 - 13】

		acaagtactacaagcaaaacactggtacttttcattggtatcttttcata taaggtaactgaggcccagagagattaaataacatgcccaaggtcacac aggtcatatgatgtggagccagggttaaaaatataggcagaaagactcta gagaccatgctcagatcttccattccaagatccctgatatttgaaaaat aaaataacatcctgaattttattgt	10
32	エクソン 8	ACAGAACUGAAACUGACUCGGAAGGCAGCCUAUGUGAGAUACUCAAUA GCUCAGCCUUCUUCUUCUCAGGGUUCUUUGUGGUGUUUUUAUCUGUGCU UCCCUAUGCACUAAUCAAGGAAUCAUCCUCCGGAUUUAUUCACCACC AUCUCAUUCUGCAUUGUUCUGCGCAUGGCGGUCACUCGGCAAUUUCCCU GGGCUGUACAAACAUGGUAUGACUCUCUUGGAGCAAUAAACAAAUA	20
33	イントロン 8	gtaccataatgctgcattatatactatgatttaaataatcagtcaatag atcagttctaataactttgcaaaaatgtgcgaaaagatagaaaaagaa atttccttcactaggaagttataaaagttgccagctaatactaggaatg ttcaccttaaacttttcctagcatttctctggacagtatgatggatgag agtggcattttatgccaaattaccttaaaatcccaataatactgatgta gctagcagctttgagaaattctaaagttttcaagtataagactcaatt tatacaaagctaattggataaacttgtatatgattaagaagcaaataaa tacttattatgcttttttgctgtttatttaaataatttaaccagaaaat aagtcactgtgacagaaataaaaatgagagagaaggggtgagccactctt aggtagttctggcattatttaatctaggccagaggttgcaaagggtgtc ccatagaactaattttggctcctagacctgtcttatttaacctttcatt taaaaaatttgtattggttgccagcaattaaaaattgggagatgtctca cacacacacacacataaacacacacactcatgtgtgcagcctcttttga agaattggaataactagtcaactgcgtcctccttttccacaagctgtga cagctccctgctcacagagcacctgccctctcctgttcacatcatgctctc ttctcagtcccattccttcattatatcacctatttggctcctgagactaa gtgagtttgagatctgtgatttagacaaagtgggtgaatctagctctgaa	30 40 50

		<p>tcataagtaagtagctctggaatcatcttgtcttctggttagccattga</p> <p>gagagaaatagagagagagagagagagagagaaagaaagaagaacagat</p> <p>ctggggagagtagcactgaatgggagcatagagacagagaaacagatctag</p> <p>aaaaccaaactgggagaaaatgagagaaaccaaagagaggttagagagg</p> <p>agcagagaagaaaatgaagaagcaaggcaaggaccaggctttttcatta</p> <p>tttcttatggccaagacttcagtatgctgtggacttaattcttccttatg</p> <p>ctcctaccttccttagggaaactgatttggagtctctaataagagccctt</p> <p>cttttagaatcacagtttgatgccttaaaactagttatataccttcaca</p> <p>tgcttccttaaccacagaagtgatgctaataaggcccttaataaggag</p> <p>cgtgctattaagatgaagacattcattttttttctccgtccaatggttg</p> <p>attaaggcacattagtggttaattcagggttgctttgtaaattcatcac</p> <p>taagggttagcatgtaatagtacaaggaagaatcagttgtatgttaaata</p> <p>taatgtataaaaagttttataaaaatatcatatgttttagagagtataatt</p> <p>caaatatgatgaatcctagtgttgcaaattaactttagaacactaat</p> <p>aaaattattttattaagaaataattactatttcattattaaaattcata</p> <p>tataagatgtagcacaatgagagtataaagtagatgtaataatgcatta</p> <p>atgctattctgattctataatatgtttttgct</p>
34	エクソン 9	<p>AUUUCUUACAAAAGCAAGAAUUAAGACAUUGGAAUUAACUUAACGAC</p> <p>UACAGAAGUAGUGAUGGAGAAUGUAAACAGCCUUCUGGGAG</p>
35	イントロン 9-5'	<p>aatttttaaaaaattgtttgctctaaacacctaactgttttcttctttg</p> <p>tgaatatggatttcatacctaataagggaataaaattagaatgatgatata</p> <p>actggtagaactggaaggaggatcactcacttattttctagattaagaa</p> <p>gtagaggaatggccaggtgctcatggttgtaatcccagcactttggggag</p> <p>accaaggcggttggtacactgaggtcaggagttcaagaccagcctggc</p> <p>caacatggtaaaacccggtctctactaaaaatacaaaaaattaactggg</p>

	<p>catggtggcagatgctgtagtgctcccagctgctcgggaggctgaggcagga gaatcacttgaacctgggaggcggaggttgacgtgagctaagatcacgc cactgcactccagcctgggcaacaaggcgagactctgtctgaaaaagaa aaaaaaataaaaaataaaaaataaaaagaagtggaggaatatataatgcaa tataaaagctttttttatttttaagtcatacaatttgtttcacataaca gatcaggaaataatacagagatcataagttttggagctgggtttgaatc ctggctctgccatttactttctgtgtaatctaagtcaagttactgaact ttgtggggccctctggctctccatgtgtaaaatggagaatattaatattt accttgcaagtttgttgtgaagactgaaggagagaatttaggtaaaaca ttcatcagagtacatgcacacagttgttcctcaataaacattagcttc tctgattgcaagttccagtctaaagtgctttatatataccagccaataa aaggatgcgagagagatataccagtgtattgttttctaccatttttaaac ctattttcatccactgttaciaaattctatcactgctccacataaaaa atattatcaatgatttttagtctctgaagtgcataatttgattattgag cacacctgttgaagtttttagtttcttctcacttacatgggttggtgtaa ggtaggagggtataaaaccagtgtcctaggtctaaatctttcttaatgtc atactttggattcattgatataagtaacttgagcaccagcgcttcattt tacttcatttttttaaagatatagtaagagtaattcccatctgcctagca aaattgttttgtagaaaagtttggtgatcagatttattttactttgatt ttaggaatttcaagtgctcttcgtcggcatgaaggaaaaatatgcagttt gacattttctactactttcaggtcattattttcctactctggtgcaaaa accctcaattcctgtctcactccatctaatacaataggtagcatgcttg agcccttactatgtgccaggcactaggataagcacttttatatgttttgt cccaattaattctcacagcatttctatgacctaaataaaaattaatattt tcatttcaccaataataaaaatggaggcttcaaaaagtttagggacttgg ctcagctcacacaactggcaaggactgaaaatggatttttagtcccaaat gtcataggctagagccctttcactaaactgttgctcttccatctgggtggc</p>
--	---

【表 1 5 - 1 6】

	<p>atcctcttcctccagtcctttgtcacctaaactctgggcaccccttgatg gcatttacttatgatggatgcttggttaaacttcctgtttgcgacttc aacgtccatataaatgagtcctccaatactgtacttagaacttatattt tgtagtgacttctttaaaagctttctctcttagtcatatcctgagtttt gttagcacctggacttaccttactttggaaatggtgactctgaaatct ctttctcagcttggaatttcctaactctccaactgtttgagtcctttta ttctacatttactgcctttccatttcacaggatttctagtctctttta ttcttccttttgaactcctcctgatttaacctctgcttattcgaagaac aataattttattctctcagctgcactctcaattcccttttccttttggg gatttttctttttcctacagaacacttactttatcagttttggagaagg aagtgtatctgggtaacagtagtgctatctgttgactctagtcaactg taagttttatacattttattgtttaaaccttatatgggtctataatcctt cttgggaaatcctttcatttgtctttaatttcctttaccatttccctaa aggctattccagatttttatcacattcacaaaattcccgctcttttctca ggatctgttcacccccagtagatagccttgctctccacaatacatggag aaaatagaggccaccgtcatatttgaatgtttccaacttctctcttcac ctttggaattatctttttcttcttttgtgtctaagagaaagatgtatac ttcttcttacccttgctctgaactactctattttgcttcattctctcaga acaggggaccagcaattattcttctcctccagaagcttcaacatcttttgt caactgactccttctcatgttttaaataattttcaagttaaacaatttctt tctgactttcgctcacgcaacctcatgccccaaaccttatcactcttc ttccctttgctgtcaaggctgttctcacttcttcactttttgtggactt ctccccactacaacatagattctgctatcaccaatctattaaaactgtt atactcttgtggaatttatcatttaatttagcttcagtgaaccgttctt tccagattattttggcctcagaccatgacttctaagtctgccgtgcttg ccacttaagtgatgatgggcccagtggtccccacctaggcctctgtgtt agtctgttttcatgttgctgataaagacataaccaagaatgggcaattt</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	---	---

【表 15 - 17】

	<p>acagaagaaaggggtttgagggactcacagttccatgtgactggggagg  cctcacaatcatggtggatgatgaaaggcatgtctcacatggaggcaga  taagagcatagaacttgtgcagggaaacttccctttattaaaccaccag  gtcttgtgagacttcttcactatcacgagaataggatgggcaagaccct  cccccatgattcaattatctcccactgggtccctcccacaacacatggg  aattatgggagctataattcaagatgagatttgggtgaggacatagcca  aaccatatcagcctccttctggctttttatgttctccgtgggtgacctc  tctcaggctcaagtgataaccaatgtgctgatgactctcaaatgcgcat  ctctggcttcagtttcttccttgaacttcatacatatgtttccaaattt  cctgcgtgtacctcaaggttcttgttcatcacttcccaagcttcataaa  cgcactcattttagtgtattctctgtctcctttgatagcatccctgaga  ggcaagtccctgggtgagttatatacaactcctcccttgctccaaacctg  agagtaagtaacattcctattaacatattaggaagctgaggcttagaca  gtttaagtaactcaagcatggttacacaactagctagggcagagctaaa  atgtcaggctaggcttctgtgactccaaagccctttctcacttagcata  tcatcacttatttttttttttaatacacatatatgatttttttttcttta  agagatagaatcttgctctatcacgtgggctggagtgcagtggcacaat  catagctcactgtaaccttgaacttgggctcaagtgatccctcctgcctt  agcctactgagtagctagggctacagacacacaccaccatgcctagcta  attttattttattttattttattttttgagacagagtctcactctgtca  cccaggctggagtgcagtgggtgcgatcttggctcactggaacctctgct  gcccgggttcaagcgattctcctgcctcagcctcctgagtagctgggat  tacagggtgcctgccactgtgccagctaattttttagtagag  acgggggtttcaccatcttggccaggcttgtcttgaactcctgacctcgt  gatccactcgcctcggcctcccaaagtgcctgggattacagggtgtgagcc  accacgcctggccacctacctaatttttaattttttgtagagacaggg  tctcactacgttgcccaggctgggtcttgaactcctgttctcaaacaatc</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---

【表 1 5 - 1 8】

		<p>ctcctgcctcggacaccccaagtgcagggattacagggcatgagtcattg  cagctgacctgtatataatgatttttagtatatgtaaatacatatatta  ttaaattgtaaataataataaattgtgtggagtgatatccattgaaatg  ttaaacaatagttctcagtgggtacaactacaggtgatttctcttttctta  tttctggttttctgtgttttccaaatttcttgaaatgtgtcttctgtaa  tcagaaataaaagtatttagtaacaacagtcttccactggtacaagtgc  ttattggataaaaagtcccacttctaagcatgatactcacaacttttagg  ttaatagcctttgtcaccttgccatatacatctgatccagccactcaca  ccattcctgagatataattttgttcctttgtgcctaaatcattgtgcatg  cagatccatcttcctggaacacctataaccatttcttagtcctgtgaaa  tcctacttacatccttcatagcctagcatgtatgtcatttatttggtca  agggtgagttggttggttcttctgaatgtactgccatatgacgtgggtgtg  atttcaattgtagcaccaagctcattgcaatattaattcgtttgtcatt  ctcccatgtaggatgtttgaagtagtttctaacacagagattataactca  ataaatatttattagataaataaataaggaataacaaatgcctt  tgtctcattttaaaatactttcattgttagctacccatataataaaaaa  ctaaaagcagtagttttcaagcatgattgtttatgtatgccttaaaaga  attttgaaaacctatgtaccctgacacacttttaagttaacttataaa  tttttcaacatagttttaagtgggtggcaaatgatgtagtttcttgtgta  ttttaaactgcttaagtatgctatacatggatttcttcaaaacctgaa  gctgcagtttcagtgcattcaatttatggaaaagaaattaatttataaa  attggttcttattgtcaagtcaatcagctaaatataacttgctttctgt  caggaaaagtctgactttaaaatacagataagtaataactattattaat  taattaaattattaaaattaaaataattaaataatttggttaattaaaat  gccttattcccctacttatttctgcaatttgactctaagaatagatagg  acatgtagattgccttaggtttgaaatctgggtgaaataagatactgcc  tccttcagtatttctgcctttgcttttatgggagcctctttcaagaaaa</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---	---



【表 1 5 - 1 9】

		agtcattctctcatgggtccctttgtttgagtcccagagggttttcctact ccagaaagtgcaacgtagtgagactagtactatactcccttgcatggta agtgagaaggctgtctgtataaaatgaggggaaggactcatgagagggaa gtaggtcaggagaaatgatagggttctcaggcagggttaattttaggaaag agtgaatagagtcctttaaacaagggtgcatctgcttcctcctgatcaa tctttaggactgtttactttgatttgaagaccactatgctaaagcttcc cacgggggcaatagtgaggcaaggaattttttaaagggaattacttctt cgtagctacttttgtgaaatgaattcatttgaattatctggcaatctct tcatatttatattcaacaataattacttaaagaaatgctttgagcttct cagaggagggtgctaccagtgtgatggagtagaattcagatttgggtag tgactttaaagctgtgtgacttttagtcatttaactgctgagtcacagtc tacagctttgaaagaggaggattataaaatctatctcatgttaatgctg aagattaaataatagtgtttatgtaccccgcttataggagaagagggtg tgt gtattcagtctttactgaaattaaaaaatctttaacttgataatgggca aatatcttagtttttagatcatgtcctctagaaaccgtatgctatataat tatgtactataaagtaataatgtatacagtgtaatggatcatgggccat gtgcttttcaaactaattgtacataaaacaagcatctattgaaaatatc tgacaaactcatcttttatttttgatgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt	10
36	エクソン 10	GAUUUGGGGAAUUUUAUUUGAGAAAGCAAAACAAACAAUAACAAUAGAAA AACUUCUAAUGGUGAUGACAGCCUCUUCUUCAGUAAUUUCUCACUUCUU GGUACUCCUGUCCUGAAAGAUUUUAAUUUCAAGAUAGAAAGAGGACAGU UGUUGGCGGUUGCUGGAUCCACUGGAGCAGGC	40
37	イントロン 10	tcttttgttcttcactattaagaacttaatttggtgtccatgtctcttt ttttttctagttttagtgtagtgctggaaggatTTTTGGAGAAATCCTTACA tgagcattaggagaatgtatgggtgtagtgcttgtataatagaaattg ttccactgataatttactctagttttttatttcctcatatttttcag	50

	<p>tggcctttttcttccacatctttatatattttgcaccacattcaacactgta tcttgcacatggcgagcattcaataactttattgaataaacaacatcatc cattttatccattcttaaccagaacagacattttttcagagctgggtcca ggaaaatcatgacttacattttgccttagtaaccacataaacaagggt ctccatttttgttaacattacaattttcagaatagatttagatttgctt atgatataattataaggaaaaattatttagtgggatagttttttgaggaa atacataggaatgttaattttattcagtgggtcatcctcttctccatatcc caccctaagaacaacttaacctggcatatttgagatacatctgaaaaa atagtagattagaagaaaaaacagcaaaaggaccaaactttattgtc aggagaagactttgtagtgatcttcaagaatataaccattgtgtagat aatggtaaaaacttgctctcttttaactattgaggaaataaatttaaag acatgaaagaatcaaattagagatgagaaagagctttctagtattagaa tgggctaaagggcaataggtatttgcttcagaagtctataaaatgggttc cttgttcccatttgattgtcatttttagctgtggtactttgtagaaatgt gagaaaaagtttagtgggtctcttgaagcttttcaaaatactttctagaa ttataccgaataatctaagacaaacagaaaaagaaagagaggaaggaag aaagaaggaaatgaggaaga.....gaggctgaggcaggagaatggcgt gaaccaggaggcagaacttgcagtgagccgagatcgcgccactgcact ctagcctgggtgacagagtgagactctgtctctaaataaataaataaat aaataaataaataaataaataatcagtgccttttcttctctgctacctcc tttcttctactcagtttttagtcagtagtattatcttttttcagattta tctttgtattgttaaactctgcttatgcttctattactttatttattagc tttaaatagataccttttgactttcagcttttcttaataaagcaatcagc aaatttcctttacactccacacttataccccatttcctttgtttgttta tttggtttttacttctaacttttcttattgtcaggacatataacatatt taaactttgtttttcaactcgaattctgccattagttttaatttttggt cacagttatataaatctttgttcactgatagtccttttggtactatcatc</p>
--	---

