

明 細 書

発明の名称：

エクソン 5 1 のスキッピングを誘導するアンチセンス核酸

技術分野

[0001] 本発明は、ヒトジストロフィン遺伝子の第 5 1 番目のエクソンのスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴマー及び該アンチセンスオリゴマーを含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は出生男子約 3, 5 0 0 人に 1 人が発症する最も頻度の高い重篤な遺伝性進行性筋萎縮症である。乳幼児期には健常者とほとんど変わらない運動機能を示すが、4～5 歳頃から筋力低下が見られる。その後、DMD 患者の筋力低下は進行し、DMD 患者は 1 2 歳頃までに歩行不能になり、2 0 歳代で心不全または呼吸器不全により死に至る。現在、DMD に対する十分な治療法はなく、有効な治療薬の開発が強く求められている。

[0003] DMD の原因はジストロフィン遺伝子の変異であることが知られている。ジストロフィン遺伝子は X 染色体に存在し、2 2 0 万塩基対の DNA から成る巨大な遺伝子である。DNA から mRNA 前駆体に転写され、さらにスプライシングによりイントロンが除かれ 7 9 個のエクソンが結合して翻訳領域に対応する mRNA は 1 1, 0 5 8 塩基になる。この mRNA から 3, 6 8 5 のアミノ酸に翻訳され、ジストロフィタンパク質が生成される。ジストロフィタンパク質は筋細胞の膜安定性の維持に関与しており、筋細胞を壊れにくくするために必要である。DMD 患者のジストロフィン遺伝子は変異を有するため、筋細胞において機能を持つジストロフィタンパク質が殆ど発現されない。そのため、DMD 患者体内では、筋細胞の構造を維持できなくなり、多量のカルシウムイオンが筋細胞内に流れ込む。その結果、炎症に似た反応が生じ、線維化が進むために筋細胞が再生されにくくなる。

- [0004] ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）もジストロフィン遺伝子の変異が原因であるが、その症状は筋萎縮による筋力低下を呈するものの一般にDMDと比較して軽く、筋力低下の進行も遅く、多くの場合、成人期に発症する。DMDとBMDとの臨床症状の違いは、変異によりジストロフィンのmRNAがジストロフィンタンパク質へと翻訳される際のアミノ酸読み取り枠が破壊されるか、あるいは維持されるかによるものと考えられている（非特許文献1）。つまり、DMDでは、アミノ酸読み取り枠がずれる変異を有することにより、機能を持つジストロフィンタンパク質がほとんど発現しないが、BMDでは変異によりエクソンの一部は欠失しているが、アミノ酸読み取り枠は維持されているために不完全ながらも機能を有するジストロフィンタンパク質が産生される。
- [0005] DMDの治療法として、エクソンスキッピング法が期待されている。この方法は、スプライシングを改変することでジストロフィンのmRNAのアミノ酸読み取り枠を修復し、部分的に機能を回復したジストロフィンタンパク質の発現を誘導する方法である（非特許文献2）。エクソンスキッピングの対象となるアミノ酸配列部分は失われることになる。そのためこの治療で発現されるジストロフィンタンパク質は正常のものより短くなるが、アミノ酸読み取り枠が維持されるために筋細胞を安定化する機能が部分的に保持される。従って、エクソンスキッピングにより、DMDは、より軽症のBMDと同じような症状を呈するようになると期待されている。エクソンスキッピング法は、マウスやイヌによる動物実験を経て、ヒトDMD患者に対する臨床試験が行われている。
- [0006] エクソンスキッピングは、5'又は3'スプライス部位のいずれか若しくは両方、又はエクソンの内部を標的とするアンチセンス核酸の結合により誘導することができる。エクソンは両方のスプライス部位がスプライソソーム複合体によって認識された場合のみmRNAに包含される。従って、スプライス部位をアンチセンス核酸でターゲティングすることにより、エクソンスキッピングを誘導することができる。また、エクソンがスプライシングの

機構に認識されるためにはエクソンスプライシングエンハンサー（ESE）へのSRタンパク質の結合が必要であると考えられており、ESEをターゲットリングすることでもエクソンのスキッピングを誘導することができる。

[0007] ジストロフィン遺伝子の変異はDMD患者によって異なるため、遺伝子変異の場所や種類に応じたアンチセンス核酸が必要になる。これまでに、西オーストラリア大学のSteve Wiltsonらによって79個全てのエクソンに対してエクソンスキッピングを誘導するアンチセンス核酸が作製されており（非特許文献3）、オランダのAnnemieke Aartsma-Rusらによって39種類のエクソンに対してエクソンスキッピングを誘導するアンチセンス核酸が作製されている（非特許文献4）。

[0008] 全DMD患者の13%程度は、第51番目のエクソン（以下、「エクソン51」という）をスキッピングすることで治療可能と考えられている。近年では、ジストロフィン遺伝子のエクソン51をエクソンスキッピングのターゲットとした研究について、複数の報告がなされている（特許文献1～10及び非特許文献3～7）。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：国際公開第2015/137409号
特許文献2：国際公開第2019/241385号
特許文献3：国際公開第2002/024906号
特許文献4：国際公開第2004/048570号
特許文献5：国際公開第2004/083432号
特許文献6：国際公開第2006/000057号
特許文献7：国際公開第2010/048586号
特許文献8：国際公開第2009/054725号
特許文献9：国際公開第2010/050801号
特許文献10：国際公開第2010/050802号

[0010] 非特許文献1：Monaco A. P. et al., Genomics 2:90-95 (1988)

非特許文献2 : Matsuo M., Brain and Development 18:167-172 (1996)

非特許文献3 : Wilton S. D. et al., Molecular Therapy 15:1288-1296 (2007)

非特許文献4 : Annemieke Aartsma-Rus et al., Neuromuscular Disorders 12:S71-S77 (2002)

非特許文献5 : Aoki Y. et al., Molecular Therapy 18:1995-2005 (2010)

非特許文献6 : Nakano S. et al., Pediatrics International 53:524-529 (2011)

非特許文献7 : Echigoya Y et al., Molecular Therapy 25:2561-2572 (2017)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0011] 上記のような状況において、ジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを高効率に誘導する新規アンチセンスオリゴマーが望まれる。また、ジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを高効率に誘導する活性を維持しつつ、かつ医薬として優れた性質（例えば溶解性、安全性）を有するアンチセンスオリゴマーが望まれる。

課題を解決するための手段

- [0012] 本発明者らは、上記文献に記載の技術内容及びジストロフィン遺伝子の構造などを詳細に研究した結果、配列番号1～89及び91～93のいずれかに示す塩基配列を有するアンチセンスオリゴマーを投与することにより、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを高効率に誘導することを見出した。また、研究の結果、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを高効率に誘導しつつ、かつ優れた溶解性及び安全性を有するアンチセンスオリゴマーを見出した。本発明者らは、この知見に基づき、本発明を完成させた。
- [0013] 即ち、本発明は、以下のとおりである。

[1]

下記 (a 1) ~ (d 1) :

(a 1) 配列番号 1 ~ 89 及び 91 ~ 93 のいずれかの塩基配列を含むアンチセンスオリゴマー ;

(b 1) 配列番号 1 ~ 89 及び 91 ~ 93 のいずれかの塩基配列に対して 1 ~ 5 個の塩基が欠失、置換、挿入、および／または付加された塩基配列を含み、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン 51 のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー ;

(c 1) 配列番号 1 ~ 89 及び 91 ~ 93 のいずれかの塩基配列に対して、80%以上の配列同一性を有する塩基配列を含み、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン 51 のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー ; および

(d 1) 配列番号 1 ~ 89 及び 91 ~ 93 のいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズするアンチセンスオリゴマーであって、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン 51 のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー

からなる群から選択されるアンチセンスオリゴマー (但し、配列番号 90 および 97 ~ 126 のいずれかの塩基配列からなるアンチセンスオリゴマーを除く) もしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物。

[2]

以下の (e) ~ (h) :

(e) 配列番号 1 ~ 89 及び 91 ~ 93 のいずれかの塩基配列からなるアンチセンスオリゴマー ;

(f) 配列番号 1 ~ 89 及び 91 ~ 93 のいずれかの塩基配列に対して 1 ~ 5 個の塩基が欠失および／または置換された塩基配列からなり、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン 51 のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー ;

(g) 配列番号 1 ~ 89 及び 91 ~ 93 のいずれかの塩基配列に対して、8

0%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー；および

(h) 配列番号1～89及び91～93のいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするアンチセンスオリゴマーであって、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー

からなる群から選択されるアンチセンスオリゴマー（但し、配列番号90および97～126のいずれかの塩基配列からなるアンチセンスオリゴマーを除く）もしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物。