【表 1 5 - 2 1】

		<p>tcttaaatgactttataactccaagaaaggctcatgggaacaatattacc  tgaatatgtctctattacttaatctgtacctaataatatgaaggtaatc  tactttgtaggattttctgtgaagattaaataaattaatatagttaaagc  acatagaacagcactcgacacagagtggagcacttggcaactgttagctg  ttactaacctttcccatttcttccctccaaacctattccaactatctgaat  catgtgccccttctctgtgaacctctatcataatacttgtcacactgta  ttgtaattgtctcttttactttcccttgtatcttttgtgcatagcagag  tacctgaaacaggaagtattttaaatatatttgaatcaaatagagttaata  gaatctttacaaataagaatatacacttctgcttaggatgataattgga  ggcaagtgaatcctgagcgtgatttgataatgacctaatatgat</p>	10
38	エクソン 11	<p>CUUCACUUCUAAUGGUGAUUAUGGGAGAACUGGAGCCUUCAGAGGGUAA  AAUUAAGCACAGUGGAAGAAUUUCAUUCUGUUCUCAGUUUCCUGGAUU  AUGCCUGGCACCAUUAAGAAAAUAUCAUCUUUGGUGUUCCUAUGAUG  AAUAUAGAUACAGAAGCGUCAUCAAGCAUGCCAACUAGAA</p>	20
39	イントロン 11	<p>aaactatgtgaaaactttttgattatgcatatgaacccttcacactacc  caaattatatatttggctccatattcaatcggttagtctacatatattt  atgtttcctctatgggtaagctactgtgaatggatcaattaataaaaca  catgacctatgctttaagaagcttgcaaacacatgaaataaatgcaatt  tattttttaaataatgggttcatttgatcacaataaatgcattttatga  aatggtgagaattttgttcactcattagtgtgagacaaacgtcctcaatgg  ttatttatatggcatgcatataagtgtatgtggtatctttttaaaaga  taccacaaaatatgcatcttttaaaaatatactccaaaaattattaagat  tattttaataattttaataataactatagcctaattggaatgagcattgat  ctgccagcagagaatttagaggggtaaaattgtgaagatatgttatccct  ggctttgaacaaataccatataacttctagtgtgactgcaattctttgatg  cagaggcaaaatgaagatgatgtcattactcatttcacaacaatattgg  agaatgagctaattatctgaaaattacatgaagtattccaagagaaacc</p>	30 40

【表 1 5 - 2 2】

	<p>           agtatatgggatccttgctgtgttcactatgtaaattgtgtgatgggtgggt            tcagtagttattgctgttaaattgttagggcaggggaatatgttactatgaa            gtttattgacagtatactccaaatagtgtttgtgattcaaaagcaatat            ctttgatagttggcatttgcaattcctttatataatcttttatgaaaaa            aattgcagagaaagtaaaatgtagcttaaaatacagtatccaaaaaat            ggaaaagggcaaaccgtggattagatagaaatggcaattcttataaaaa            gggttgcatgcttacatgaatggctttccatgtatatactcagtcattc            aacagtttttttttagagc.....gaggaggtggaaacgaatgtacaa            ggatgggaggagaaaagggagagagactttttttttttaaggcgagag            ttactacctatctaactcttcgcattcttgaagtctcagaccaaattcc            catcggtttgaaagcctctagggatattctatctattgtatacttctgtt            atgtacaaaattaatttgccaattaattgtgaactgttttataaactat            cttaaaatggtagttaaatctttgggtagtatttagctttctccagg            attatgacttaccttctaaattagacatacaatgcctaggagtcaagga            ctattttgcataaattccagtcttcttttacaatgcctagaatgattgt            taccacagaaatattcattacctgggagaaaggatgacaggaggggcag            aatgaatggagagaggtcggtgagaatgaggtgctgaggatggacgagga            agaaagctgttttagttgggaggataggtgacagaagcatggaaaggaa            ttgccttggacccatggaagcccagtgaagatacttagatcctgcaggg            gtgtgaataatgttcttttagtttctcttcttaggaggtttgttcattt            tgggagatttcttttgaaaagagtgaacttaaatggagaaaagtacat            tttagtatgttgataacatttgaatttgtaaaatggacctatggatgat            ctacacataatttatatacccataaataacacataattttaatttttgggt            attttataattattatttaatatgatcattcatgacattttaaaaattaca            gaaaaatttacatctaaaatttcagcaatgttggtttttgaccaactaaa            taaattgcatttgaaataatggagatgcaatgttcaaaatttcaactgt         </p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---

		gggttaaagcaatagtgatgatgattacattagaaggaagatgtgcc tttcaaattcagattgagcataactaaaagtgactctctaattttc
40	エクソン 12	ACAUCUCCAAGUUUGCAGAGAAAGACAAUAUAGUUCUUGGAGAAGGUGG AAUCACACUGAGUGGAGGUCAACGAGCAAGAAUUUCUUUAGC
41	イントロン 12-5'	taactaattattgggtctagcaagcatttgctgtaaatgtcattcatgta aaaaaattacagacatttctctattgctttatattctgtttctggaatt gaaaaaatcctgggggttttatggctagtgggttaagaatcacatttaag aactataaataatgggtatagtatccagatttggtagagattatggttac tcagaatctgtgcccgtatcttggtgtcagtgtatttggttgccata gtatagtttactacaaatggaaaactctaggattctgcataatactgga cagagaagatgtaaatatctgttagttccatcatagaccctgccactcc aatgtacacaccagcttttaggcttcttggtatagataaacatacatttt caaaatttttcatcataattttcataacaaaataggaaggcaaattgatg tcacttggcttaaaatctataatatttaaaataaacaggacaaatgcat taacattggtgggggaggaggtcccttagtagaaacactcttggtccaa gcatttttaaagctgtcaaagagatgtaaatatagataatgtatgtcaag gagagagctttgtgggttaaactgtaactttcagtttaacaattattgg tgactctgatgtcaaattgttctcaagctttatctgaacaaaattcttc tcactttgttgccaaagtcgttaacaagaaatcacattgactcattgat gttttggtcctttcccttactttctgttgctttccaaaagctgagaca ggaaactaaccctaactgagcacctgcaattgcctggtagtattctagt catgtgtgtacttttgtgtgtatgtaatcccttacagctctgcaaagt aagaattgttctccctgctttacagaagagatcataagataattgaggc tgttagatgttaacttgccaaaagccatacaggaaaatggtagagtcac agtttgaaccagggtccttttgattctttacattaaaccatgctttgatc ttggaaatacactgtaaggcaataaatcaatagatacggataattcaca ggcttctaaataaatggaagttgattgtttttatctgtgagccaaagta

【表 1 5 - 2 4】

	<p>agacttatttctaagaattccacaaatttagataagatagagtatatggc          ttctagacatccaacatagaactgagtttgtgttatcagtttaagattt          ggttttgctgtaaggtgcacacactttgaggaactaaaaataattgtct          gttcttatttctgatcagaatgtgtaatgtgttgtccagttttggatgat          gaatttcttatttctaattctcataagaaacttgtcatagatgtgagggga          gagaattaagaacagagtgtggggaagaaactgtgtacattttgatggg          atccattatgtagctcttgcatactgtcttcaaaaataagttacactat          aaaggttgtttttagacttttaagttttgccattggtttttaaaaaat          ttttaaatggctttaaaaaatttcttaattgtgtgctgaatacaatttt          ctttattacagaagtaccaacaattacatgtataaacagagaatcctat          gtacttgagatataagtaaggttactatcaatcacacctgaaaaattta          aatgttatgaagaaattatctcatttctattaatatgggaactgtgtct          tcacttttattactgttctaagggtcaactcaatgtagattttacttgct          tatggtttcataatttttagctaaatagtaaaataatatggatatacattt          tgttgtgacttactcatacttttcttattttggaacttttatgaatatga          tatagagactgaaactacaaggaacaaaatgcaatatcaattatacagt          tgtggcagcactgctatcaatttggtgatagtgggtaacacttagaaaa          acatttttaaaaataatttcacataagtaatgtaatttattagctgtctc          tgacattttacagtttggaatagtttattttctttttggtgtcctcacc          aaaaccaacatcttcaagggcaggaactgtataatttttgccattgta          ttttgagcacatagcatgggtacttgccctctaaatagatactattgttaa          aatattttttaaggtaatatttttaagtgatgctatgggtacagttcag          tttgtgacttttgctagtttatgccacttacagttagcaaaatcacttc          agcagttcttggaatgttgtgaaaagtgataaaaatcttctgcaactta          ttcctttattcctcattttaaaataatctaccatagtaaaaacatgtata          aaagtgctacttctgcaccacttttgagaatagtgttattttcagtgaat</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---

【表 1 5 - 2 5】

		cgatgtggtgaccatattgtaatgcatgtagtgaactgtttaaggcaaa tcatctacactagatgaccaggaaatagagaggaaatgtaatttaattt	
42	エクソン 13	GCAGUAUACAAAGAUGCUGAUUUGUAUUUAUUAGACUCUCCUUUUGGAU ACCUAGAUGUUUAACAGAAAAAGAAUAUUUGA	
		ttctttgaataccttacttataatgctcatgctaaaataaaagaaagac agactgtcccatcatagattgcattttacctcttgagaaatatgttcac cattgttggtatggcagaatgtagcatggtattaactcaaactctgatct gccctactgggccaggattcaagattacttccattaaaaccttttctca ccgcctcatgctaaaccagtttctctcattgctatactgttatagcaat tgctatctatgtagtttttgcagtatcattgccttgtgatataattac tttaattattattatacttaacattttttatttactttttgtgttagtat tttattctgtcttctccttagatagtaaccttcttaagaaaatatatat gctaagtgttttactgggttaatatgcttagactactcatctacctcaa tacttccttgagatctcctcctcagtcacacagagctcaggacttata tttccttggaactcctgttagggccaatgtacatgaaattccctagac agacagacagtcagttatatggcttgatttcaaagtttcaaaatgattt aatggactatcaagtagtttattaggagaacagttattatactcttcta aaaataaagactttaagcaataaagatgtatatgtatataaaatggctg ggttattcctagaagtacctttcttagaatttagttaaatttaatatcc aagatactatcttttcaaccctgagattgtgaaaagtaacttctatcaa tataaactttactacatttgattgtgttagtgtgttacagtataatct agaacaatgtgtctttctatatgatatatgacattttaatgcctaaaaa aactgatatgtcttagatgattctagtcaggatttacttctagaataga ttaaaattctatttgaggagagtcaaattaattatcgaattctcagttg ttattattgctgttttatttttagtgaaacagattagtcttaatgtaaa cacttgagaaataaattgatggcacaacctaataatgtaaaaaagaaatta atagaaaatttaagagcaacaaagctctgacatttaaaagaaatgaag	10 20 30 40
43	イントロン 13		

【表 1 5 - 2 6】

		<p>tacaaatctctagggaccttaaagatcatctaataatttcctcattttc tagataaataaactgagagaccccgaggataaatgatttgctcaaagtc aaatatctacttaatataggaaatttaatttcatttctcagtctgttaac atgcaactttttcaatatagcatgttattttcatgctatcagaattcacaa ggtaccaattttaattactacagagtacttatagaatcattttaaataata ataaaattgtatgatagagatttatatgcaataaaacattaacaaaatgc taaaatacagagacatatgtgcaataaagtattttataaaattgatatttat atgt</p>	10
44	エクソン 14	<p>UGUGUCUGUAAACUGAUGGCUAACAAAACUAGGAUUUUGGUCACUUCUA AAAUGGAACAUUUAAAAGAAAGCUGACAAAUAUUAAUUUUGCAUGAAGG UAGCAGCUAUUUUUAUGGGACAUUUUCAGAACUCCAAAUCUACAGCCA GACUUUAGCUCAAAACUCAUGGGAUGUGAUUCUUUCGACCAUUUAGUG CAGAAAGAAGAAAUUCUAUCCUAACUGAGACCUUACACCGUUUCUAUU AGAAGGAGAUGCUCUGUCUCCUGGACAGAAACAAAAAACAAUCUUUU AAACAGACUGGAGAGUUUGGGGAAAAAAGGAAGAAUUCUAUUCUCAUUC CAAUCAACUCUAUACGAAAAUUUUCCAUUGUGCAAAGACUCCCUUACA AAUGAAUGGCAUCGAAGAGGAUUCUGAUGAGCCUUUAGAGAGAAGGCUG UCCUUAGUACCAGAUUCUGAGCAGGGAGAGGCGAUACUGCCUCGCAUCA GCGUGAUCAGCACUGGCCCCACGCUUCAGGCACGAAGGAGGCAGUCUGU CCUGAACCUGAUGACACACUCAGUUAACCAAGGUCAGAACAUUCACCGA AAGACAACAGCAUCCACACGAAAAGUGUCACUGGCCCCUCAGGCAAACU UGACUGAACUGGAUUAUUAUUAAGAAGGUUAUCUCAAGAAACUGGCUU GGAAAUAAGUGAAGAAAUUAACGAAGAAGACUUA</p>	20 30 40
45	イントロン 14	<p>tatacatcgcttgggggtatttcacccacagaatgcaattgagtagaa tgcaatatgtagcatgtaacaaaatttactaaaatcataggattaggat aagggtgtatcttaaaactcagaaagtatgaagttcattaattatacaag caacgttaaaatgtaaaataacaaatgatttctttttgcaatggacata</p>	



【表 1 5 - 2 7】

		<p>tctcttcccataaaaatgggaaaggatttagtTTTTTggTcctctactaag  ccagtgataactgtgactataagttagaaagcatttgctttattaccat  cttgaaccctctgtgggaagaggtgcagtataaataactgtataaataa  atagtagctttcattatTTtatagctcgcaaaataatctgtatggaagta  gcatatataagggtatataaacatttagcctcttgataggactaactcac  attctggTTTTgtatatcagtcctgcctgaatttagctagtgtgggcttt  TTTTtatcttgTgagtttgctttatacattgggTTTTctgaaaagatttc  TTTTtagagaatgtatataagcttaacatgtactagtGCCaatcttcaga  cagaaattttgttctattaggTTTTaagaataaaagcattttattttta  aaacaggaaataataaaaaaggagagTTTTgttgTTTTtagtagaaaa  cttaatgccttggtatgaaatgagccatgggcagggttgtaatgaattga  tatgtttaatagtatagatcatttgTgaataatatgaccttgacaaga  cacaagccattaacatctgtaggcagaagtttccttctttgtaaaatga  gggaataaaatagatccctaaagtgtgtaatttttagtatttctaaactt  tatgaaggtttcctaaatgataattcatctatatagtgtTTTTTgtgt  gtttgtttgtttgtttgtttgagatggagtctcgctctgtcacctaggc  tgtagtgcaatggtgcaacctcggctcactgcaacctctgcctcctggg  ttcaagctaattctcctgcctcagcctcctgagtagctgagattacaggc  atgcaccaccatgccgagctaatttttgTatttttagtagagaaggggt  ttcatcatgttgaccaggctggtcttgaactcctgacctgtgatccac  ccacctcagcctcccaaagtgctggtattacaggcgtgtgccaccacgt  ccagcctgagccactgcgcccagcccatctatatagtttaatatcaatc  taaataaatTTctcagtcctgagcctaaaaatttagttgtaaagaatga  tatccttgactaataatagtttctattaatggattgcatctagtgtctag  gtggcatatatTTtagtccccacaactaccctggaagggtatttaaaattt  ttcacatttgagataaggaaactaaagttcagagttcggcaacatgct  tgaattcaagcagctcctaggatgttaatggTggagggttggttcaaat</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	--	---