[3]

前記アンチセンスオリゴマーが、

配列番号1～89及び91～93のいずれかの塩基配列に対して、90%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を有し、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー

である、上記[1]又は[2]に記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物。

[4]

前記アンチセンスオリゴマーが、

(a2) 配列番号7、8、10、16、21、24、31、42、67及び76のいずれかの塩基配列を含むアンチセンスオリゴマー；

(b2) 配列番号7、8、10、16、21、24、31、42、67及び76のいずれかの塩基配列に対して1～5個の塩基が欠失、置換、挿入、および／または付加された塩基配列を含み、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー；

(c2) 配列番号7、8、10、16、21、24、31、42、67及び76のいずれかの塩基配列に対して、80%以上の配列同一性を有する塩基配列を含み、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー；および

(d2) 配列番号7、8、10、16、21、24、31、42、67及び76のいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするアンチセンスオリゴマーであって、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー

からなる群から選択されるアンチセンスオリゴマー

である、上記[1]に記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物。

[5]

オリゴヌクレオチドである、上記[1]～[4]のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物。

[6]

前記オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1つのヌクレオチドの糖部分及び／又はリン酸結合部分が修飾されている、上記[5]に記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物。

[7]

前記オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも1つのヌクレオチドの糖部分は、2'位の-OH基が、OR、R、R'OR、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、N₃、CN、F、Cl、Br及びIからなる群より選択されるいずれかの基（上記Rは、アルキル又はアリアルを示し、上記R'は、アルキレンを示す。）で置換されたりボースである、上記[5]又は[6]に記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれら

の水和物。

[8]

前記オリゴヌクレオチドを構成する少なくとも 1 つのヌクレオチドのリン酸結合部分が、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、アルキルホスホネート結合、ホスホロアミデート結合、及びボラノフォスフェート結合からなる群から選択されるいずれか 1 つのものである、上記 [5] ～ [7] のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物。

[9]

モルホリノオリゴマーである、上記 [1] ～ [4] のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物。

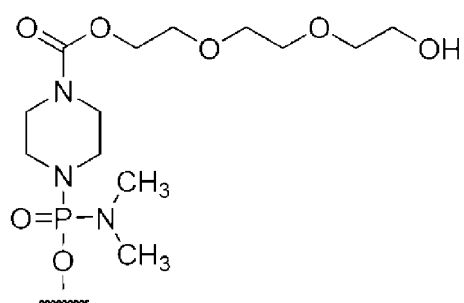
[1 0]

ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーである、上記 [9] に記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物。

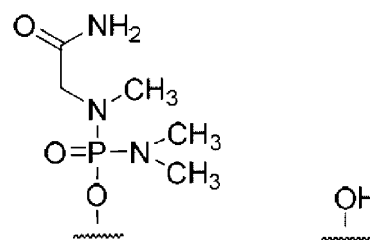
[1 1]

5' 末端が、下記化学式 (1) ～ (3) :

[化1]



(1)



(2)



(3)

のいずれかの基である、上記〔９〕または〔１０〕に記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物。

〔１２〕

上記〔１〕～〔１１〕のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物を含む、筋ジストロフィー治療用医薬組成物。

〔１３〕

さらに医薬的に許容可能な担体を含む、上記〔１２〕に記載の医薬組成物。

〔１４〕

筋ジストロフィー患者に投与するための上記〔１２〕または〔１３〕に記載の医薬組成物であって、前記患者が、ジストロフィン遺伝子にエクソン５１のスキッピングの対象となる変異を有する患者である、医薬組成物。

〔１５〕

前記患者が、少なくともエクソン５１近傍のエクソンの欠失によるフレームシフト突然変異を有するとともにエクソン５１のスキッピングによりアミノ酸の読み取り枠が修正されるジストロフィン遺伝子を有する、上記〔１４〕に記載の医薬組成物。

〔１６〕

前記患者が、ジストロフィン遺伝子にエクソン１３－５０、２９－５０、４０－５０、４３－５０、４５－５０、４７－５０、４８－５０、４９－５０、５０、５２、５２－６３の欠失によるフレームシフト突然変異を有する、上記〔１４〕または〔１５〕に記載の医薬組成物。

〔１７〕

前記患者がヒトである、上記〔１４〕～〔１６〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔１８〕

筋ジストロフィー治療用医薬の製造における上記〔１〕～〔１１〕のい

れかに記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物の使用。

[1 9]

上記 [1] ~ [1 1] のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物の有効量、または上記 [1 2] ~ [1 6] のいずれかに記載の医薬組成物を、筋ジストロフィー患者に投与する工程を含む、筋ジストロフィーの治療方法。

[2 0]

前記患者がヒトである、上記 [1 9] に記載の治療方法。

[2 1]

筋ジストロフィーの治療に使用するための、上記 [1] ~ [1 1] のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物、または上記 [1 2] ~ [1 6] のいずれかに記載の医薬組成物。

[2 2]

前記治療において、筋ジストロフィー患者がヒトである、上記 [2 1] に記載のアンチセンスオリゴマーもしくはその医薬的に許容可能な塩またはそれらの水和物、または医薬組成物。

発明の効果

[0014] 本発明により、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを高効率に誘導するアンチセンスオリゴマーを提供することができる。また、本発明により、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを高効率に誘導する活性を維持しつつ、かつ優れた溶解性を有するアンチセンスオリゴマーを提供することができる。さらに、本発明により、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを高効率に誘導する活性を維持しつつ、かつ優れた溶解性および安全性を有する（例えば、腎臓および肝臓の機能への影響がないか、影響を与える可能性が極めて低い）アンチセンスオリゴマーを提供することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1] PMO No. 43、44、45、46のアンチセンスオリゴマーの、ヒト横紋筋肉腫細胞（RD細胞）におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図2] PMO No. 42、45、47、48、49、50のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図3] PMO No. 42、62、63、89のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図4] PMO No. 83、85のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図5] PMO No. 33、34、35、36、37、38のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図6] PMO No. 83、85、90のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図7] PMO No. 82、84、86、87のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図8] PMO No. 45、51、52、56、57、58、59、60、61のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図9] PMO No. 42、64、65、66、85のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図10] PMO No. 1、2、42、66、67、85、88、92、93

のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図11]PMO No. 3、4、5、6、7、8、42、68、69、70、85のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図12]PMO No. 8、9、10、11、12、13、14、42、71、72、73、91のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図13]PMO No. 8、15、16、17、42、74、75、76のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図14]PMO No. 8、18、19、20、42、63、75、76、77のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図15]PMO No. 8、21、22、23、24、25、26、42、77、78のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図16]PMO No. 8、21、27、28、29、30、42、79、80、81のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図17]PMO No. 8、16、21、31、32、67のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図18]PMO No. 16、21、94のアンチセンスオリゴマーの、RD細胞におけるヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピング効率を示す。

[図19]PMO No. 42のアンチセンスオリゴマーの、マウスにおける安全性試験の結果を示す。左からアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（

A S T) 値、アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T) 値、尿素窒素量 (B U N) 値、クレアチニン値を平均値±標準偏差で示す (S t u d e n t の t 検定による有意水準: $p < 0.05$)。

[図20] P M O No. 16および90のアンチセンスオリゴマーの、マウスにおける安全性試験の結果を示す。左からA S T 値、A L T 値、B U N 値、クレアチニン値を平均値±標準偏差で示し、有意に上昇が見られた値にp値を示す (D u n n e t t の検定による有意水準: $p < 0.05$)。

[図21] P M O No. 21のアンチセンスオリゴマーの、マウスにおける安全性試験の結果を示す。左からA S T 値、A L T 値、B U N 値、クレアチニン値を平均値±標準偏差で示す (S t u d e n t の t 検定による有意水準: $p < 0.05$)。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を詳細に説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態のみに限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施をすることができる。

[0017] 1. アンチセンスオリゴマー

本発明は、ヒトジストロフィン遺伝子の第51番目のエクソンを高効率にスキッピングするアンチセンスオリゴマー（以下、「本発明のアンチセンスオリゴマー」という）を提供する。

[0018] [ヒトジストロフィン遺伝子の第51番目のエクソン]

本発明において、「遺伝子」には、ゲノム遺伝子以外に、c D N A、m R N A 前駆体及びm R N A も含まれる。好ましくは、遺伝子は、m R N A 前駆体、即ち、p r e - m R N A である。

ヒトゲノムにおいて、ヒトジストロフィン遺伝子は遺伝子座X p 21.2に存在する。ヒトジストロフィン遺伝子は、220万塩基対のサイズを有しており、既知のヒト遺伝子としては最大の遺伝子である。但し、ヒトジストロフィン遺伝子のコード領域はわずか14 k b に過ぎず、該コード領域は7

9個のエクソンとしてジストロフィン遺伝子内に分散している (Roberts, RG., et al., Genomics, 16: 536-538 (1993); Koenig, M., et al., Cell 53: 219-228 (1988))。ヒトジストロフィン遺伝子の転写物である p r e - m R N A は、スプライシングを受けて 1 4 k b の成熟 m R N A を生成する。ヒトの野生型ジストロフィン遺伝子の塩基配列は公知である (GenBank Accession No. NM_004006)。

ヒトの野生型ジストロフィン遺伝子のエクソン 5 1 の塩基配列を配列番号 1 2 7 に示す。

[0019] [アンチセンスオリゴマー]

本発明のアンチセンスオリゴマーは、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン 5 1 のスキッピングにより、DMD型ジストロフィン遺伝子でコードされるタンパク質を、BMD型ジストロフィンタンパク質に改変することを目的として作製されたものである。従って、アンチセンスオリゴマーのエクソンスキッピングの対象となるジストロフィン遺伝子のエクソン 5 1 には、野生型だけではなく、変異型も含まれる。

[0020] 本発明のアンチセンスオリゴマーは、具体的には以下の (a 1) ~ (d 1) からなる群から選択されるいずれかに記載のアンチセンスオリゴマーである。

(a 1) 配列番号 1 ~ 8 9 及び 9 1 ~ 9 3 のいずれかの塩基配列を含むアンチセンスオリゴマー；

(b 1) 配列番号 1 ~ 8 9 及び 9 1 ~ 9 3 のいずれかの塩基配列に対して 1 ~ 5 個、1 ~ 4 個、1 ~ 3 個、1 ~ 2 個、または 1 個の塩基が欠失、置換、挿入、及び／又は付加された塩基配列を含み、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン 5 1 のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー；

(c 1) 配列番号 1 ~ 8 9 及び 9 1 ~ 9 3 のいずれかの塩基配列に対して、8 0 % 以上、8 4 % 以上、8 5 % 以上、8 9 % 以上、9 0 % 以上、9 4 % 以上、または 9 5 % 以上の配列同一性を有する塩基配列を含み、かつヒトジス

トロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー；および

(d1) 配列番号1～89及び91～93のいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズするアンチセンスオリゴマーであって、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー

[0021] 別の態様として、本発明のアンチセンスオリゴマーは、具体的には以下の(e)～(h)からなる群から選択されるいずれかに記載のアンチセンスオリゴマーである。

(e) 配列番号1～89及び91～93のいずれかの塩基配列からなるアンチセンスオリゴマー；

(f) 配列番号1～89及び91～93のいずれかの塩基配列に対して1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、または1個の塩基が欠失および／または置換された塩基配列からなり、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー；

(g) 配列番号1～89及び91～93のいずれかの塩基配列に対して、80%以上、84%以上、85%以上、89%以上、90%以上、94%以上、または95%以上の配列同一性を有する塩基配列からなり、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー；および

(h) 配列番号1～89及び91～93のいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと高ストリンジントな条件下でハイブリダイズするアンチセンスオリゴマーであって、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー

[0022] 本発明のアンチセンスオリゴマーとしては、以下の(a2)～(d2)からなる群から選択されるいずれかに記載のアンチセンスオリゴマーがより好

ましい。

(a 2) 配列番号 7、8、10、16、21、24、31、42、67 及び 76 のいずれかの塩基配列を含むアンチセンスオリゴマー；

(b 2) 配列番号 7、8、10、16、21、24、31、42、67 及び 76 のいずれかの塩基配列に対して 1～5 個の塩基が欠失、置換、挿入、および／または付加された塩基配列を含み、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン 51 のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー；

(c 2) 配列番号 7、8、10、16、21、24、31、42、67 及び 76 のいずれかの塩基配列に対して、80%以上の配列同一性を有する塩基配列を含み、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン 51 のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマー；および

(d 2) 配列番号 7、8、10、16、21、24、31、42、67 及び 76 のいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするアンチセンスオリゴマーであって、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン 51 のスキッピングを誘導する活性を有するアンチセンスオリゴマーからなる群から選択されるアンチセンスオリゴマー。

[0023] 上記 (b 1)～(d 1)、(f)～(h)、および (b 2)～(d 2) のアンチセンスオリゴマーは、具体的にはそれぞれ (a 1)、(e)、および (a 2) のアンチセンスオリゴマーの変異体であり、患者のジストロフィン遺伝子の変異（例えば、多型）などに対応することを念頭に置いたものである。

[0024] ただし、本発明のアンチセンスオリゴマーは、国際公開第 2015/137409 号に記載された下記の塩基配列からなるアンチセンスオリゴマーを除く（含まない）ものである。

[表1]

配列	配列番号
CGGTAAGTTCTGTCCTCAAGGAAGATGGCA	9 0
CTCATACCTTCTGCTTCAAGGAAGATGGCA	9 7
CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	9 8
AACATCAAGGAAGATGGCATT	9 9
TCCAACATCAAGGAAGATGGC	1 0 0
ACCTCCAACATCAAGGAAGAT	1 0 1
GAGUAACAGUCUGAGUAGGAG	1 0 2
UGUGUACACAGUAACAGUC	1 0 3
AACCACAGGUUGUGUACACAG	1 0 4
UUUCCUUAGUAACCACAGGUU	1 0 5
GAGAUGGCAGUUUCCUUAGUA	1 0 6
UUCUAGUUUGGAGAUGGCAGU	1 0 7
AAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG	1 0 8
AACAUCAAGGAAGAUGGCAUU	1 0 9
AGGUACCUCCAACAUCAAGGA	1 1 0
CUGCCAGAGCAGGUACCUCCA	1 1 1
CGGUUGAAAUCUGCCAGAGCA	1 1 2
UGUCCAAGCCCGGUUGAAAUC	1 1 3
CGGUAAGUUCUGUCCAAGCCC	1 1 4
GAAAGCCAGUCGGUAAGUUCU	1 1 5
AUCAAGCAGAGAAAGCCAGUC	1 1 6
UUUAUACUUGAUCAAGCAGAG	1 1 7
CUCUGUGAUUUUAUAACUUGA	1 1 8
CACCAUCACCCUCUGUGAUUU	1 1 9
CAAGGUCACCCACCAUCACCC	1 2 0
UUGAUAUCCUCAAGGUCACCC	1 2 1
GAUCAUCUCGUUGAUUCCUC	1 2 2
UCUGCUUGAUGAUCAUCUCGU	1 2 3
GGCAUUUCUAGUUUGGAGAUG	1 2 4
CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	1 2 5
CCUCCAACAUCAAGGAAGAUG	1 2 6

[0025] 本明細書中、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするアンチセ

ンスオリゴマー」とは、例えば、配列番号 1～89 及び 91～93 のいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドの全部又は一部をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法又はサザンハイブリダイゼーション法などを用いることにより得られるアンチセンスオリゴマーをいう。ハイブリダイゼーションの方法としては、例えば、"Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001" 及び "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997" などに記載されている方法を利用することができる。

[0026] 本明細書中、「ストリンジेंटな条件」とは、低ストリンジेंटな条件、中ストリンジेंटな条件及び高ストリンジेंटな条件のいずれでもよい。「低ストリンジेंटな条件」とは、例えば、 $5\times\text{SSC}$ 、 $5\times$ デンハルト溶液、 $0.5\%\text{SDS}$ 、 50% ホルムアミド、 32°C の条件である。また、「中ストリンジेंटな条件」とは、例えば、 $5\times\text{SSC}$ 、 $5\times$ デンハルト溶液、 $0.5\%\text{SDS}$ 、 50% ホルムアミド、 42°C 又は $5\times\text{SSC}$ 、 $1\%\text{SDS}$ 、 $50\text{ mM Tris-HCl (pH 7.5)}$ 、 50% ホルムアミド、 42°C の条件である。「高ストリンジेंटな条件」とは、例えば、(1) $5\times\text{SSC}$ 、 $5\times$ デンハルト溶液、 $0.5\%\text{SDS}$ 、 50% ホルムアミド、 50°C 、(2) $0.2\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 60°C 、(3) $0.2\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 62°C 、(4) $0.2\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 65°C 、又は(5) $0.1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 65°C の条件であるが、これに限定されるものではない。これらの条件において、温度を上げるほど高い配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーが効率的に得られることが期待できる。ただし、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度、プローブ濃度、プローブの長さ、イオン強度、時間、塩濃度等の複数の要素が考えられ、当業者であればこれらの要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。ここで、「配列同一性」とは、ある 2 つの核酸のペア