【表 1 5 - 2 8】

		ccagatctgtctgactcaaaaaatgcatactcctaaccagtgactata tcccaattccataggagcccttctttgtgattcatagcactttcccatg agttttgttgattttgtgagaaacaaaactctttttcctttggactgtc tggaatctctcttttttcaaatttttgaaatgtatttctatgccaaaaga caaagatttctagaggaatatgcctaggatgagaattatgtaattttaa tcacagctggaaagagagaaagtcctaagttactaagaaatgttcaaac acaaatgagctttcagtcatttggaagacctttatagctagaagtatac tgaactgtacttgtccatggaccctgaagaaacagggttaaatacaaga gagttctgggaaacttcatttagatgggtatcattcatttgataaaagg atgccactgttaagcctttaatggtaaaattgtccaataataatacagt tatataatcagtgatacattttttagaattttgaaaaattacgatgtttc tcatttttaataaagctgtgttgctccagtagacattattctggctata gaatgacatcatacatggcatttataatgatttatatttggttaaatac acttagattcaagtaatactattcttttattttcatatattaaaaataa aaccacaatggtggcatgaaactgtactgtcttattgtaatagccat	10
46	エクソン 15	AGUGCUUUUUGAUGAUUUGGAGAGCAUACCAGCAGUGACUACAUGGAA CACAUACCUUCGAUUAUUAUACUGUCCACAAGAGCUUAAUUUUUGUGCUA AUUUGGUGCUUAGUAAUUUUUCUGGCA	30
47	イントロン 15	aatgttctattgtaaagtattactggatttaaagttaaattaagatagt ttggggatgtatacatatatatgcacacacataaatatgtatatataca catgtatacatgtataagtatgcatatatacacacatatatcactatat gtatatatgtatatattacatatatttgtgattttacagtatataatgg tatagattcatatagttcttagcttctgaaaaatcaacaagtagaacca ctactgatatatttattatttcatattacatatataaatatatttaaatac aaatataagaagagtttttaatagatttttaataataaagggttaagaga ttcgaaagctcaaagtagaaggcttttatttggattgaaattaacaat tagaatcactgttgatatatttattatttcatattacatatataaatatat	40

【表 1 5 - 2 9】

	<p>           ttaaatataaagataagagtttttaatatagattttataataaatgttaag            agattaaaaaactgaaaatagaaggctttttatttggttgaaattaaag            gccaggcatggtggttcatgcctgtaatcccagaatttttaggagactga            gtggggaggattgcttgagcccaggggtcaagaccagcctgggcaacac            agtgagacaccgtatctacaaaataattaaaaaattagctgggcatggt            ggtgtgtgcctgtatgctaccattaactaaggaggctgaggtgggagaa            tcgcttgagcctgggaggtcaaggctgccctgaactgtgattgtgccat            tgcattccagcctgggtgccagagagagaccctatctctaaataaataa            ataagtaaataaataaacagcaacaacaaaaaactcaaagcaaactctg            tactaaattttgaattcattctgagagggtgacagcatgctggcagtcct            ggcagccctcgctcactctcagggcctccttgaccttgacgcccactct            ggctgtgctgaggagccct.....tagaacagagcacagatgatctaa            atataaaaagaactacaaaaatcacagttgtttaaaaaggttttttgtt            tgtttatatatggtgcagaacatttgttccttagccaaatgtttccacc            ttgagaaagctatagagattctatgtagtcctagtagccaataatatgtt            ttaacctgaatgtaccttatctttattcataaactgtgactttttacac            tgctgaaacttttttttttaagacaatctcactctgtcgtccagtctgg            agtgcagcagtggtgtgatcttggtcactgcaacctctaccttctgtg            ttcaagcaattctggtgcctcggccacctgagtagttgggatcacaggt            gtacaccaccaggcctggctaatagtttttgatatttctagtagagatg            agttttgccacattggccaggctggcctgaaactcctggcctcaagtga            tctgcctgccttggcctcccaaagtgttggtattacaagtgtgagccac            tgtgcctggcctgaaactcataattcatttccattaatattaatctcac            cttttccaataattaattgatttcacaagtattagtagccctataatcat            tgaatggctaataaaaattatttatagcaaacagattaattatctgccag            cagtctgagattagtttctttaaaaaatgtttattatttaaacattca            gctgtgatcttggtttcttgtgaggttcaatagtttctattgagtaaa         </p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	---	---

【表 1 5 - 3 0】

		ggagagaaatggcagagaatcttacttcagtgaaatttgaattccattaa cttaatgtggtctcatcacaataatagtacttagaacacctagtagacag ctgctggaccaggaacacaaagcaaaggaagatgaaattgtgtgtacc ttgatattggtacacacatcaaattggtgtgatgtgaatttagatgtggg catgggaggaataggtgaagatgttagaaaaaaatcaactgtgt	10
48	エクソン 16	UGGCUGCUUCUUUGGUUGUGCUGUGGCUCCUUGG	
		tattccatgtcctattgtgtagattgtgttttatttctgttgattaaat attgtaatccactatgtttgtatgtattgtaatccactttgtttcattt ctcccaagcattatggtagtggaaagataagggtttttgtttaaatgat gaccattagttgggtgaggtgacacattcctgtagtcctagctcctcca caggctgacgcaggaggatcacttgagcccaggagttcagggtgtagt gttgtatcattgtgagtagccaccgcactccagcctggacaatatagt agatcctatatctaaaataaaaataaaaatgaataaattgtgagca tgtgcagctcctgcagtttctaaagaatatagttctgttcagtttctgt gaaacacaataaaaatatattgaaataacattacatatagggttttct tcaaattttttaatttaataaagaacaactcaatctctatcaatagtga gaaaacatatctattttcttgcaataatagtatgattttgagggttaagg gtgcatgctcttctaattgcaaaatattgtattttatttagactcaagttt agttccatttacatgtattggaaattcagtaagtaactttggctgccaa ataacgatttc	20
49	イントロン 16		30
		ACUCCUCUUCAAGACAAAGGGAAUAGUACUCAUAGUAGAAAUAACAGCU AUGCAGUGAUUAUCACCAGCACCAGUUCGUUAUUAUGUGUUUUACAUUUA CGUGGGAGUAGCCGACACUUUGCUUGCUAUGGGAUUCUUCAGAGGUCUA CCACUGGUGCAUACUCUAAUCACAGUGUCGAAAAUUUUACACCACAAAA UGUUACAUUCUGUUCUUCAAGCACCUAUGUCAACCCUCAACACGUUGAA AG	40
50	エクソン 17	AG	

【表 1 5 - 3 1】

51	イントロン	<p>ttactaggtctaagaaatgaaactgctgatccaccatcaatagggcctg  tggttttgttggttttctaattggcagtgctggcttttgcacagaggcat  gtgccctttgttgaacctccatttgactggcatgcacatgtctcagata  ttataggttatcatatattgttgctcctaataatttctgtgttagataat  tagagtagcttggtttgtaagaatgtgatgttggtgggactgtagcaga  acaagaaggcccttatgggtcagtcatacctctcttttcaaataatttgg  tctagctctcttctgggcatcttggttgccaatatatagtattgctcaaa  agggcaggagatttgaagtgatcaaggaaaatatatttttctattgat  taagtcttttgatggggtagaataatctaatttcatgtaactgctcaaa  gttatatggtagggggatcccaaagtatttttaaaactatttttatatc  atcatatttgaagtaatagaaagtcagagtagcagaataaagggtactaa  aaattttaaaaactaataagggtactttgaaagaaatcaattatgttgat  tcctcattaacaaaatttgcacttaagactgagggttaataaggatttc  cccaagtttttcatagcaacctgtgagcactttctctgttgaggcatt  tatgggtatgaaaagatgagtaaggcacagttcttgccctggagaaggtc  acagggtgagaggaggagttgacacagaaacatttgatataaagcaagga  ataaattccaagactaaaattttcagaaatctaaaaaactcaagataag  aaaaaccatttatattttctgggtaacaaaatttcagtggtattaacat  gtaggaagatcttgatatttattctgaagcccatgtgtgttgctgaaat  attgccgcatttgcataactcatcaccatcctctgttttgagctaag  aatttttagactcaagatgtctaattaagttgatccattgattttatttt  ttatggaaatctgagaccacagaaggcaggggatttgcccacatttct  agaagagtcagacatgagcgatgaggcacagtggaaagaacatgagcat  tgcctgagctctgagttggcgctataagagcagtgatcatgggcaagtg  actcttctgagccttggcctcctcacctgttaagtgaagaaaagaatat  ttcagaagatctttgtgagaatgaaacaaggcaatttacttgccctgcta  catagccaatgggaaatcaatataagttccccgtgggtcccttctgtgg</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
----	-------	---	---

	<p>gggttttggtccacagagggtgcactggccattccacttcttcttttcc aagctcctcattccctttaacgctgttcatagttggttccaaaccattt gaaatataataagcaccaggatgggttttttctttccaccaaagcaaatt tcatttttctaaacactgtttataaatatcaatggctattttttcaattt ttgattatcatgaaaatatacaaatatgtttaattaaatatgctaaaga atgtattaataaatatgtattaaataattcctacatataaggccttttt gcttgggggtatgggtgatacaaaaataaatgtggcatgaaccactgacc tctagcaattttataacctagaaaaagagttatgatatgtttataagttc ctgtgatataagacatgcatatagtcattataacagagggtgcaaacaag atgtatcaagtatgtccagaggaggaagagattaatcccagctggagga aacactgatgctttcttgccagcaggggcatttgagttgagaaagggagg aaacatagattttgacaatgagagctgaggggaaaggggtttcaggtgg agggaaccgcatgtggaaagcagggaggtaggaaagtgtagagtgtgtt taaagaatagaccagtttggtgaaacaggatatttgagcagaggaagc ttgtactaggtaggtgggttgaggccaaattatgcaaggcattaaatat taaactaggaatttttgactttatcctgcagtttatggggggtaaatga taagattcaatatcactttatgtgtacagtattatgttacattttatct aattgtttgtttaattcctgtctagacaatgaattcctcaagggaagg agcatgggttattcacctcagtaatttcagtgccctagcattgtgcctgg taciaagtggacacttgtatataaccttttttaattgaagcaacaagtt gtcaaccttaciaaatgtgaatccgtgattcagatgacaggttgaaatgt agattgtctgcgaagagggcagaaagagagtatgacaaaggaggacaag acagtggggcaggcaggagagagagcagccagggtttcggtagaggta tgtcaaaaaggtatggaagtcagaggagaaggagaccctatgttatag aatacaaatggaagggaaatgatgacaacagtaagttgtcattaaatgc aagggttgcaaaaagtaagattgttaaagcaggatgagtacccacctattcc tgacataatttatagtaaaagctatttcagagaaattggtcgttacttg</p>
--	---

【表 1 5 - 3 3】

		aatcttacaagaatctgaaacttttaaaaagggtttaaaagtaaaagaca ataacttgaacacataattatttagaatgtttggaaagaaacaaaaatt tctaagtctatctgattctatttgctaattcttatttgggttctgaatg cgtctactgtgatccaaacttagtattgaatatattgatatatctttaa aaaattagtggttttttgaggaatttgtca	10
52	エクソン 18	UGGGAUUCUAAUAGAUUCUCCAAAGAUUAUAGCAAUUUUGGAUGACCUU CUGCCUCUUACCAUAUUUGACUUCAUC	
53	イントロン 18	taaaaataagtaccgttaagtatgtctgtattattaaaaaaacaataac aaaagcaaatgtgattttgttttcattttttatttgattgagggttgaa gtcctgtctattgcattaattttgtaattatccaaagccttcaaaatag acataagtttagtaaaattcaataataagtcagaactgcttacctggccc aaacctgaggcaatcccacatttagatgtaatagctgtctacttgggag tgatttgagaggcaciaaaggaccatctttccaaaatcactggccacaa agtgtgacattttggcattggcatcactatttgatggaagccaacctcc ccccaaaaggcctgtattagaatgaagatggattccctgggtgggttac acttgaaactagcctcacccatgaacactttggcacagattagctagcc cattccccacagtaaggaccataaggaagggaagaaagcaagataag ttttagaaciaaagagaggggaaagaaaaaatctagggttttatgaggg ctgtccctgagtgatagatgtgaataggcctccagggaaggctggctca gaggctgactctttgggttggggtgactgattggtggtgaggatggaga agaaaaggggagtggaggaggtgaaagtgaccttgggacattaggtctc cataagtgacaggatttaaggagtgttgtaagctgtgggttgttgacca ggtttaagcacagcttcctgagcttcctgactgggttaggtcaagctcc agagagcaaagtccacagtctcagtgatctccttgagaaacagttgga ataggatgttgcccatgttgggatgagtcattgtccgctcttgctcttt ccctacccctgcaaaataataataactgtatttgattgaacatataaaac aaaagaaggattatcacataagtatgtatatataaccaacattggcagg	20 30 40

【表 1 5 - 3 4】

	<p>tgcagaaaaaccagactgtcagtttgcctcatctgaaatgattgacaca  aacaatatatattactgtcccaagtgaactttggcattttggatatacct  tcagttgttctgtttaaagatatataacttagaagcagctgatggaatatt  taaattccatgcgttgaattcatgcattcaaagaaacatgtcctgagtca  ctaaatgctgacatttgtttttcatgttaagagtgtaaataactgggtcc  caaataataatattattacatcagataaaaaactggaatgtgaacctctta  acttgattgtgaaagtatttgccaatgggtgcctcttgataattatttga  ggctcacttcagaactcctctggaagggtaatttttaaatagtcattt  tataaattaacatttttgacatatgtgatggctctcaaattttttcttt  tatgccagtttgaatcatttctgctcaatttttttttaattgggatg  gagtctcactctgttgcccaggctggagtgcagtgatgcaatcttggct  gactgcaacctccacctcctcggttcaagcgattctctcgcatcagcct  ccagagtagctgggattacaggcgcgaccaccatgcctggataatttt  tgtattattactagagatggggtttcaccacggttgccaggctggtctt  gaactcctgaactcctgacctcaagtgatccacctgcctcagcctctta  aagagctggaattataggtgtgagccactgcaccaggccctgttcaact  tttaatgctaagattcatttggttggtttcacaagtgattaggcagag  gtcttttatattaatttaccatttttatttgtaagagagtctcatatta  aggaagcataatatatgacaatccaaatacagtacaaatttggttaatt  ttgattttggttaaataattaatcacaggggtccttcaaattgtgagctc  ctctggttatacttatgttttacctctggttatacttaatttcaaaca  atgaaatttcattctattcatgatatttcagaagcagatctgttgaca  aaataaagcatacctataaattttcttttttaaaaaaagtctctgtt  cactctattttctattattttctcttttaaaatttgaattttattgt  ggcaagtccacttaacatgagatttaccctcttaacagatttttatgtg  taaaatacaatatgttccacctgggttaaattgttgacagcagatctct  ggaacttattcattttgcactactgaaattttatacctgttgattagta</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---



【表 1 5 - 3 5】

	<p>tctccccatttccctctctccctgtcctgttacccatggttctgttct</p> <p>ttgcttctttgagtttgagtattttgatacctcatgtaatcttcattct</p> <p>attttctaactttgacaatgttctgacaaatttgctttccggattggag</p> <p>cactgtatagtgaaaattgaaaatcttggttattttctacagattccca</p> <p>ctattttaccttgagcagacacttatcttgaagggctcagatttgtca</p> <p>cttgtagaatggggaatataaacctgataatgggccctttcagttctaa</p> <p>agttatatcagttgaaaatacatgtgtcacttatggtaacgggtagaga</p> <p>actggctcactgaacagcatatggatattataaagtggtttttttaaat</p> <p>cctttctgcagacagttactttatactttattcaaattggattattgtga</p> <p>agtacatgttagcggactttgtaccttttaaaaatgtatgtatttggtg</p> <p>taatgtagaaatatagaaatttattaagtatgatttatttcaatgttaa</p> <p>gcatgagaaaatatgctccgaaagggttagatagcttgccataatgacaa</p> <p>gcttgtattttcaagcagaactttctgaatcaaaagactccaagacgaat</p> <p>gcccagctttcaaaaactgtctaaccataaaatcctaagattcacct</p> <p>tcatactaaaattatttataaaatagtttatttttaaattaatattcactt</p> <p>aaaatgtattttatcatgcaatacttttaaagtgtctgggaaatgaaaata</p> <p>tccaaagatcaaagaacacccatgttttcaaacttcaaaaatgttatcag</p> <p>tgacctaaacaattttttaaattttcatagagcctatgaaaaatgtact</p> <p>tgcaaatggctactttctgactaggaatagaatggggagagtatttagt</p> <p>ccaacaatgatagactggattaagaaaatgtggcacatatacaccatgg</p> <p>aacactatgcagccataaaaaatgatgagttcatgtcctttgtagggac</p> <p>atggatgaaattggaaaacatcattctcagtaaactatcgcaagaacaa</p> <p>aaaaccaaacaccgcataattctcactcataggtgggaattgaacaatga</p> <p>gatcacatggacacaggaagggggaatatcacactctggggactgttgtg</p> <p>gggtggggggaggggggagggatagcactgggagatatacctaattgcta</p> <p>gatgacgagttagtgggtgcagtgcaccagcatggcacatgtatacata</p> <p>tgtaactaacctgcacaatgtgcacatgtaccctaaaacttaaagtata</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	---	---