について、比較対象とする塩基配列の全範囲における同一性をいい、本発明の技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて作成された塩基配列の最適なアラインメントにおいて一致する塩基の割合(%)によって表される。例えば、ある20塩基の塩基配列からなるアンチセンスオリゴマーに対して、「80%の配列同一性」を有する塩基配列からなるアンチセンスオリゴマーとは、前記の20塩基のアンチセンスオリゴマーに対して、16塩基以上の同一の塩基を有するアンチセンスオリゴマーを意味する。

[0027] 配列同一性は、FASTA (Science 227 (4693): 1435-1441, (1985)) や、カーリン及びアルチュールによるアルゴリズムBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993) を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたblastn、blastx、tblastn やtblastxと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990)。blastnを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。

[0028] ハイブリダイゼーションに市販のキットを用いる場合は、例えばAlkphos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare) を用いることができる。この場合は、キットに添付のプロトコルにしたがい、標識したプローブとのインキュベーションを一晩行った後、メンブレンを55℃の条件下で0.1% (w/v) SDSを含む1次洗浄バッファーで洗浄後、ハイブリダイズしたアンチセンスオリゴマーを検出することができる。あるいは、配列番号1～89及び91～93のいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列の全部又は一部に基づいてプローブを作製する際に、市販の試薬(例えば、PCRラベリングミックス(ロシュ・ダイアグノスティクス社)等)を用いて該プローブをジゴキシゲニン(DIG)ラベルした場合には、DIG核酸検出キット(

ロシュ・ダイアグノスティクス社）を用いてハイブリダイゼーションを検出することができる。

[0029] 上記以外にハイブリダイズ可能なアンチセンスオリゴマーとしては、FASTA、BLAST等の相同性検索ソフトウェアにより、デフォルトのパラメーターを用いて計算したときに、配列番号1～89及び91～93のいずれかの塩基配列と90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、又は99.9%以上の配列同一性を有するアンチセンスオリゴマーをあげることができる。

[0030] 「ヒトジストロフィン遺伝子の第51番目のエクソンのスキッピングを誘導する」とは、ヒトジストロフィン遺伝子の転写物（例えば、pre-mRNA）のエクソン51および／またはその隣接イントロンに相当する部位に本発明のアンチセンスオリゴマーが結合することにより、該転写物がスプライシングを受ける際にエクソン51の除外が起こり、例えばエクソン52が欠失したDMD患者の場合、エクソン50の3'末端に相当する塩基配列にエクソン53の5'末端に相当する塩基配列が連結し、コドンのフレームシフトが起こっていない成熟mRNAが形成されることを意味する。

[0031] したがって、ジストロフィン遺伝子にエクソン51のスキッピングの対象となる変異を有するDMD患者であれば、エクソン51のスキッピングにより治療が可能である。そのようなDMD患者としては、例えば、少なくともエクソン51近傍のエクソンの欠失によるフレームシフト突然変異を有するとともにエクソン51のスキッピングによりアミノ酸の読み取り枠が修正されるジストロフィン遺伝子を有するDMD患者が挙げられ、より具体的には、例えば、ジストロフィン遺伝子のエクソン13-50、29-50、40-50、43-50、45-50、47-50、48-50、49-50、50、52、52-63等の欠失を有することによるフレームシフト突然変

異を有するDMD患者が挙げられる。

[0032] ここで、前記「結合」は、本発明のアンチセンスオリゴマーとヒトジストロフィン遺伝子の転写物とを混合した場合に、生理的条件下で両者がハイブリダイズして二本鎖を形成することを意味する。上記「生理的条件下」とは、生体内と類似のpH、塩組成、温度に調節された条件を意味する。例えば、25～40℃、好ましくは37℃、pH5～8、好ましくは、pH7.4であって、塩化ナトリウム濃度が150mMの条件が挙げられる。

[0033] ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングが生じたか否かは、ジストロフィン発現細胞（例えば、ヒト横紋筋肉腫細胞）に本発明のアンチセンスオリゴマーを導入し、上記ジストロフィン発現細胞のtotal RNAから、ヒトジストロフィン遺伝子のmRNAのエクソン51の周辺領域をRT-PCR増幅し、該PCR増幅産物に対してnested PCR又はシーケンス解析を行うことにより確認することができる。

スキッピング効率ES（単位：%）は、ヒトジストロフィン遺伝子のmRNAを被検細胞から回収し、該mRNAのうち、エクソン51がスキップしたバンドのポリヌクレオチド量「A」と、エクソン51がスキップしなかったバンドのポリヌクレオチド量「B」を測定し、これら「A」及び「B」の測定値に基づき、以下の式（1）に従って計算することができる。スキッピング効率の計算については、国際公開第2012/029986号を参照することができる。

[0034]
$$ES = 100 \times A / (A + B) \cdots (1)$$

[0035] 好ましくは、本発明のアンチセンスオリゴマーは、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上の効率でエクソン51をスキッピングする。

[0036] 本発明のアンチセンスオリゴマーは、さらに、生理食塩水に対する溶解性が高いことが好ましい。生理食塩水に対する溶解性が高いアンチセンスオリゴマーは、溶解性が低いものと異なり、製剤保存時に析出して使用できなく

なる可能性が極めて低く、また、塩を含む輸液を利用した際に析出して使用できなくなる可能性も極めて低い。さらに、生理食塩水に対する溶解性が高いアンチセンスオリゴマーは、析出しにくいいため、投与時に毒性を示す可能性 (Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences 1, 91-99 (2007)) も極めて低い。したがって、生理食塩水に対する溶解性が高いアンチセンスオリゴマーは、医薬の有効成分として非常に利用価値が高い。

[0037] 生理食塩水に対する溶解性は、20 mg/mL以上であることが好ましく、30 mg/mL以上であることがより好ましく、40 mg/mL以上であることがさらに好ましく、50 mg/mL以上であることが特に好ましい。アンチセンスオリゴマーの生理食塩水に対する溶解性は、アンチセンスオリゴマーを目的の濃度で生理食塩水に溶解し、一定時間後に沈澱の有無を目視で確認することにより、評価することができる。

[0038] また、アンチセンスオリゴマーは、医薬の有効成分として安全性が高いことが好ましい。安全性は、例えば、アンチセンスオリゴマー投与後の血中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 値、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値、尿素窒素 (BUN) 値およびクレアチニン値を指標にして評価することができる。AST値は肝臓に障害が起きると高くなり、ALT値は肝臓に問題があると高くなり、BUN値は腎臓の機能が低下すると高くなり、クレアチニン値は腎臓の糸球体のろ過機能が低下すると高くなる傾向があることから、これらの値を指標としてアンチセンスオリゴマーが腎臓および肝臓の機能へ与える影響を評価することができる。

[0039] 具体的には、例えば、健常マウスにアンチセンスオリゴマーを投与した後、血中のAST値、ALT値、BUN値およびクレアチニン値を測定して統計学的有意差検定を行い、対照群 (溶媒投与または無処置) の測定値と比較して有意に上昇が見られた場合に異常値と判定して、投与したアンチセンスオリゴマーは腎臓および肝臓の機能へ影響を与えるか、影響を与える可能性が高いと判断することができる。反対に、有意に上昇が見られなかった場合には、腎臓および肝臓の機能への影響がないか、影響を与える可能性が低い

と判断することができる。また、対照群の測定値と比較して特定の上昇率、具体的には、例えば30%以上の上昇率が見られた場合に異常値と判定してもよい。

[0040] 本発明のアンチセンスオリゴマーとしては、例えば、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35塩基の長さを有する、オリゴヌクレオチド、モルホリノオリゴマー、又はペプチド核酸 (Peptide Nucleic Acid: PNA) オリゴマーを挙げることができる。アンチセンスオリゴマーの長さとしては、20～30塩基、20～29塩基、22～30塩基、22～29塩基または25～29塩基の長さが好ましく、22～30塩基、22～29塩基または25～29塩基の長さがより好ましく、モルホリノオリゴマーが好ましい。

[0041] 上記オリゴヌクレオチド（以下、「本発明のオリゴヌクレオチド」という）は、ヌクレオチドを構成単位とする本発明のアンチセンスオリゴマーであり、かかるヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド又は修飾ヌクレオチドのいずれであってもよい。

[0042] 修飾ヌクレオチドとは、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドを構成する核酸塩基、糖部分、及びリン酸結合部分の全部又は一部が修飾されているものをいう。

[0043] 本発明において、核酸塩基としては、例えば、アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、シトシン、チミン、ウラシル又はそれらの修飾塩基を挙げることができる。かかる修飾塩基としては、例えば、シュードウラシル、3-メチルウラシル、ジヒドロウラシル、5-アルキルシトシン（例えば、5-メチルシトシン）、5-アルキルウラシル（例えば、5-エチルウラシル）、5-ハロウラシル（5-ブロモウラシル）、6-アザピリミジン、6-アルキルピリミジン（6-メチルウラシル）、2-チオウラシル、4-チオウラシル、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5'-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボ

キシメチルアミノメチルウラシル、1-メチルアデニン、1-メチルヒポキサンチン、2, 2-ジメチルグアニン、3-メチルシトシン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メチルカルボニルメチルウラシル、5-メチルオキシウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸、2-チオシトシン、プリン、2, 6-ジアミノプリン、2-アミノプリン、イソグアニン、インドール、イミダゾール、キサンチン等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0044] 糖部分の修飾としては、例えば、リボースの2'位の修飾及び糖のその他の部分の修飾を挙げることができる。リボースの2'位の修飾としては、例えば、リボースの2'位の-OH基をOR、R、R'OR、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂、N₃、CN、F、Cl、Br、Iに置換する修飾を挙げることができる。ここで、Rはアルキル又はアリールを表す。R'はアルキレンを表す。

糖のその他の部分の修飾としては、例えば、リボース又はデオキシリボースの4'位のOをSに置換したもの、糖の2'位と4'位を架橋したもの、例えば、LNA (Locked Nucleic Acid) 又はENA (2'-O, 4'-C-Ethylene-bridged Nucleic Acids) などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0045] リン酸結合部分の修飾としては、例えば、ホスホジエステル結合をホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、アルキルホスホネート結合、ホスホロアミデート結合、ボラノフォスフェート結合 (Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) に置換する修飾を挙げることができる (例えば、特許再公表公報第2006/129594号及び第2006/038608号を参照)。

[0046] 本発明において、アルキルとしては、直鎖状または分枝鎖状の炭素数1～

6のアルキルが好ましい。具体的には、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、*tert*-ペンチル、*n*-ヘキシル、イソヘキシルが挙げられる。当該アルキルは置換されていてもよく、かかる置換基としては、例えば、ハロゲン、アルコキシ、シアノ、ニトロを挙げることができ、これらが1～3個置換されていてもよい。

本発明において、シクロアルキルとしては、炭素数5～12のシクロアルキルが好ましい。具体的には、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロデシル、シクロドデシルが挙げられる。

本発明において、ハロゲンとしては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素を挙げることができる。

アルコキシとしては、直鎖状または分枝鎖状の炭素数1～6のアルコキシ、例えば、メトキシ、エトキシ、*n*-プロポキシ、イソプロポキシ、*n*-ブトキシ、イソブトキシ、*sec*-ブトキシ、*tert*-ブトキシ、*n*-ペンチルオキシ、イソペンチルオキシ、*n*-ヘキシルオキシ、イソヘキシルオキシ等を挙げることができる。とりわけ、炭素数1～3のアルコキシが好ましい。

[0047] 本発明において、アリールとしては、炭素数6～10のアリールが好ましい。具体的には、例えば、フェニル、 α -ナフチル、 β -ナフチルを挙げることができる。とりわけフェニルが好ましい。当該アリールは置換されていてもよく、かかる置換基としては、例えば、アルキル、ハロゲン、アルコキシ、シアノ、ニトロを挙げることができ、これらが1～3個置換されていてもよい。

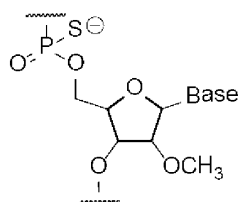
本発明において、アルキレンとしては、直鎖状または分枝鎖状の炭素数1～6のアルキレンが好ましい。具体的には、例えば、メチレン、エチレン、トリメチレン、テトラメチレン、ペンタメチレン、ヘキサメチレン、2-（エチル）トリメチレン、1-（メチル）テトラメチレンを挙げることができ

る。

本発明において、アシルとしては、直鎖状若しくは分枝鎖状のアルカノイル、又はアロイルを挙げることができる。アルカノイルとしては、例えば、ホルミル、アセチル、2-メチルアセチル、2,2-ジメチルアセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、ペンタノイル、2,2-ジメチルプロピオニル、ヘキサノイル等が挙げられる。アロイルとしては、例えば、ベンゾイル、トルオイル、ナフトイルを挙げることができる。かかるアロイルは置換可能な位置において置換されていてもよく、アルキルで置換されていてもよい。

[0048] 本発明のオリゴヌクレオチドは、好ましくは、リボースの2'位の-OH基がメトキシで置換され、リン酸結合部分がホスホロチオエート結合である、下記一般式で表される基を構成単位とする本発明のアンチセンスオリゴマーである。

[化2]

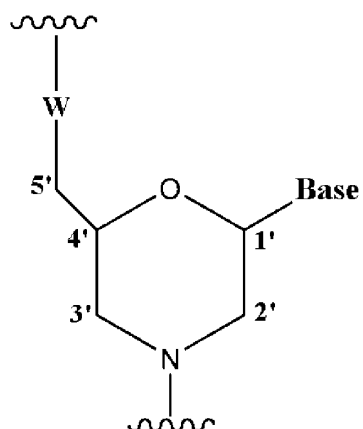


(式中、Baseは、核酸塩基を表す。)

[0049] 本発明のオリゴヌクレオチドは、各種自動合成装置（例えば、AKTA oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)）を用いて容易に合成することが可能であり、あるいは、第三者機関（例えば、Promega社、Takara社、又は日本バイオサービス社）等に委託して作製することもできる。

[0050] 本発明のモルホリノオリゴマーは、下記一般式で表される基を構成単位とする本発明のアンチセンスオリゴマーである。

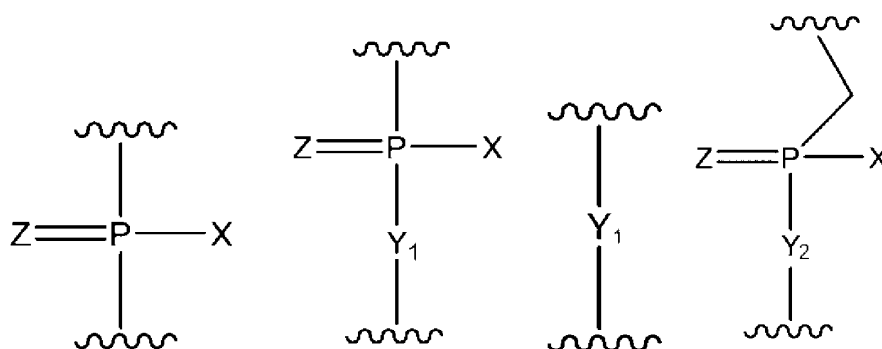
[化3]



(式中、Baseは、前記と同義であり；

Wは、以下のいずれかの式で表される基を表す。

[0051] [化4]



(式中、Xは、 $-\text{CH}_2\text{R}^1$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$ 、 $-\text{NR}^2\text{R}^3$ 又はFを表し；

R^1 は、H、アルキルを表し；

R^2 及び R^3 は、同一又は異なって、H、アルキル、シクロアルキル、又は、アリールを表し；

Y_1 は、O、S、 CH_2 又は NR^1 を表し；

Y_2 は、O、S又は NR^1 を表し；

Zは、O又はSを表す。）

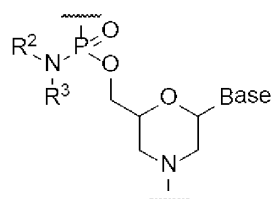
[0052] 本発明のモルホリノオリゴマーの合成に使用するモルホリノモノマー化合物の例としては、下記表に記載のモルホリノモノマー化合物（A）、モルホリノモノマー化合物（C）、モルホリノモノマー化合物（T）、及びモルホリノモノマー化合物（G）が挙げられるがこれらに限定されるものではない。

[0053] [表2]

モルホリノモノマー化合物 (A)	モルホリノモノマー化合物 (C)	モルホリノモノマー化合物 (T)	モルホリノモノマー化合物 (G)

[0054] モルホリノオリゴマーは、好ましくは、以下の式で表される基を構成単位とするオリゴマー（ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー（以下、「PMO」という））である。

[化5]