【表 1 5 - 3 6】

		ataaaaaaaaaataaaaaaaaaagtttgagggtgtttaagtatgcaaaaaaaaa aaaaagaaataaatcactgacacactttgtccactttgcaatgtgaaaa tgtttactcaccaacatgttt	
54	エクソン 19	UGUUAUUAAUUGUGAUUGGAGCUAUAGCAGUUGUCGAGUUUUACAACC CUACAUCUUUGUUGCAACAGUGCCAGUGAUAGUGGCUUUUUAUUAUGUUG AGAGCAUAAUUCUCCAACCUCACAGCAACUCAACAACUGGAAUCUG	10
		acagtgaatgtgcgatactcatcttgtaaaaaagctataagagctattt gagattctttattgttaatctacttaaaaaaattctgcttttaactt ttacatcatataacaataatTTTTTctacatgcatgtgtatataaaag gaaactatattacaaagtacacatggattTTTTTcttaattaatgacc atgtgacttcattttggTTTTTaaataggtatatagaatcttaccacag ttggtgtacaggacattcatttataataaacttatatcagtc aaattaa acaaggatagtgctgctattactaaaggTTTTctctgggttcccaaatga tacttgaccaaatttgTcccttggcttggtgtcttcagacaccctttc ttcatgtgttgagctgccatttcgtgtgccccaaactctacttgagc tgttagggaatcacattttgcagtgacagccttagtggtgggtgcatttt caggcaatactTTTTcagtataattctgctttgtagattattagctaaa tcaagtcacataaacttccttaatttagatacttgaaaaaattgtctta aaagaaaattTTTTtagtaagaattaatttagaattagccagaaaactc ccagtggttagccaagaaagaggaataaatattggtggttaatttttaag ttcccatctctggtagccaagtaaaaaaagagggttaactattaataaa ataacaaatcatatctattcaaagaatggcaccagtggtgaaaaaagct ttttaaccaatgacatttgTgatatgattattctaatttagtctttttc aggtacaagatattatgaaattacattttgtgtttatgttatttgcaat gttttctat	20 30 40
55	イントロン 19		

【表 1 5 - 3 7】

56	エクソン 20	CAGGAGUCCAAUUUUCACUCAUCUUGUACAAGCUUAAAAGGACUAUGG ACACUUCGUGCCUUCGGACGGCAGCCUUACUUUGAAACUCUGUCCACA AAGCUCUGAAUUUACAUACUGCCAACUGGUUCUUGUACCUGUCAACACU GCGCUGGUUCCAAAUGAGAAUAGAAAUGAUUUUUGUCAUCUUCUUCAUU GCUGUUACCUUCAUUUCCAUUUUAAACAA	10
57	イントロン 20	atgaactcattaacttttagctaagcatttaagtaaaaaattttcaatga ataaaatgctgcattctataggttatcaatttttgatatcttttagagtt tagtaattaacaaatttggttggtttattattgaacaagtgatttctttg aatttccattgttttattgttaaacaataatttccttgaaatcggata tatatatatatatgtatatatatatatatatatatatatatacatat atatatatagttattatccctgttttcacagttttaaaaaccgatgcaca cagattgtcagatagcaattctgtgattgaaggggaaatatgtcacctc ttcatactcatattggtgaagggtcctagcttcaaaattaatagattcc taaagaggggaaatgaaacatccgcatttacacacacacacacacacac acacacagagttcctcttgctcggttaagttttgtttttttaaatctcta ctagataaaatttgttatctaattgtgagttttacacaaagaaaaactg tcacagaaaagaaagacagtggtcacatttttcaaaagaaaagaagaaa agaaagtgccatgtttttcaaatacaaatgttctggattgatttttagga tcttttagtgaaaaacaaagtatttcataataagtaaaataaaaatctat gtaggttaaatttgtttctctaatttaagaatttgaaatttctgagtattt atgataagtggtgaaataacttcttatatgtgacagtgaatactggcag agcaaatgccaaatcaatgccaaatctgtaggatcatttgattgtagga acagaattctactcaaaccgaaagcaggcatttgctggagttacagaaa ggcctcatggaacaccgagaagggtggtgccattcgactcttaagaagc tgcaacaggcacaagagagtcagctgcagctcttcttcttgagtctata tctgtcctgggtccatttctttttgtggttgcttcatttcttctctct ctgaagactgggttttcttggtctaccagggctatgccacattgacttta	50

【表 1 5 - 3 8】

	<p>             tgtagtgtctccattctggcctcctgaatttacaggagagttcctctgt              acaaactcaaagtcctggagagaaacagaaaacagcttccttttggctca              ggggtccaactgcagtctactctgctgctatgaggatagtggggtcacc              acctttgttggtctctcagctagggcagtgggaaatgactctatgaaag              gaatatacatgggcaggcaaatgtactaatcctcatcagtactgtaatt              ttaagcaactttaaaaaattcttttaagttatttgaaaataagatcaaa              gaaggctgaattacataaatgaagatttggttaacaattaattcaaacca              atataacacatgctataacatgggttgagtgtgattgagtcttgatttat              taggggcaataatcaaaacatttaacaatcattatagtacagaacttac              caatcaaatcagatgctcagccggagtggtggtggccaccagctatt              attatccctggctcaattggctcttcagctgtgttaacttgcaaacatta              attaactatctaagcccctcattttcctcaagtgtaaatagacacaata              atattacctattccataggtgtggggtgaatagtaaatgtaataatttg              tccaaaacacttagtatagtgctgggtccatggtaataactaaataaat              gttatctgacttattattaaaaattttatcttctcagcttaaccttcaga              acagtaatatattggggtctagataaatcttgcttatatgaaaataatt              taatactacatgcagatatatgctgtgtatattatgccttctgttagag              gaattgcagaaacaaaaatttcaattaataataagatgaattatttctc              ccaattgtagaatcttttgacaattttatcatgcattacagatgtaaga              actcttgattgggacttgatagcttaactttataataatttaagaacat              tcctcttagagaatttctatggccataataactgaacacatgaattttaa              ttagctgtcctcttttagccctaaaaaaaaaattactgtaatttaacact              taagtgttggtcttcccagggtacagtaatctttttttttttttttttt              ttttttgcatagagggtaatcttttctctttccaaatggcagaactggt              agttttctgactgtccggtgaaattctaagtccacttacttcccaatag              catgcaattagcaaaggctcctccttgcaaaggcacagaacacacctaaa              catcttgcatagatgctgtttggacactcttcccctgcttttgggtctctt           </p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---

		<p>gtaaagcagctcatctggatacaggatctcttttccccattgcccatc</p> <p>taatatatgtttaccgttattacttatagaataatagtagaagagacaaa</p> <p>tatggtacctacccattaccaacaacacctccaataccagtaacatttt</p> <p>ttaaaaagggcaacactttcctaataattcaatcgctctttgatttaaaa</p> <p>tcctggttgaatacttactatatgcagagcattattctattagtagatg</p> <p>ctgtgatgaactgagatttaaaaattgtttaaattagcataaaattgaa</p> <p>atgtaaatttaaatgtgatatgtgccctaggagaagtgtgaataaagtcg</p> <p>ttcacagaagagagaaataacatgaggttcatttacgtct</p>
58	エクソン 21	<p>AGAAGGAGAAGGAAGAGUUGGUUAUUAUCCUGACUUUAGCCAUGAAUAUC</p> <p>AUGAGUACAUUGCAGUGGGCUGUAAACUCCAGCAUAGAUGUGGAUAGC</p>
59	イントロン 21	<p>tcttatcatcttttttaacttttatgaaaaaaattcagacaagtaacaaa</p> <p>gtatgagtaatagcatgaggaagaactatataccgtatattgagcttaa</p> <p>gaaataaaacattacagataaattgaggggtcactgtgtatctgtcatta</p> <p>aatccttatctcttctttccttctcatagatagccactatgaagatcta</p> <p>atactgcagtgagcattctttcacctgtttccttattcaggatttttcta</p> <p>ggagaaatacctaggggttgatttgctgggtcataggattcacccatgc</p> <p>ttaactgagtgggtgccaaattgtcctcaagtctgttggtactgatata</p> <p>tcccatcaagagagtacaagaattctcatagctatgtatcttcaacaa</p> <p>cacttggtgtctggtagatgtgaagtgattactaaaaatataggggaagc</p> <p>tgcatacataaattattggcttttgctgttctcttacattaatttcttat</p> <p>tcatgttgattactcatttgtcacctagtttttcttcccttaattaaat</p> <p>tgtaggaatttatgaattatggattgatcatcagctctatacatttcaa</p> <p>acataatccctcagtcagtggttggttatagagtcttttgatgaaaa</p> <p>gaagcttttaagtttaataaagttcaatttattgtcttttcctttatgt</p> <p>tttgtgcttttggtatcttgattaagaactccttccttataattgggttc</p> <p>tcaaatttagcagcataacattttcatactattatttaaatttttttca</p> <p>cattatttagtgatagcacctttcttatttcctaaagtgtttatcattgc</p>

		<p>cttctgtctttctgcttgataaatattgccacacatttgtatactttat</p> <p>tagtgtgtacaaagaccacatttttagttgtgttatttctcttgttttgg</p> <p>ttttctagaatgcagagccattaatattatagtaatgcttatgtgctaa</p> <p>taccatatcaggggcacaaa.....aaataagagcagtaaaattgtgtc</p> <p>taatcagctactaatatctgggaaggattgagccacaggatcaaagatg</p> <p>gtatcttttaaaaaatagaagttgagtgaattcggctcttcaaattctttc</p> <p>tttttattcattttatatatttatttactcatttagtatattcattcctttat</p> <p>tcatgtattgttcaaatatatatattgggtacttattatatgccaaagttgt</p> <p>ttttaaaatcacattccaaattcccgtaaagtcataattattcagagatg</p> <p>tatgttttttttaaaaaaaattgaacacctttaaaaattatcaagtcct</p> <p>tttatttctgtatgcattaaagataaaactttactaaatgttacatgaat</p> <p>agattttataaagcagataaaatatttaatttcaaataataacccttatatg</p> <p>caattatattttcccttagcactaaaaatgaatattttaagtaatttatat</p> <p>taaaagtgtaatattttaactgcagatgtatgccaatgacttaaattgt</p> <p>ttaaagattatagcaaagttgtttaaaattgtctaatacatgaagagttc</p> <p>acttaaccacctgggttgacacataaaattatagttagttactaaggtag</p> <p>ttcgagagaaaagagaagaatcttcagtagtggttttgagggtgtggtaca</p> <p>ttttattataatataccggttatatacagcattgtgcagtgctgctcatag</p> <p>tagaaataaatttttctctttgatgtcatctattcccttggtgtggcttac</p> <p>ataactgagaattaggtgatcacaaaaataaacaggcctatacagagcc</p> <p>catttatataagtcctgggttatttctcttcagttaaacttttaattata</p> <p>tccaattatttctgttagttcattgaaaagcccgacaaataaccaagt</p> <p>gacaaatagcaagtgttgcattttacaagttatttttttaggaagcatca</p> <p>aactaattgtgaaattgtctgccattcttaaaaacaaaaatgttg</p>
60	エクソン 22	<p>UGCGAUCUGUGAGCCGAGUCUUUAAGUUCAUUGACAUGCCAACAGAAGG</p> <p>UAAACCUACCAAGUCAACCAAACCAUACAAGAAUGGCCAACUCUCGAAA</p> <p>GUUAUGAUUAUUGAGAAUUCACACGUGAAGAAAGAUGACAUCUGGCCCCU</p>

【 0 2 3 7 】

		CAGGGGGGCCAAUGACUGUCAAAAGAUCUCACAGCAAAAUACACAGAAGG UGGAAAUAGCCAUAUUAGAGAACAUUUCUUCUCAUAAGUCCUGGCCAG
61	イントロン 22	atttgaacactgcttgctttgtagactgtgttcagtaagtgaatccca gtagcctgaagcaatgtgttagcagaatctatttgtaacattattattg tacagtagaatcaatattaaacacacatgttttattatatggagtcatt atttttaatatgaaatttaatttgcagagtcctgaacctatataatggg tttatttttaaattgtgattgtacttgcagaatatctaattaattgctagg ttaataactaaagaagccattaaataaatcaaaattgtaacatgtttta gatttcccatcttgaaaatgtcttccaaaaatatcttattgctgactcc atctattgtcttaaattttatctaagttccattctgccaaacaagtgat actttttttctagcttttttcagtttgtttgtttgtttttctttgaag ttttaattcagacatagattattttttccagttatttactatatttat taagcatgagtaattgacattattttgaaatccttcttatggatcccag cactgggctgaacacatagaaggaacttaatatatactgatttctggaa ttgattcttgagacagggatggtcattatccatatacttcaggctcca taaacatatatttcttaattgccttcaaatccctattctggactgctctat aatctagacaagagtattatatattttgattgatatttttttagataaa ataaaaggagctgaaaactgaattgcaaactgaattttaaaactttat ctctctgtggttaattgcaaacacagatacaaaaatatagagagagata cagttagtaaagatgtttaggtcaccgttactaacactgacatagaaca gttttgctcatgagtttcagaatatatgagtttgattttgcccattggat tttagaatatttgataaacatttaatgcattgtacaaattctgtgaaaa catatatataggatgtgca.....aacaaaactgtccttcactacaga ttgaaaagcattataactaaaagaccatttgctcagttatagtatataaa ggccaaatgacttaaaaacaaattatgtaaggagaaggaaacaaccatt tattcagtgccactaactgtcagccagttttttcagtggtcagttaatg actgcagtagtgttctaccttgctcaaagcaccctcctcaagttctggc

【表 1 5 - 4 2】

		<p>atctaagctgacatcagaacacagagttggggctctctgtgggtcacct  ctagcacttgatctcctcatgcagtgcattggtgctctcacgtctatgct  atgttcttatggtcttttaggtaacaagaataatcttcttcttcttctt  actatacatcttctgcttctgaaattcccttctcgccaatccagggtgaat  gtcagaatgtgatttgacaactgtccaaagtactcattcactgaggagt  ggtaaggccttcgcccacactgccttctctggaatatactgctgcctg  aacatatcattgtttattgcccaggcttgaacttcaccaaattaatttat  taggggtcaacatctaaatattagaactatttcagattaatttttaagtc  gtatccactttgggtactagatcaaattgcagggtctctgcttctggctt  gagcctatgttttagagatgatgtgcattgaagacactcttctgcttctt  ttatgcaaaatgggcattttcaatcttcttctgctttagtaaaagggtcagt  gataaaggaagtctgcattcaggggtccaattccttatggccagtttctc  tattctgttccaagggttgtttgtctccatatatcaacattggtcaggat  tgaaagtgtgcaacaagggttgaatgaataagtgaataatcttccactgg  tgacaggataaaatattccaatgggtttttattgaagtacaatactgaat  tatgtttatggcatggtacctatatgtcacagaagtgatcccatc</p>	10
62	エクソン 23	<p>UGGGCCUCUUGGGAAGAACUGGAUCAGGGAAGAGUACUUUGUUUUCAGC  UUUUUUGAGACUACUGAACACUGAAGGAGAAAUCCAGAUCCAUGGUGUG  UCUUGGGAUUCUAUAACUUUGCAACAGUGGAGGAAAGCCUUUGGAGUGA  UACCA</p>	30
63	イントロン 23	<p>caaaaggacttagccagaaaaaaggcaactaaattatattttttactgc  tatttgatacttgtactcaagaaattcatattactctgcaaaatatatt  tgttatgcattgctgtcttttttctccagtgagttttctcataggcag  aaaagatgtctctaaaagtttggaaattctcaaattctgggttattgaaat  gttcatagctttgatagtgtttttcagaagaccaaatttacagtgggag  ccttgggcttttgttttttaacagctcttttttgttctctgcttcagtgg  cctgacctccaagtttagcaatcgccagggttgagaaatgctttgcgagac</p>	40