（式中、Base、 R^2 、 R^3 は、前記と同義である。）

本発明モルホリノオリゴマーは、かかるオリゴマーを構成する核酸塩基、

モルホリノ環部分、リン酸結合部分、3'末端及び／又は5'末端の全部又は一部が修飾されているものを含む。

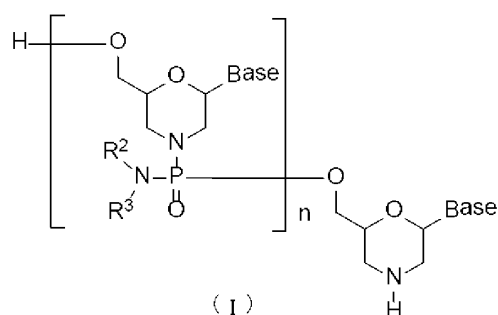
[0055] リン酸結合部分の修飾としては、例えば、ホスホロジアミデート結合、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、アルキルホスホネート結合、ホスホロアミデート結合、ボラノフォスフェート結合 (Enya et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) に置換する修飾を挙げることができる (例えば、特許再公表公報第2006/129594号及び第2006/038608号を参照)。

モルホリノオリゴマーは、例えば、国際公開第1991/009033号、又は国際公開第2009/064471号に従って製造することができる。特に、PMOは、国際公開第2009/064471号に記載の方法に従って製造するか、又は以下に示す方法に従って製造することができる。

[0056] [PMOの製法]

PMOの1つの態様として、例えば、次の一般式(Ⅰ)で表される化合物(以下、PMO(Ⅰ)という。)を挙げることができる。

[化6]



[式中、各Base、R²、R³は、前記と同義であり；

nは、1～99の範囲内にある任意の整数であり、好ましくは、19～29、19～28、21～29、21～28または24～28の範囲内にある任意の整数であり、より好ましくは、21～29、21～28または24～

28である。]

[0057] PMO (I) は、公知の方法に従い製造することができるが、例えば、下記工程の操作を実施することにより製造することができる。

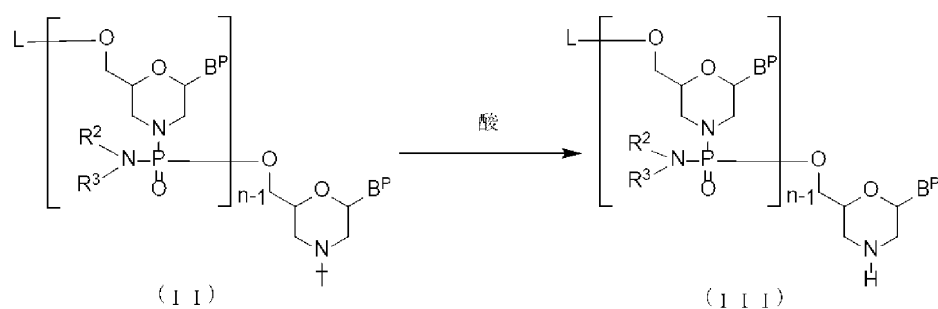
下記工程に使用されている化合物及び試薬は、PMOの製造に一般的に使用されているものであれば特に限定されない。

また、下記のすべての工程は、液相法又は固相法（マニュアル又は市販の固相自動合成機を用いる）で実施することができる。固相法でPMOを製造する場合、操作手順の簡便化及び合成の正確性の点から自動合成機を用いる方法が望ましい。

[0058] (1) 工程A：

次の一般式 (I I) で表される化合物（以下、化合物 (I I) という。）に酸を作用させることによって、次の一般式 (I I I) で表される化合物（以下、化合物 (I I I) という。）を製造する工程。

[化7]



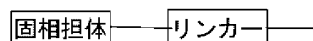
[式中、n、R²、R³は、前記と同義であり；

各B^Pは、独立して、保護されていてもよい核酸塩基を表し；

Tは、トリチル基、モノメトキシトリチル基、又はジメトキシトリチル基を表し；

Lは、水素、アシル、又は次の一般式 (I V) で表される基（以下、基 (I V) という。）を表す。]

[化8]



(I V)

[0059] B^Pに係る「核酸塩基」としては、B a s eと同じ「核酸塩基」を挙げることができる。但し、B^Pに係る核酸塩基のアミノ基又は水酸基は保護されていてもよい。

かかるアミノ基の保護基としては、核酸の保護基として使用されるものであれば特に制限されず、具体的には、例えば、ベンゾイル、4-メトキシベンゾイル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、フェニルアセチル、フェノキシアセチル、4-tert-ブチルフェノキシアセチル、4-イソプロピルフェノキシアセチル、(ジメチルアミノ)メチレンを挙げることができる。水酸基の保護基としては、例えば、2-シアノエチル、4-ニトロフェネチル、フェニルスルホニルエチル、メチルスルホニルエチル、トリメチルシリルエチル、置換可能な任意の位置で1～5個の電子吸引性基で置換されていてもよいフェニル、ジフェニルカルバモイル、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、メチルフェニルカルバモイル、1-ピロリジニルカルバモイル、モルホリノカルバモイル、4-(tert-ブチルカルボキシ)ベンジル、4-[(ジメチルアミノ)カルボキシ]ベンジル、4-(フェニルカルボキシ)ベンジルを挙げることができる(例えば、国際公開第2009/064471号公報参照)。

[0060] 「固相担体」としては、核酸の固相反応に使用しうる担体であれば特に制限されないが、例えば、(i)モルホリノ核酸誘導体の合成に使用しうる試薬(例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、テトラゾール、N-メチルイミダゾール、ピリジン、無水酢酸、ルチジン、トリフルオロ酢酸)にほとんど溶解せず、(ii)モルホリノ核酸誘導体の合成に使用しうる試薬に対して化学的に安定であり、(iii)化学修飾ができ、(iv)望ましいモ

ルホリノ核酸誘導体の装填ができ、(v) 処理中にかかる高压に耐える十分な強度をもち、(vi) 一定の粒径範囲と分布であるものが望ましい。具体的には、膨潤性ポリスチレン（例えば、アミノメチルポリスチレン樹脂 1%ジビニルベンゼン架橋（200～400メッシュ）（2.4～3.0mmol/g）（東京化成社製）、Aminomethylated Polystyrene Resin·HCl [ジビニルベンゼン1%, 100～200メッシュ]（ペプチド研究所社製））、非膨潤性ポリスチレン（例えば、Primer Support（GE Healthcare社製））、PEG鎖結合型ポリスチレン（例えば、NH₂-PEG resin（渡辺化学社製）、TentaGel resin）、定孔ガラス（controlled pore glass; CPG）（例えば、CPG社製）、オキサリル化一定孔ガラス（例えば、Alulra, Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527（1991）を参照）、TentaGel支持体ーアミノポリエチレングリコール誘導体化支持体（例えば、Wrightら, Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373（1993）を参照）、Porosーポリスチレン／ジビニルベンゼンのコポリマーを挙げることができる。

「リンカー」としては、通常核酸やモルホリノ核酸誘導体を連結するために使用される公知のものを用いることができるが、例えば、3-アミノプロピル、スクシニル、2, 2'-ジエタノールスルホニル、ロングチェーンアルキルアミノ（LCAA）を挙げることができる。

[0061] 本工程は、化合物(11)に酸を作用させることにより実施することができる。

[0062] 本工程に使用しうる「酸」としては、例えば、トリフルオロ酢酸、ジクロロ酢酸又はトリクロロ酢酸を挙げることができる。酸の使用量としては、例えば、化合物(11)1モルに対して0.1モル当量～1000モル当量の範囲内が適当であり、好ましくは1モル当量～100モル当量の範囲内である。

また、前記酸と一緒に、有機アミンを使用することができる。有機アミンとしては、特に限定されるものではないが、例えば、トリエチルアミンを挙げることができる。有機アミンの使用量は、例えば、酸 1 モルに対して、0.01 モル当量～10 モル当量の範囲内が適当であり、好ましくは、0.1 モル当量～2 モル当量の範囲内である。

本工程において酸と有機アミンとの塩又は混合物を使用する場合には、例えば、トリフルオロ酢酸とトリエチルアミンの塩又は混合物を挙げることができる。より具体的には、トリフルオロ酢酸 2 当量に対してトリエチルアミン 1 当量を混合したものを挙げることができる。

本工程に使用しうる酸は、0.1%～30%の範囲内の濃度になるように適当な溶媒で希釈して使用することもできる。溶媒としては、反応に関与しなければ特に限定されないが、例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、アルコール類（エタノール、イソプロパノール、トリフルオロエタノールなど）、水又はこれらの混合物を挙げることができる。

[0063] 上記反応における反応温度は、例えば、10℃～50℃の範囲内が好ましく、より好ましくは、20℃～40℃の範囲内であり、さらに好ましくは、25℃～35℃の範囲内である。