【表 1 5 - 4 3】

	<p>           ataacagatgctcctgaaataacaaacacttggaatcatgaggtagtgg            aattgaaaatagaaagtgtagtgtattgttttttgttatttggatgggat            gaacaatgtcagattagtctgttaactatTTTTTTTaatgtcactctga            tttggtcacaaaggatctctagtctcattgccttagtatcattctacga            attagaatgtgttactgtgtgaagagcacttcttgtatatgagagaaata            gcaacagttccagtttaaagtgtatataaatggaaaccaagaaatgtctt            tactgggaccaaactctggacagcatttactgtatTTTTTgctgggtatttt            ctctagtctttccgggtatatattcacatttaaatgatcacttttctccctt            tgtgctaattggacactgaatccattccactaccatagttcttgctaata            ctactctactttttacacaaaattaaaatgccaggagcacctccaggta            gactgactataaatctagactgaaaaaaaaagcttgtatttcttaacaga            ttaccttgtggaacatttggctcctttcaactaatgaggcactaaatatt            gtaactgctcaactgggtgcttttaatttatttgtctagactttgtcatg            ttgccagaagctttatcctg.....ttgacttgacttgtgtgggttcctt            gtggaccagatggccactaaatattctcatttcaaggcaattggtaaaa            actacacttcaagaaatttcatcttaattccccttagtggtattatt            aaccaaaggcaaaagaaaaaaagggtaaaaaaatattctaaatgttaa            tatcaaaaatattattttcaattcaccacaggcacagagaactaagtat            tattattgctatttgcaccggcattccccaatgagacagtgtatttcttt            taagacatttttaataatataggcagaattaagtagacgggtgatctgg            taagtagatgtttcagggtaacagctgtgcaatgctccatgcagggaat            tagattgtcattttattccttaccaggaacatacattcagttaaacaat            tatttgacttctgctcttccactgatttctaagttgaggctctctcttg            tgctgtctgatcagataagtagagttgtgccttggtttatagatgaga            taaatgtgtatttgaataagcataagttaaagaaattttaaaatccctt            aggaagctaggcttatcagagaaatccaaggaaatacattaacaaacta            ggaatttgttctaacagggttaattataactcataaacttattgggtttt         </p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---

【表 1 5 - 4 4】

		tttacctttttaatttttatattacatttgcttataataaggaatattgct aggaataaaaattttttaataattctacaattaacaattatctcaatttct ttatttctaagacattgggattagaaaaatgttcacaagggactccaaa tattgctgtagtatttggttcttaaaagaatgatacaaagcagacatga taaaatattaaaatttgagagaacttgatggtaagtacatgggtgtttc ttattttaaaataatttttctacttgaaatattttacaatacaataagg gaaaaataaaaagttattttaagttattcatactttcttcttctt	10
64	エクソン 24	AAGUAUUUUUAUUUUUUCUGGAACAUUUAGAAAAAACUUGGAUCCCUAUGA ACAGUGGAGUGAUCAGAAAUAUGGAAAGUUGCAGAU	
		gctgctaactgaaatgattttgaaaggggtaactcataccaacacaaat ggctgatatagctgacatcattctacacactttgtgtgcatgtatgtgt gtgcacaactttaaaatggagtaccctaacatacctggagcaacaggta cttttgactggacctaccctaactgaaatgattttgaaagaggtaact cataccaacacaaatgggtgatatggctaagatcattctacacactttg tgtgcatgtattttctgtgcacaacttcaaaatggagtaccctaaaatac ctggcgcgacaagtacttttgactgagcctacttctctcctcactggta tggctccaaccatcaggccctatcttggtccatttaggctgctaaaata aaataccaaagactgagctgcttataagcaatctttggaggctgagaag tcaaagatcaagggtgccagcaggtttgctgtctcgtgagagcacttc ctggttcattgatgggtgctttcttgctgtgtcctcacataatggaaagg gcaagacctctctgggtgtctcttttacaatggcactaatcccatcatga gggctttgttctcatgacctaatcacctcccacatgtcctacattctaa tactatcaccttgggggttaggattttaacatatgaatttgaggagggtg gcgggggggacacaaatatttagaccatagcatttcactcctgacctcc aaagttcatgtcttcttcacatgcaaaatacattcattccatcccaata gccccaaagtcttaacttggtccagcatcaacttacaaggctaaagtc caaggtttcatctaaatatcagctaaatcagcacaaacagctaaatcag	20 30 40
65	イントロン 24		

		<p>             gtagagtgaggacttaaggtgtgattcctcttttaggcagattgctctcca              actatgaaattgtgaaatcaaacctattatgtactttcaaaataaaatg              gtgaaacaggcacaggctag.....ataagattctttctgagccattat              ctcatcttatattacagtcaggtggagcccatcttacctcctcatacta              aattctagacttctcaagggcaggagacaatcatctgtatatctctttg              gccttcatacactcaggagtacttgccaaaaataaacatttaatgcaca              tttatttgaataattgataagatccaatacttcaataactttgtcatat              ttttatagaatgggtttctatatctcatttgcattttcaaactttactt              ttactgtctagcttttaaaaaaaaaagcctttgactctaatacagccctca              tattctaccccaatatctaagaggctttatatctcctagtgttgtagca              ctattttaactccagtattttttacttcatagtttttacctatttgttac              agttagtttttatgaattcaagagatgaatagcaattttccatatgtaa              tttaaaaaacccacagttgactattttatgctatcttttgtcctcagt              catgacagagtagaagatgggaggtagcaccaaggatgatgtcatacct              ccatcctttatgctacattctatcttctgtctacataagatgtcatact              agagggcatatctgcaatgtatacatattatcttttccagcatgcattc              agttgtgttggaataatttatgtacacctttataaacgctgagcctcac              aagagccatgtgccacgtattgttttcttactactttttgggatacctg              gcacgtaatagacactcattgaaagtttcctaatgaatgaagtacaaag              ataaaacaagttatagactgattcttttgagctgtcaagggttgtaaata              gacttttgctcaatcaattcaaattggtggcaggtagtgggggtagaggg              attggtatgaaaaacataagctttcagaactcctgtgtttatttttaga              atgtcaactgcttgagtgtttttaactctgtgggtatctgaactat           </p>
66	エクソン 25	<p>             UUGGGCUCAGAUCUGUGAUAGAACAGUUUCCUGGGAAGCUUGACUUUGU              CCUUGUGGAUGGGGGCUGUGUCCUAAGCCAUGGCCACAAGCAGUUGAUG              UGCUUGGCUAGAUCUGUUCUCAGUAAGGCGAAGAUUCUUGCUGCUUGAUG              AACCCAGUGCUCAUUUGGAUCC           </p>

【表 1 5 - 4 6】

67	イントロン 25	<p>tttcagatgttctgttacttaatagcacagtgggaacagaatcattatg cctgcttcatggtgacacatatcttctattaggctgtcatgtctgcgtgt gggggtctccccaagatatgaaataattgccagtggaatgagcata aatgcataatttccttgctaagagtcttgtgttttcttccgaagatagtt ttagtttcatatacaaactcttcccccttgtcaacacatgatgaagcttt taaatacatgggcctaactctgatccttatgatttgcctttgtatcccat ttataccataagcatgtttatagcccaaataaagaagtactggtgatt ctacataatgaaaaatgtactcatttattaaagtttctttgaaatattt gtcctgtttatttatggatacttagagtctaccccatgggtgaaaagct gattgtggctaacgctatatcaacattatgtgaaaagaacttaaagaaa taagtaatttaaagagataatagaacaatagacataattatcaaggtaaa tacagatcattactgttctgtgatattatgtgtggtatt</p>	10 20
68	エクソン 26	<p>ACAUACCAAAUAAUUAGAAGAACUCUAAAACAAGCAUUUGCUGAUUGCA CAGUAAUUCUCUGUGAACACAGGAUAGAAGCAAUGCUGGAAUGCCAACA AUUU</p>	
69	イントロン 26	<p>tctttataactttacttaagatctcattgcccttgtaattcttgataac aatctcacatgtgatagttcctgcaaattgcaacaatgtacaagttctt ttcaaaaatatgtatcatcacagccatccagctttactcaaaaatagctgc acaagtttttcaactttgatctgagccatgtggtgaggttgaaatatagt aaatctaaaatggcagcatattactaagttatgtttataaataggatat atatactttttgagccctttatgtggggaccaagtcatacaaaaatactc tactgtttaagatttttaaaaaagggtccctgtgattctttcaataactaa atgtcccatggatgtggtctgggacaggcctagttgtcttacagtctga tttatggtattaatgacaaagttgagaggcacatttcatttttctagcc atgatttgggttcaggtagtacctttctcaaccaccttctcactgttct taaaaaaactgtcacatggccaggcacagtggttacatctgtaatccc aatactttgggaggctgaggtggggggattacttgaggccaggaattca</p>	30 40

【表 1 5 - 4 7】

		agaccagcccaggcaacatagtgaggcccatctgtctttattaaaaca aaacaaaactgtcacagcttctttcaagtgatgtttacaaattccctat ggtttagtcacaaggaagttctgaggatgatgtatcacgtcatttctgt tcaggcttttgagcctcctggaggtaaattggtttccttactgaaggctt gttattaccatgattatcactaagcttgaagtaacaaattaggggggca gactcacaacctcttgccctgccatggacaagttcaagaatctaagtaa agtcctctattgtctgatcttgatttgctcaacctgaacaagccaagg aggtgtattaaactcaggcacatcctgaccaatttggaattcttaagct tcagatcactgtggaagaggctcaactctttatgggtgctgtagacttac gctcattttctaggtaatttataagggacctaataatttggttttcaaag caacttcagttctactaaacctccctgaagaatcttccagctgctgagt agaaaatcacaaactaatttcacagatggtagaacctccttagagcaaaa ggacacagcagttaaatgtgacataacctgattgttcaaaatgcaaggct ctggacattgcattctttgacttttattttcctttgagcctgtgccagt ttctgtccctgctctggtctgacctgccttctgtcccagatctcactaa	10
		UCAUAGAAGAGAACAAAGUGCGGCAGUACGAUUCCAUCCAGAAACUGCU GAACGAGAGGAGCCUCUUCCGGCAAGCCAUCAGCCCCUCCGACAGGGUG AAGCUCUUUCCCCACCGGAACUCAAGCAAGUGCAAGUCUAAGCCCCAGA UUGCUGCUCUGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGUGCAAGAUACAAGGCU	20
70	エクソン 27	U	30

【 0 2 4 3 】

表 1 6 : ADAMTS 1 3 標的配列

SEQ ID NO	領域	標的配列
71	エクソン 25	GCUCUGUUUCCUGUGGGGAUGGCAUCCAGCGCCGGCGUGACACCUGCCU CGGACCCCAGGCCCAGGCGCCUGUGCCAGCUGAUUUCUGCCAGCACUUG CCCAAGCCGGUGACUGUGCGUGGCUGCUGGGCUGGGCCCUGUGUGGGAC AGGGUACGCCCAGCCUGGUGCCCCACGAAGAAGCCGUGCUCCAGGACG GACCACAGCCACCCCUGCUGGUGCCUCCCUGGAGUGGUCCCAGGCCCCG GGCCUGCUCUUCUCCCCGGCUCUCCAGCCUCGGCGGCUCUCCUGCCCGGGC CCCAGGAAAACUCAGUGCAGU
72	イントロン 25	guccuguccuccuuccugucaggcagcugcugcaggaggggugggcaaa ggcaucuuccucugggaaggacuggcacaagcacuuggucccuggguug ugugccugggagggccgggaucagggcuggcccucuucucccugggcaaa gcaaaaccucccuuuuacuacuaucaaggggaaguaacuugaagguagg aaccagcuugugagccccuagccucugggcugcucugcaugugcccc cucuugcuggaucaucugguagcagcccugugcccugagggugaugcuc ugaccuauagcagccccccucccuguccugagaaggcuuccagcugggcc uuggaggacaggguccaccccuaccuccuggucuccuuccucagcuugg aagccccggagccugcccugcugggaauccggggaagcacugcuuaccug ucuc
73	エクソン 26	UGCCUGUGGCAGGCAGCACCUUGAGCCAACAGGAACCAUUGACAUGCGA GGCCCAGGGCAGGCAGACUGUGCAGUGGCCAUUGGGCGGCCCCUCGGGG AGGUGGUGACCCUCCGCGUCCUUGAGAGUUCUCUCAACUGCAGUG
74	エクソン 27	GGACAUGUUGCUGCUUUGGGGCCGGCUCACCUGGAGGAAGAUGUGCAGG AAGCUGUUGGACAUGACUUUCAGCUCCAAGACCAACACGCUGGUGGUGA

		GGCAGCGCUGCGGGCGGCCAGGAGGUGGGGUGCUGCUGCGGU AUGGGAG CCAGCUUGCUCUCCUGAAACCUUCUACA
75	イントロン 27	gccaggccuucuccaccucccuugggugcuccaguccuggcagggagggc uggguggggugcugcuggggauggggccagucccaguggggagugggaa gauacggaggggaacugacugagauggaaggaacugggguuggccagugu cagucugcacgugccagggaggggucacaggaugaaugcuauaucccuc cuuuuugggaccgugcagcaagauggacggaugugggacaugguccaca uccucagucagucccucaggccucugccccacaccaccugccccgccc ccacccuccagccuuucaagggcuuuaggguuuuguggaagccacug ucccucagcccuguuucagugcacugguguaagcagacaugcuuguaca ugcaugugcaccacacaagcacaccucaggcagaggauGCCaccucaggg acuccagccuugcccguggccccucgauauccucugauagcccucucg guuguccuggggggcuugcccucucccaacagcccagcugggccgaagu uggcuucccuagcugguuccagagguuccucggcucccccaggugucug gggcuuaguggcaacaggggcuuagccucugcagagaccuagugcgccg ccuccuugccccagaccugcccgggcagagagccguguaugugucccag ugcacaggcgugcugggcccugccaaaaggccacaagcccacugucac cguucacauugcuucucgcuucccgcccagccccgcccacacaggcau cugccuugaaagaggugcaggagguacaggcaggugggggcuccaguga gcucugaggaacagcaguggccgccauggguggagccuaucuuuguugc caguuucaguguuaaacacucucugcacgugugacaucauugaguccuaa agaccacucugcucagugcaugccauuguuuccuucaguuaacagaggag ggaaccagagcccagaaacauuuagccuugccuaaagucacugggccag gaagugguagaggugggguucagcaggauuugccugggaaccccauuau ugaccacagugccaugcugcccugcacggcucccuggcugugaguuguc cuggccucuggcaccaccggucugucugggguuccuauuguccu

【表 1 6 - 3】

76	エクソン 28	AUGUGACAUGCAGCUCUUUGGGCCCUGGGGUGAAAUCGUGAGCCCCUCG CUGAGUCCAGCCACGAGUAAUGCAGGGGGCUGCCGGCUCUUCAUUAAUG UGGCUCCGCACGCACGGAUUGCCAUCCAUGCCCUGGCCACCAACAUGGG CGCUGGGACCGAGGGAGCCAAUGCCAGCUACAUC
----	---------	---

【 0 2 4 6 】



## 【表 17 - 1】

表 17 : T S C 1 標的配列

SEQ ID NO	領域	標的配列	
77	エクソン 5	ACCUCUUGGACAGGAUUAACGAAUAUGUGGGCAAAGCCGCCACUCGUUU AUCCAUCCUCUCGUUACUGGGUCAUGUCAUAAGACUGCAGCCAUCUUGG AAGCAUAAGCUCUCUCAAGCACCUCUUUUGCCUUCUUUACUAAAUGUC UC	10
78	イントロン 5	auguuuguaaggauuugaauagaaugguuuuauagaguauaguuuucugaa auuuuaggcaacuuaaagcaaggaagcuagauuuuaacuuiuagaguuu aaaaccuucuaggcauuuggcuuuucuaaaauagaauuguuguccagagu ugguacuuaaguaaguucuaaaauacaucacuaugacuauugaauaccuu guccaugcaaguauggaaaaauucgaucagauggguucaauguuacau uauuccaaaccucucugauuucgucaucguuuagccuucccucuuuuuu aacauccuggauuaucuuuugggaaucccguguuucuaaaauaucuuuu gcuaauagaaaaauggcuuaaaguuuucuguuaaccuuuaggaguaugg ucuggguugcagcuauaauuaagacuuguugauguaaaauucuaacuaagu ugcauucuaauuuuugcacuaaaauuagugcauuuuucuaauauaggag ucaaaaucuaaaauagaacuuuauugguuuuaguuuuacaguggcgugca gccauacucaggguuauuuguuuuauucuguuuuaguuccuggacuuguu uucuaucuaauaaaauaagaaaaugugguuauauuaacugccuguaccu cacagagacaugaaaaauccaauaguauuuguuccaggauggcaguac cauuggauucaucugcuacagcaccaugcaaaugauuuuugugucugc caagaaggguaacucuuuuauuaucuccuagaggugggucccaaggaguc acauuggcaggguaauuauaaaaacaugcauuuauuucagaaaaauagg aacaguuuuuaacaacuuaaanguuuuuuuaacaaauggauugaugagaau	20 30 40

[illegible]

【表 17 - 3】

79	エクソン 6	UGGACACUGACGUCGUUGUCCUCACAACAGGCGUCUUGGUGUUGAUAAAC CAUGCUACCAAUGAUUCCACAGUCUGGGAAACAGCAUCUUCUUGAUUUC UUUGACAUUUUUGGCCGUCUGUCAUCAUGGUGCCUGAAGAAAC	
80	エクソン 10	GUGUGCUACUUCUACCCCUUACUCCACGUCUCGGCUGAUGUUGUUAUAAU AUGCCAGGGCAGCUACCUCAGACUCUGAGUUCCCCAUCGACACGGCUGA UACUGAACCACCA	10
81	イントロン 10	gugucaacuagugugccugcucucuccucugcuuucugggugaagcugac ccuuugggucagauuuaguaugugguugggaaaauuucacacugcucau uucaggagucacuuuuuaggauccaugauuuagcaaagaaaguuacug uugccucuuagauucaucuuugaagucuuuuuacaaaugcaacuugu uucuuugauacgcuuuuuauaagaugccuuuuuucuaugaugaaaaagcuaa auuuuagcugaacacuggccauggauauaaaccucguggaugacuuagc auuccuuugccacugcugauguacu	20
82	エクソン 11	CUACUCUUUGGAGCCCAUCUAUGGUUUUGUGGUAUGACCACUCCUCCAAC UUCUCCUGGAAAUGUCCCACCUGAUCUGUCACACCCUUACAGUAAAGUC UUUGGUACAA	30
83	イントロン 11	uaugucuuagguuggauuuaguuaguugguuuuggccugccuuuauggg caggaggagcucucuuuuagaucaagggaaccacuugcuguuguaaacu uguuuuuugacacuuauugcaaaucccuggggcuuucagaauuguguaaag ugaaccuaaaaacaaaaagagagagacugaucuaugaucucccagaaagu uaacucuagcagcuuuauuuuauaguaauaguauuaggcugaaaaaaaaau cggcaguuuuucuaauaguugggcucaguguucauauauguucu	40
84	エクソン 12	AGGUGGAAAAGGAACUCCUCUGGGAACCCAGCAACCUCUCCUCCUCCA GCCCCACUCUGUCAUUCGGAUGACUACGUGCACAUUUCACUCCCCCAGG CCACAGUCACACCCCCCAGG	

## 【表 18】

表18：IMP DH1 標的配列

SEQ ID NO	領域	標的配列	
85	エクソン 14	GAUGAUGGGCUCUCCUGCUGGCCGCCACUACGGAGGCCCCUGGCGAGUAC UUCUUCUCAGACGGGGUGCGGCUCAAGAAGUACCGGGGCAUGGGCUCAC UGGAUGCCAUGGAGAAGAGCAGCAGCAGCCAGAAACGAUACUU	10
86	イントロン 14	cugaccugggccccaccugggcagaucagcccacaacccuucagggcc cgcucaugccaccgacuuccccagauggcagccaguccccauauggugg uucuggaaacugaggcacagggcuuaaguagcagaccaggauucugucc cuggggcaucugacucagcccagugaggggugggccuggggggaccuuccu gggcgguaucggguuuuugcccuuaagaggugggggugggguccucugag cuucaagcugcugggcucagucuu	20
87	エクソン 15	GAGGGGGAUAAAGUGAAGAUCGCGCAGGGUGUCUCGGGCUCCAUCCAGG ACAAAGGAUCCAUUCAGAAGUUCGUGCCCUACCUCAUAGCAGGCAUCCA ACACGGCUGCCAGGAUAUCGGGGCCCGCAGCCUGUCUGUCCU	30

【 0 2 5 0 】

## 【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	AGGCCUUUGUUGGACAGAUAGAAGAGUGACUUGUUUCUGGAUGAUUCUAA	10
89	イントロン 32	uucccuagagaaaccucgagcccuggugcaggucacugugucuggggug ccgggggugugcgggcugcguguccuugcugggugucuguggcuccaug uggucacaccacccgggagcagguuugcucggaagcccaggguguccgu gugugacuggacgggggugggucugugugugugacacauccccugguacc uugcugac	20
90	エクソン 33	CUGGUGUGCUGGCCCUCGCGCAGGGAACGCUCAGUUGGCCGGACCUGC UCAGUGACCCGUCCAUUGUGGGUAGCAAUCUGCGGCAGCUGGCACGGGG CCAGGCGGGCCAUGGGCUGGGCCCAGAGGAGGACGGCUUCUCCUGGCC AGCCCCUACUCGCCUGCCAAAUCCUUCUCAGCAU	
91	イントロン 33	cuggggugagaggaggggggcucugaagcucacccuugcagcuggggccca cccuauugc	30
92	エクソン 34	UGAAGACCUGAUCCAGCAGGUCCUUGCCGAGGGGGUCAGCAGCCCAGCC CCUACCCAAGACACCCACAUGGAAACGGACCUGCUCAGCAG	
93	エクソン 37	UCUUGCUGGAAGCCCUGUACUUCUCACUGGUGGCCAAGCGGCUGCACCC GGAUGAAGAUGACACCCUGGUAGAGAGCCCGGCUGUGACGCCUGUGAGC GCACGUGUGCCCCGCGUACGGCCACCCACGGCUUUGCACUCUUCUGG CCAAGGAAGAAGCCCGCAAGGUCAAGAGGCUACAUGGCAUGCUG	40
94	イントロン 37	ccugggugcgggcugugccccugccaccuccgucucuugucuccaccu cccacccaugcacgcaggacacuccugucccccuuuccucaccucagaa ggcccuuagggguucaaugcucugcagccuuugcccggucuccuccua	

【表 19 - 2】

		ccccacgccccccacuugcugccccagucccugccagggcccagcucca augcccacuccugccugggcccgagaaggcccccuaagcaccacugcagugg ccugugugucugccccagguggggguuccgggcaggguugugugcugcca uuaccucggccagguagagucuuuggggcgccccugccagcucaccuuc cugcagccacaccugccgcagccauggcuccagccguugccaaagcccu gcugucacuguggggcuggggccaggcugaccacagggc	10
95	エクソン 38	GCCUCCUGGUGUACAUGCUUUUCUGCUGGUGACCCUGCUGGCCAGCUA UGGGGAUGCCUCAUGCCAUGGGCACGCCUACCGUCUGCAAAGCGCCAUC AAGCAGGAGCUGCACAGCCGGGCCUCCUGGCCAUCAC	
96	イントロン 38	ggcauccggugcacuggucugucuucuggggcuuuaguuuugccuuuagu ccagccagacccuaggggacauguggacauguguagauaccuuuguggc ugcuagaacuggagguaggugcugcuggcaucaguaggcagaggggagg gacacagguccgugucuugcagugcacaggacggggcccaugacagacaa cugucugccccagaacaucucccaggauaaggcugagaagcccaggucua gccguggccagcagggcagugggagccauguucccugggucucuggugg ccgcucacucgaggcgggcauggggcaguagggggcuggagcguguga	20 30
97	エクソン 39	UCUGAGGAGCUCUGGCCAUGGAUGGCCCACGUGCUGCUGCCCUACGUCC ACGGGAACCAGUCCAGCCCAGAGCUGGGGCCCCCACGGCUGCGGCAGGU GCGGCUGCAGG	

【 0 2 5 2 】

表 20: IKBKAP 標的配列

[illegible]

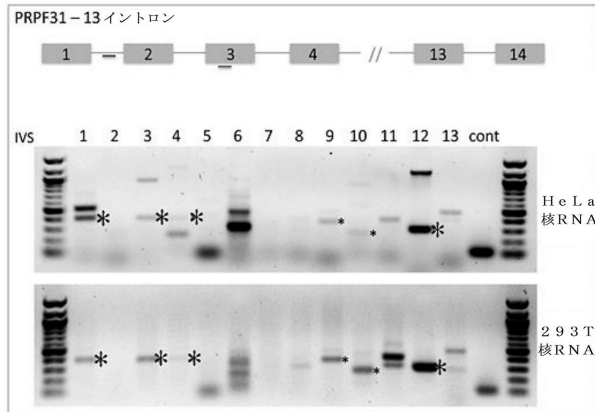
【表 2 0 - 2】

		<p>gccugauuuuagauagaagauguaucuccucuguuucggugauaucugu          uguauguagaccucuuguuuuccaccaguaucugaaugguauuauauga          uagagcagaagagagaauguaauugaauuaaaacccuagagacaaauaug          aaauaagaugaggcaauuaagauguuuucaacauuuggugaagucuuaaa          aaagaccuacuggagcauagaauuuugcugaaguuguauaauggaagg          agaaauagauuuugauuuuuaggacauuauaccuggaauugguuuagaua          acuuauuauuuuuuaaagucauccaaaugcaauguaaaauauguaagguuu          ugugggcaaauggagccucuguguaaaaacaggaaaaggcacucuuuccu          cugggcaaguacagucccacagugggaugaaccgcucgccgagagacaa          gggacacaugggauuuuaaaacuuccuuggauaaagauauucauuauuc          guucauucauucauucauguuugcuggaaaaaaaacucucucuggauuuu          aucuauucuuuaguagguagcguuucgauauuguaacacuc</p>	10
102	エクソン 9	<p>CCCUCAGGCAGUUUGAUUGCAUCUACACAAGAUAAACCCAACCAGCAGG          AUAUUGUGUUUUUGAGAAAAAUGGACUCCUUCAUGGACACUUUACACU          UCCCUUCCUUAAGAUGAGGUU</p>	20