反応時間は、使用する酸の種類、反応温度によって異なるが、通常0.1分～24時間の範囲内が適当である。好ましくは、1分～5時間の範囲内である。

[0064] また、本工程が終了した後、必要に応じて、系中に存在する酸を中和するために塩基を添加することができる。「塩基」としては、特に限定されないが、例えば、ジイソプロピルエチルアミンが挙げられる。塩基は、0.1%（v/v）～30%（v/v）の範囲内の濃度になるように適当な溶媒で希釈して使用することもできる。

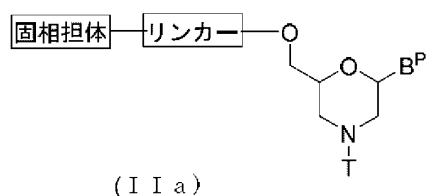
本工程に用いる溶媒としては、反応に関与しなければ特に限定されないが、ジクロロメタン、アセトニトリル、アルコール類（エタノール、イソプロパノール、トリフルオロエタノールなど）、水又はこれらの混合物を挙げる

ことができる。反応温度は、例えば、 10°C ～ 50°C の範囲内が好ましく、より好ましくは、 20°C ～ 40°C の範囲内であり、さらに好ましくは、 25°C ～ 35°C の範囲内である。

反応時間は、使用する塩基の種類、反応温度によって異なるが、通常0.1分～24時間の範囲内が適当であり、好ましくは、1分～5時間の範囲内である。

[0065] なお、化合物(II)において、 $n=1$ であって、Lが基(IV)である、次の一般式(IIa)で表される化合物(以下、化合物(IIa)という。)は、以下の方法に従って製造することができる。

[化9]

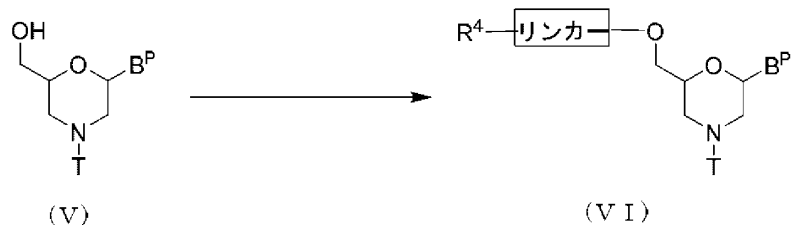


[式中、 B^P 、T、リンカー、固相担体は、前記と同義である。]

[0066] 工程1：

次の一般式(V)で表される化合物にアシル化剤を作用させることによって、次の一般式(VI)で表される化合物(以下、化合物(VI)という。)を製造する工程。

[化10]



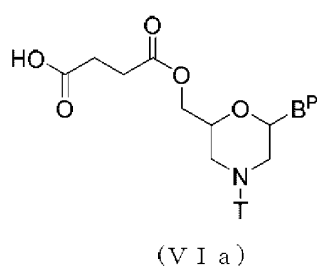
[式中、 B^P 、T、リンカーは、前記と同義であり；

R^4 は、水酸基、ハロゲン、カルボキシル基、又は、アミノを表す。]

[0067] 本工程は、化合物(V)を出発原料として、公知のリンカーの導入反応により実施することができる。

特に、次の一般式(V I a)で表される化合物は、化合物(V)と無水コハク酸とを用いてエステル化反応として知られた方法を実施することにより製造することができる。

[化11]

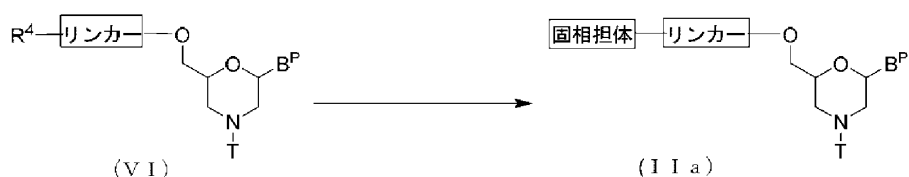


[式中、 B^p 、 T は、前記と同義である。]

[0068] 工程2：

化合物(V I)に縮合剤等を作用させることによって、固相担体と反応させ、化合物(I I a)を製造する工程。

[化12]



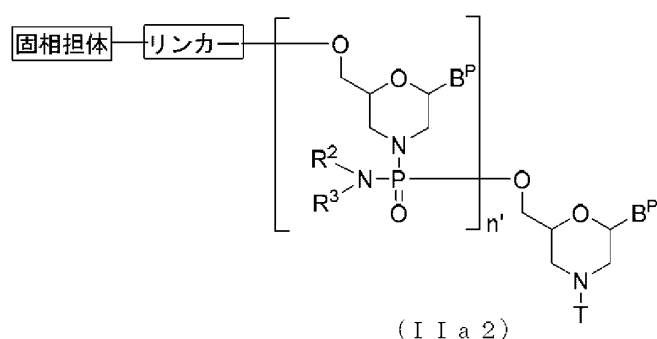
[式中、 B^p 、 R^4 、 T 、リンカー、固相担体は、前記と同義である。]

本工程は、化合物(V I)と固相担体とを用いて縮合反応として知られた方法により製造することができる。

化合物(I I)において、 $n = 1 \sim 99$ (特定の態様では n は、例えば、 $2 \sim 29$ 、 $2 \sim 28$ 、 $2 \sim 27$ 、 $2 \sim 26$ 、 $2 \sim 25$ 、 $2 \sim 24$ 、 $2 \sim 23$

、2～22、2～21または2～20であり、好ましくは19～29、19～28、21～29、21～28または24～28の範囲内にある任意の整数であり、より好ましくは、21～29、21～28または24～28である）であって、Lが基（IV）である、次の一般式（IIa2）で表される化合物は、化合物（IIa）を出発原料とし、本明細書に記載のPMOの製法にかかる工程A及び工程Bを所望の回数繰り返し実施することにより製造することができる。

[化13]

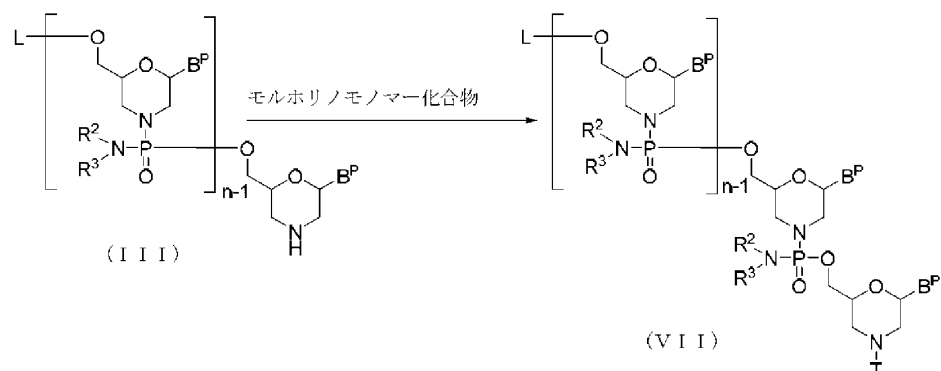


[式中、B^p、n、R²、R³、T、リンカー、固相担体は、前記と同義である。]

[0069] (2) 工程B：

化合物（III）に塩基存在下にホルホリノモノマー化合物を作用させることによって、次の一般式（VII）で表される化合物（以下、化合物（VII）という。）を製造する工程。

[化14]

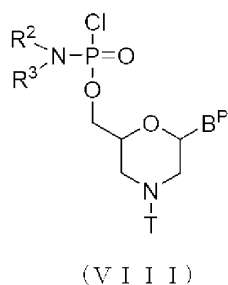


[式中、各 B^P、L、n、R²、R³、T は、前記と同義である。]

[0070] 本工程は、化合物 (III) に塩基存在下にモルホリノモノマー化合物を作用させることにより実施することができる。

[0071] モルホリノモノマー化合物としては、例えば、次の一般式 (VII) で表される化合物を挙げることができる。

[化15]



[式中、B^P、R²、R³、T は前記と同義である。]

本工程に使用しうる「塩基」としては、例えば、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、又は、N-エチルモルホリンを挙げることができる。塩基の使用量としては、例えば、化合物 (III) 1 モルに対して、1 モル当量～1000 モル当量の範囲内が適当であり、好ましくは10 モル当

量～１００モル当量の範囲内である。

本工程に使用しうるモルホリノモノマー化合物および塩基は、０．１％～３０％の濃度になるように適当な溶媒で希釈して使用することもできる。溶媒としては、反応に関与しなければ特に限定されないが、例えば、*N*，*N*－ジメチルイミダゾリドン、*N*－メチルピペリドン、DMF、ジクロロメタン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、又はこれらの混合物を挙げることができる。