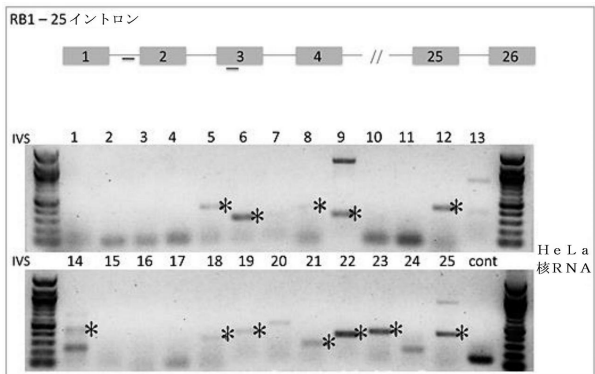




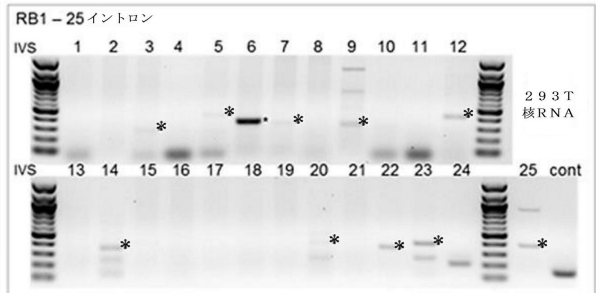
【図 6 A】



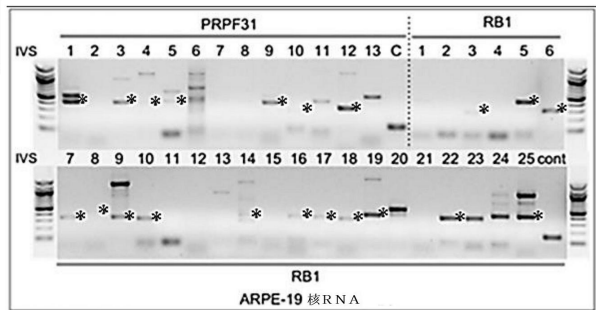
【図 6 B】



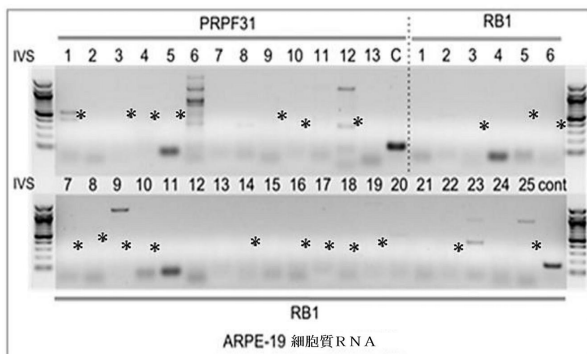
【図 6 C】



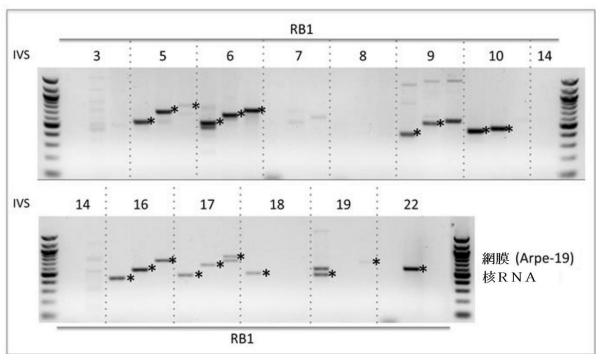
【図 6 D】



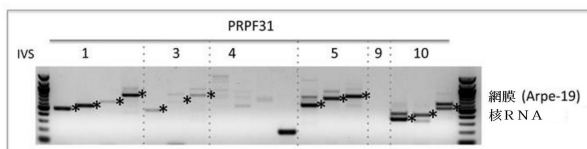
【図 6 E】



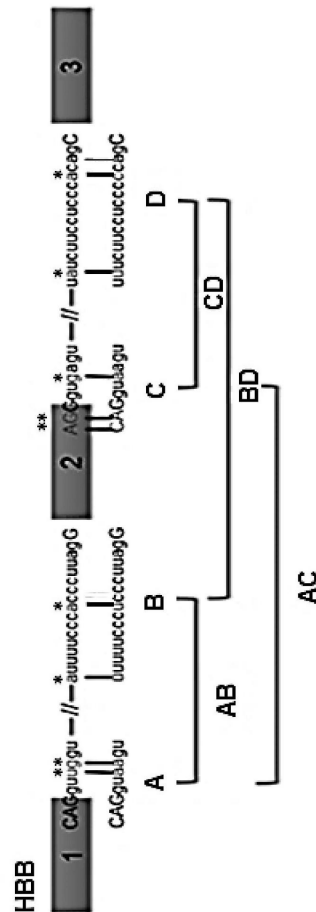
【図 7 B】



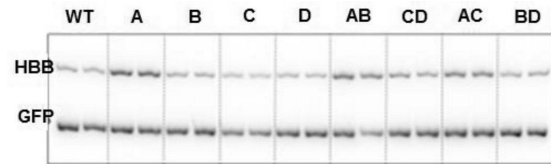
【図 7 A】



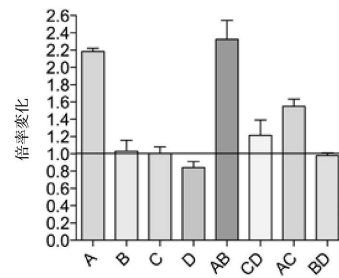
【図 8 A】



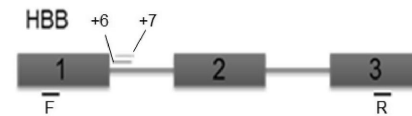
【図 8 B】



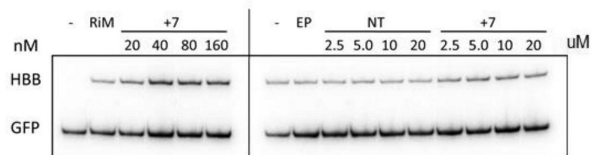
【図 8 C】



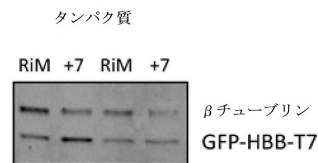
【図 9 A】



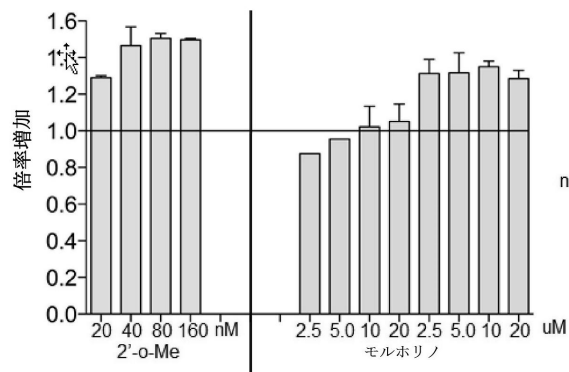
【図 9 B】



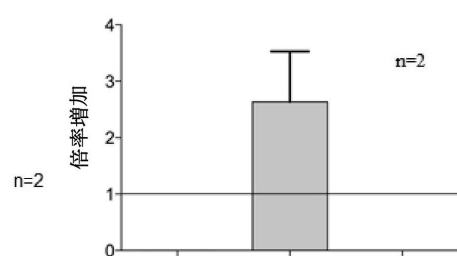
【図 10 B】



【図 9 C】



【図 10 C】



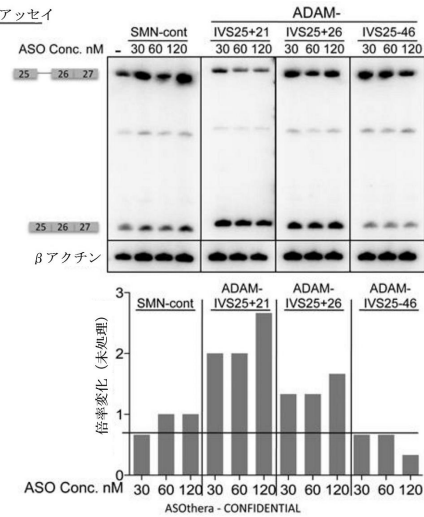
【図 10 A】





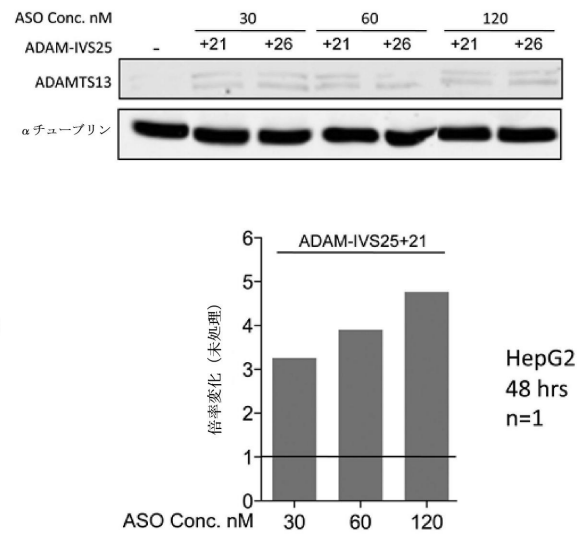
## 【図 15】

Hot RT-PCR アッセイ



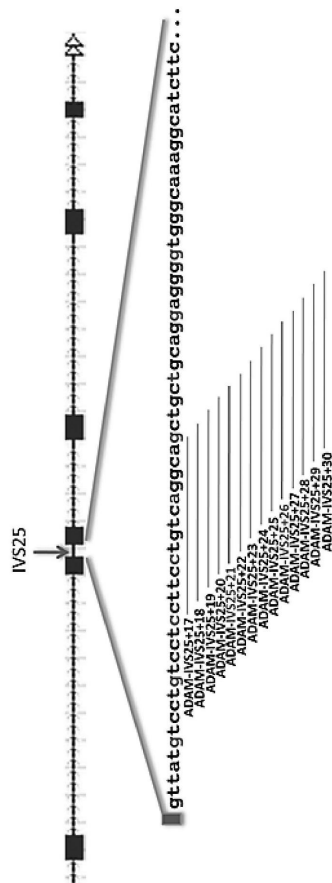
## 【図 16】

ウェスタンブロット解析



## 【図 17】

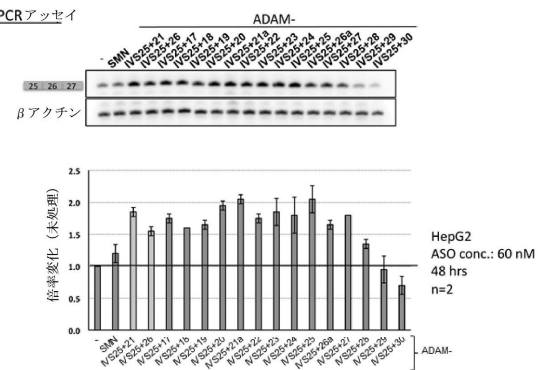
ADAMTS13 エクソン 24-29



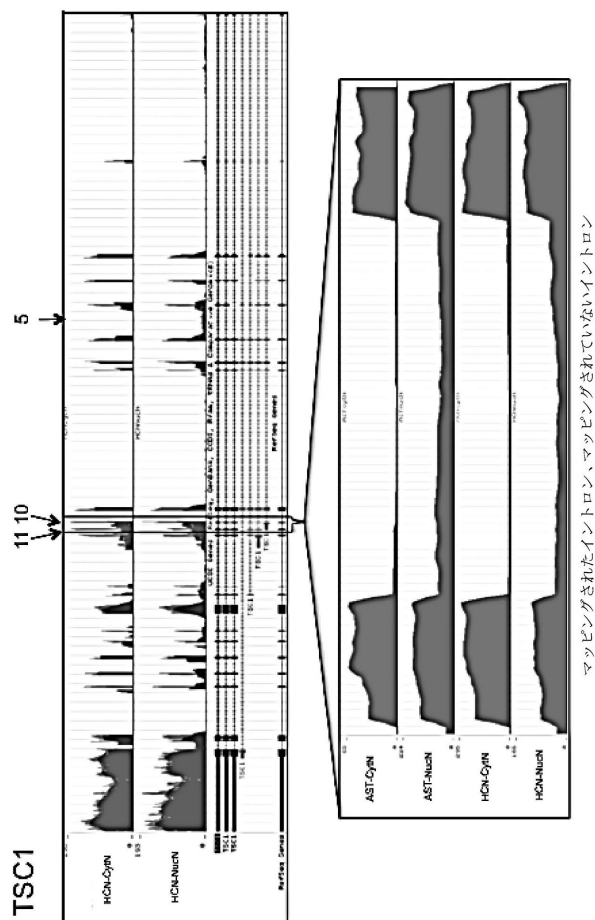
ASOs: 18-mer, 2'-o-Me, 5'-Me-Cytosine, RNA, PS 骨格

## 【図 18】

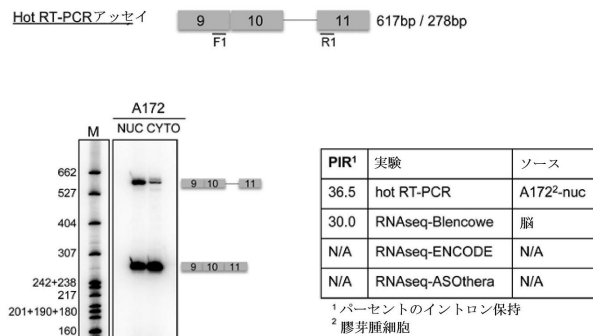
Hot RT-PCR アッセイ



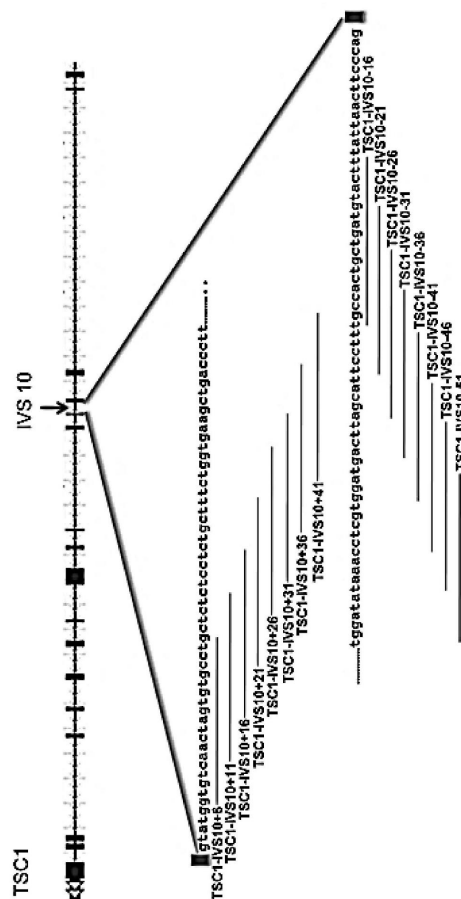
【 ㄨ 1 9 】



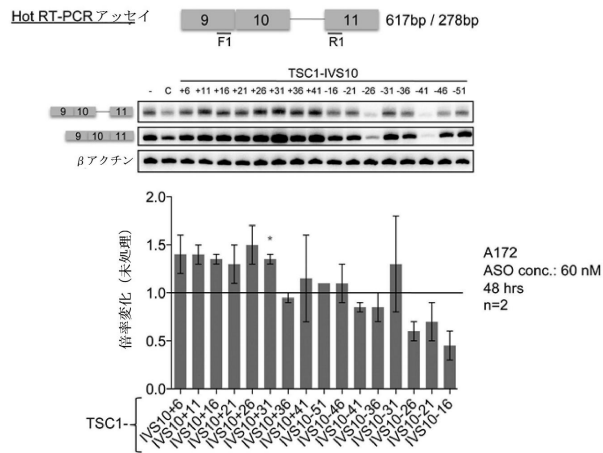
【 ㄨ 2 0 】



【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



A172  
ASO conc.: 60 nM  
48 hrs  
n=2



【 ㊦ 2 8 】

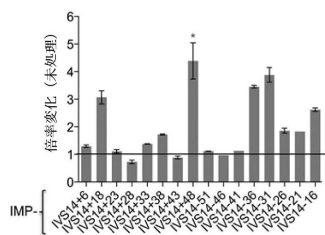
IMP-IVS14

14 15 16

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

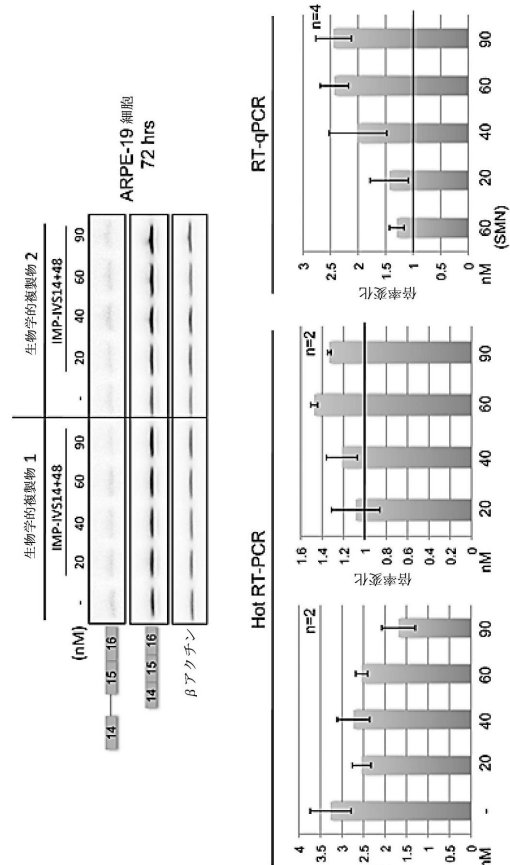
smn +6 +18 +23 +28 +33 +38 +43 +48 -51 -46 -41 -36 -31 -26 -21

β アクチン



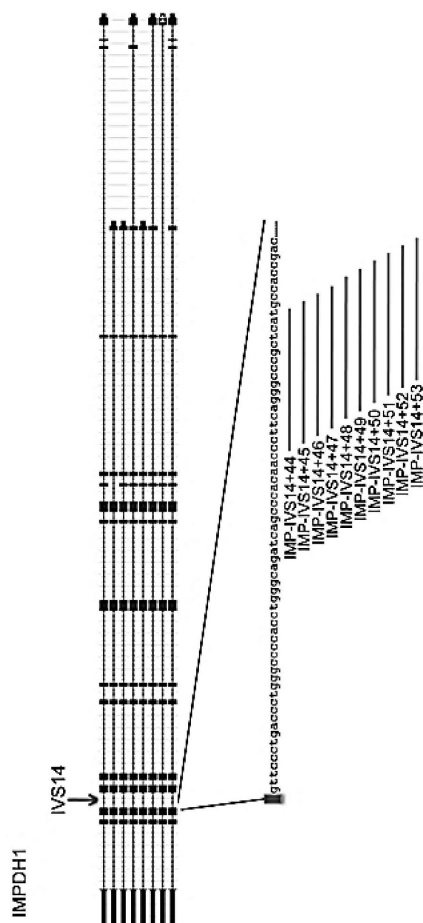
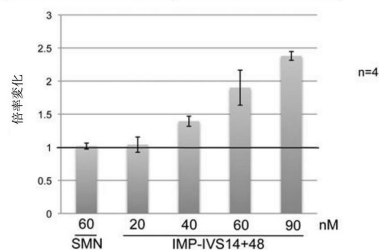
ARPE-19 細胞  
ASO conc.: 60 nM  
48 hrs  
n=2

### Hot RT-PCR アッセイ



## 【 ㄨ 3 0 】

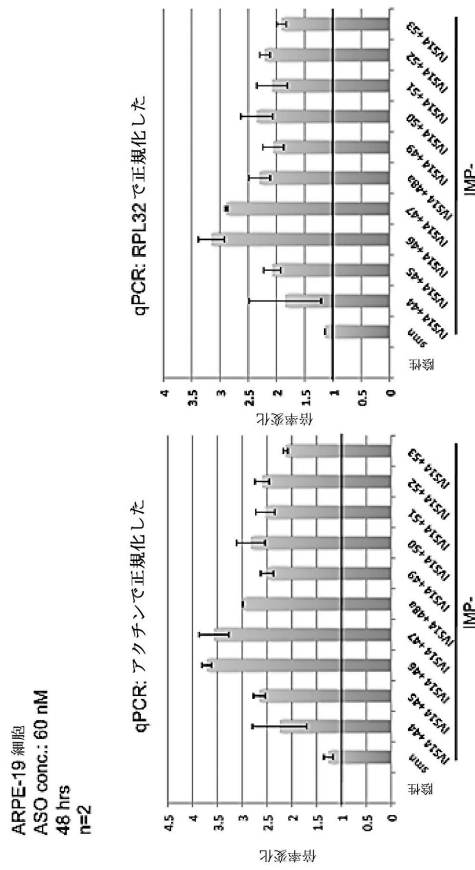
	生物学的複製物 1						生物学的複製物 2					
	SMN	IMP-IVS14+48					SMN	IMP-IVS14+48				
(nM)	-	60	20	40	60	90	-	60	20	40	60	90
β カテニン												
IMPDH1												
β アクチン												



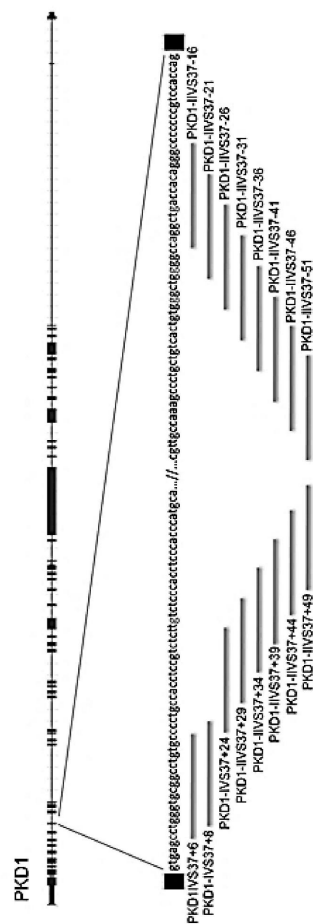
ASOs: 18-mer, 2'-o-Me, 5'-Me-Cytosine, RNA, PS 骨格



【図 3 1】

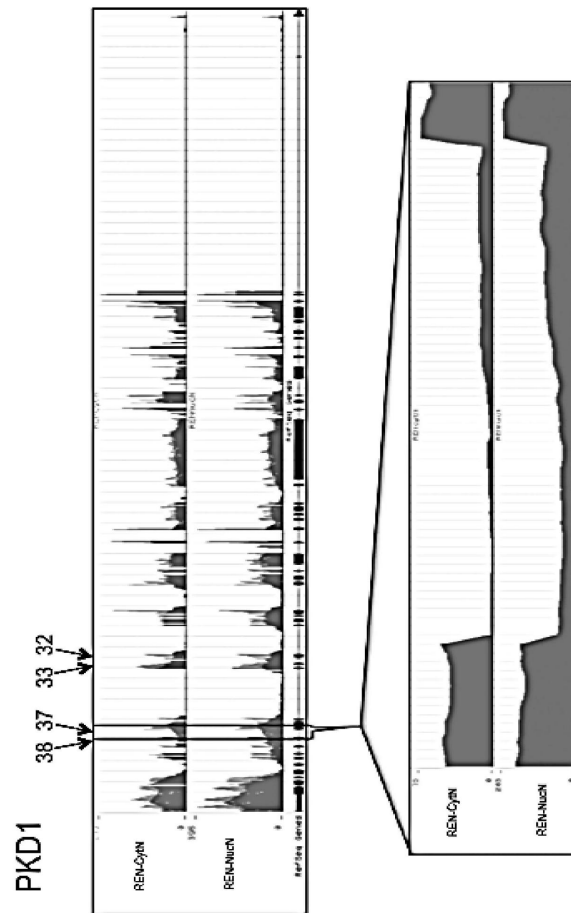


【図 3 3】

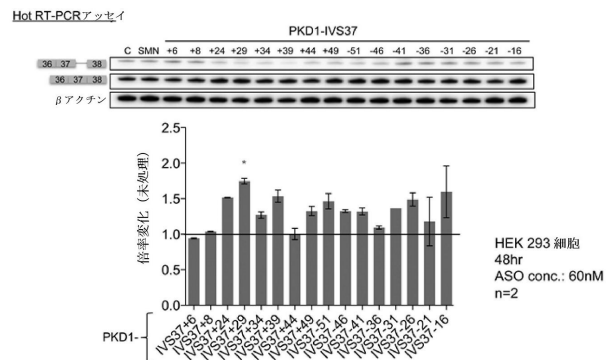


ASOs: 18-mer, 2'-o-Me RNA, PS 骨格

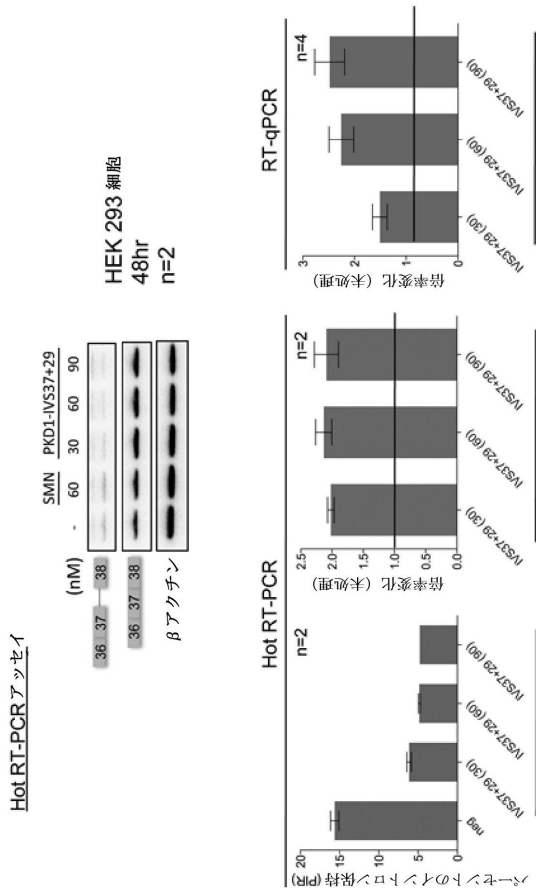
【図 3 2】



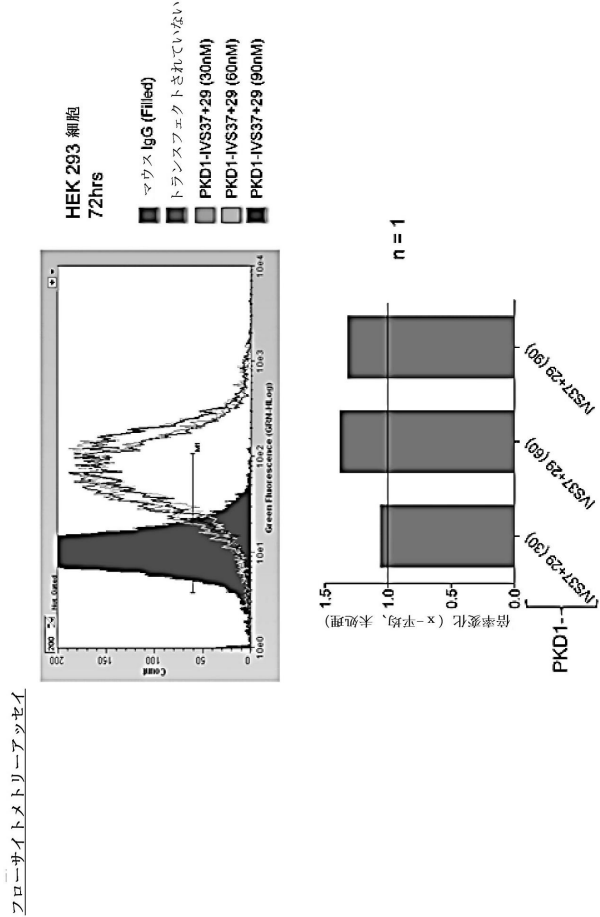
【図 3 4】



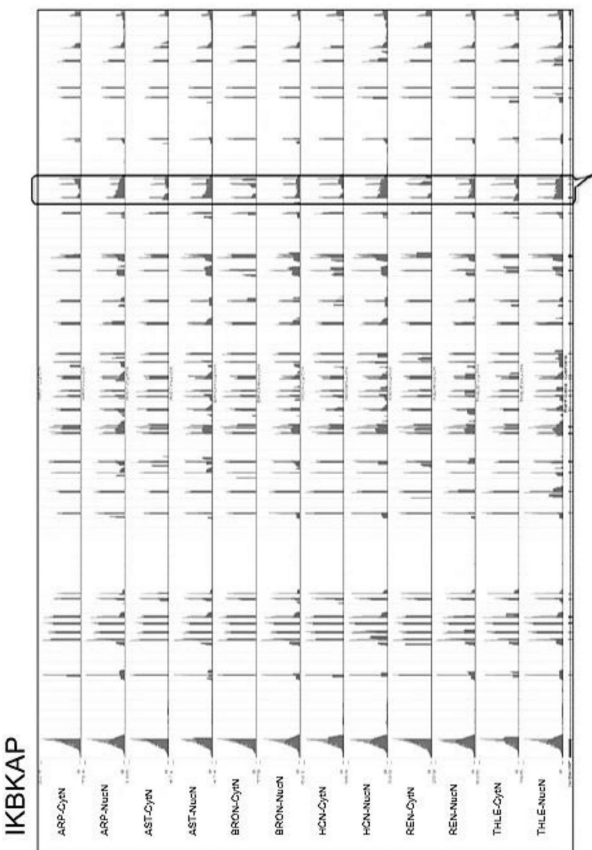
【図 3 5】



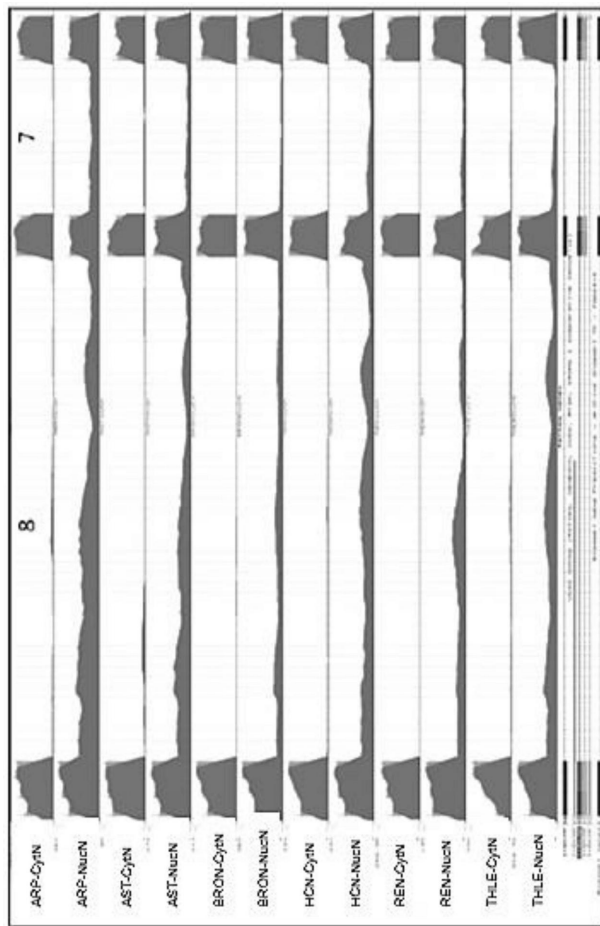
【図 3 6】



【図 3 7 - 1】

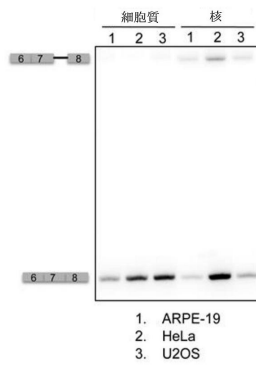


【図 3 7 - 2】



## 【図 38】

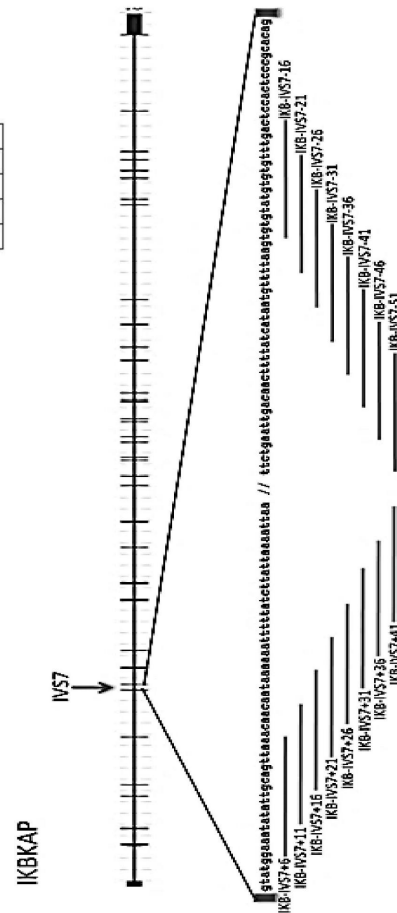
Hot RT-PCR 分析



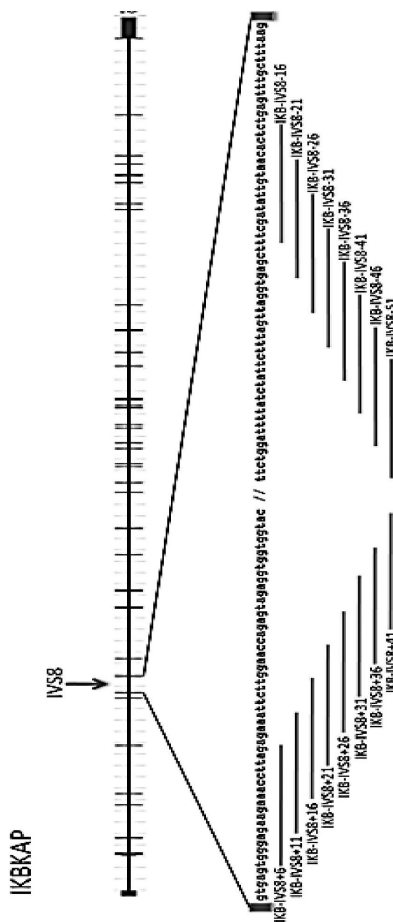
PIR <sup>1</sup>	実験	ソース
35.5	hot RT-PCR	ARPE19 <sup>2</sup>
18	hot RT-PCR	HeLa <sup>3</sup>
26	hot RT-PCR	U2OS <sup>4</sup>
33	RNAseq-ASO <sup>thera</sup>	ARPE-19

<sup>1</sup>パーセントのイントロン保持<sup>2</sup>網膜上皮<sup>3</sup>子宮頸癌<sup>4</sup>骨肉腫

## 【図 39 - 1】

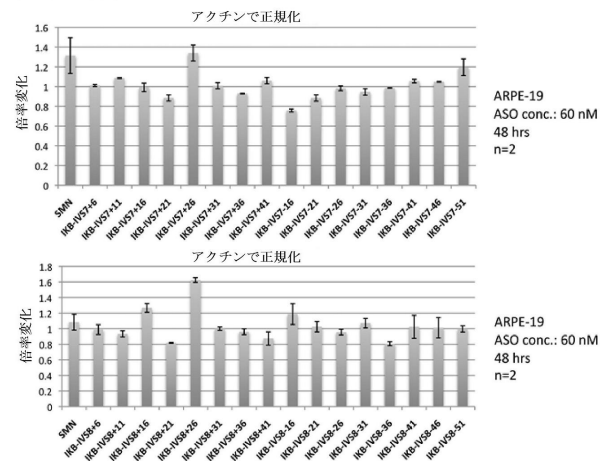


## 【図 39 - 2】

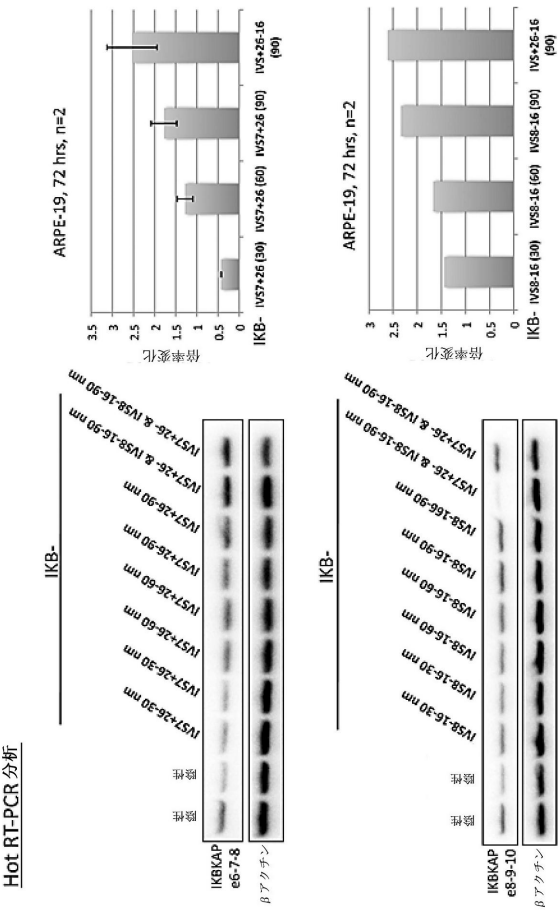


## 【図 40】

RT-qPCR 分析



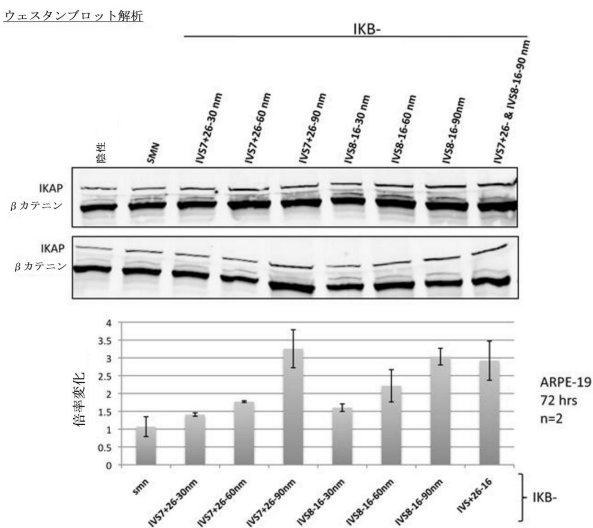
【図 4 1】



【配列表】

0006867945000001.app

【図 4 2】



## 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 1 1 7 4 6 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 アズナレズ, イザベル

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州 ケンブリッジ マガジン・ストリート 5 5  
アパートメント 1 2 エー

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 0 6 7 7 0 ( W O , A 1 )

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

SIERAKOWSKA H, SAMBADE MJ, ET AL, REPAIR OF THALASSEMIC HUMAN -GLOBIN MRNA IN MAMMAL  
IAN CELLS BY ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES, PROC NATL ACAD PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 1  
9 9 6 年 1 1 月, V93 N23, P12840-:12844, U R L, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8917506>

Nucleic Acids Research, 2 0 1 7 年 6 月, Vol.42, No.12, p.8161-8173

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1 9 9 9 年, Vol.274 .No.51, p.36193-36199

WIREs RNA, 2 0 1 3 年, Vol.4, p.247-266

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0

A 6 1 K 4 8 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0

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 )