[0072] 反応温度は、例えば、０℃～１００℃の範囲内が好ましく、より好ましくは、１０℃～５０℃の範囲内である。

反応時間は、使用する塩基の種類、反応温度によって異なるが、通常１分～４８時間の範囲内が適当であり、好ましくは、３０分～２４時間の範囲内である。

[0073] さらに本工程の終了後、必要に応じて、アシル化剤を添加することができる。「アシル化剤」としては、例えば、無水酢酸、酢酸クロライド、フェノキシ酢酸無水物を挙げることができる。アシル化剤は、例えば、０．１％～３０％の範囲内の濃度になるように適当な溶媒で希釈して使用することもできる。溶媒としては、反応に関与しなければ特に限定されないが、例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、アルコール類（エタノール、イソプロパノール、トリフルオロエタノールなど）、水又はこれらの混合物を挙げることができる。

また、必要であれば、アシル化剤と一緒に、例えば、ピリジン、ルチジン、コリジン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、*N*－エチルモルホリン等の塩基を使用することができる。アシル化剤の使用量としては、０．１モル当量～１００００モル当量の範囲内が好ましく、１モル当量～１０００モル当量の範囲内がより好ましい。塩基の使用量としては、例えば、アシル化剤１モルに対して、０．１モル当量～１００モル当量の範囲内が適当であり、好ましくは１モル当量～１０モル当量の範囲内である。

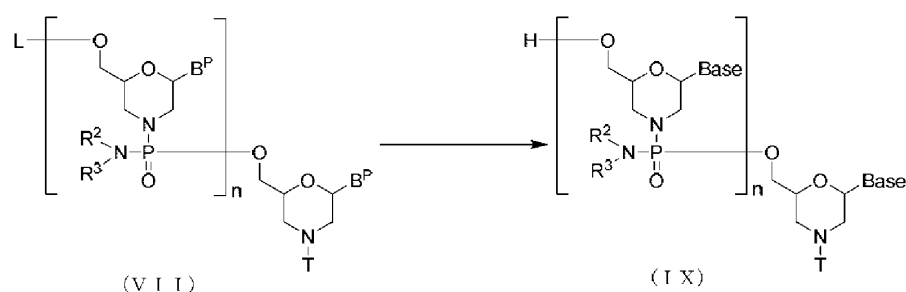
本反応の反応温度は、１０℃～５０℃の範囲内が好ましく、より好ましく

は、 10°C ～ 50°C の範囲内が好ましく、より好ましくは、 20°C ～ 40°C の範囲内であり、さらに好ましくは、 25°C ～ 35°C の範囲内である。反応時間は、例えば、使用するアシル化剤の種類、反応温度によって異なるが、通常0.1分～24時間の範囲内が適当であり、好ましくは、1分から5時間の範囲内である。

[0074] (3) 工程C：

工程Bにおいて製造される化合物(VII)において、脱保護剤を用いて保護基を脱離し、一般式(IX)で表される化合物を製造する工程。

[化16]



[式中、Base、 B^{P} 、L、n、 R^2 、 R^3 、Tは、前記と同義である。]

[0075] 本工程は、化合物(VII)に脱保護剤を作用させることにより実施することができる。

[0076] 「脱保護剤」としては、例えば、濃アンモニア水、メチルアミンを挙げることができる。本工程に使用しうる「脱保護剤」は、例えば、水、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、DMF、N,N-ジメチルイミダゾリドン、N-メチルピペリドン又はこれらの混合溶媒で希釈して使用することもできる。中でも、エタノールが好ましい。脱保護剤の使用量としては、例えば、化合物(VII)1モルに対して、例えば、1モル当量～10000モル当量の範囲内が適当であり、好ましくは10モル当量～1000モル当量の範囲内である。

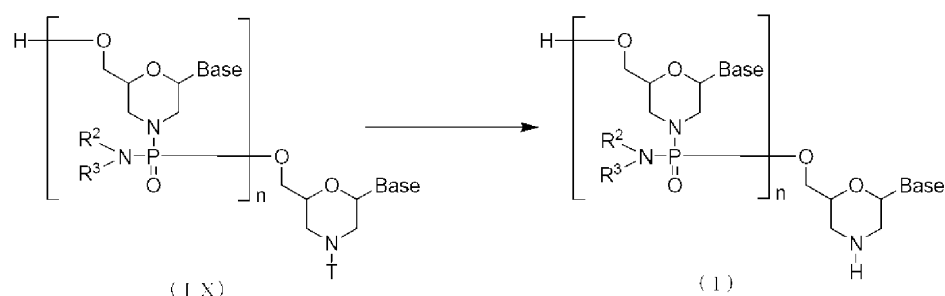
[0077] 反応温度は、例えば、 15°C ～ 75°C の範囲内が適当であり、好ましくは

40℃～70℃の範囲内であり、より好ましくは50℃～60℃の範囲内である。脱保護反応時間は、化合物（V11）の種類、反応温度等によって異なるが、10分～30時間の範囲内が適当であり、好ましくは30分～24時間の範囲内であり、より好ましくは5時間～20時間の範囲内である。

[0078] (4) 工程D:

工程Cにおいて製造される化合物（IX）に酸を作用させることによって、PMO（I）を製造する工程。

[化17]



[式中、Base、n、R²、R³、Tは、前記と同義である。]

[0079] 本工程は、化合物（Ⅰ×）に酸を加えることによって実施することができる。

[0080] 本工程において使用しうる「酸」としては、例えば、トリクロロ酢酸、ジクロロ酢酸、酢酸、リン酸及び塩酸等を挙げることができる。酸の使用量としては、例えば、溶液のpHが0.1～4.0の範囲内になるように使用するのが適当であり、より好ましくは1.0～3.0の範囲内になるように使用する。溶媒としては、反応に関与しなければ特に限定されないが、例えば、アセトニトリル、水、又はこれらの混合溶媒を挙げることができる。

[0081] 反応温度は、10℃～50℃の範囲内が好ましく、より好ましくは、20℃～40℃の範囲内であり、さらに好ましくは、25℃～35℃の範囲内である。脱保護反応時間は、化合物（IX）の種類、反応温度等によって異なるが、0.1分～5時間の範囲内が適当であり、好ましくは1分～1時間の

範囲内であり、より好ましくは1分～30分の範囲内である。

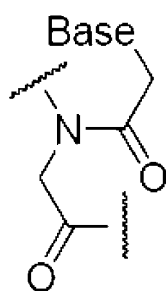
[0082] PMO (I) は、本工程で得られた反応混合物から通常分離精製手段、例えば、抽出、濃縮、中和、濾過、遠心分離、再結晶、 C_8 から C_{18} の逆相カラムクロマトグラフィー、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、透析、限界ろ過などの手段を単独若しくは組み合わせて用いることにより得ることができ、所望の PMO (I) を単離精製することができる（例えば、国際公開第1991/09033号を参照）。

逆相クロマトグラフィーを用いて PMO (I) を精製する場合には、溶出溶媒として、例えば20 mMのトリエチルアミン／酢酸緩衝液とアセトニトリルの混合溶液を使用することができる。

また、イオン交換クロマトグラフィーを用いて PMO (I) を精製する場合には、例えば、1 Mの食塩水と10 mMの水酸化ナトリウム水溶液の混合溶液を使用することができる。

[0083] ペプチド核酸は、下記一般式で表される基を構成単位とする本発明のアンチセンスオリゴマーである。

[化18]



(式中、Base は、前記と同義である。)

[0084] ペプチド核酸は、例えば、以下の文献に従って製造することができる。

1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Science, 254, 1497 (1991)

2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *Jacs.*, 114, 1895 (1992)

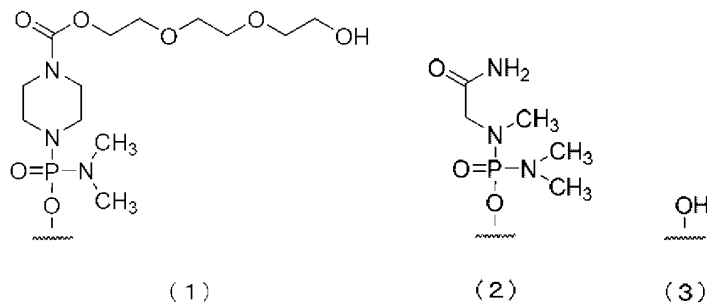
3) K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.*, 59, 5767 (1994)

4) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, *J. Pept. Sci.*, 1, 175 (1995)

5) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, *J. Pept. Res.*, 49, 80 (1997)

[0085] また、本発明のアンチセンスオリゴマーは、5'末端が、下記化学式(1)～(3)のいずれかの基であってもよい。好ましくは(3)－OHである。

[化19]



以下、上記(1)、(2)及び(3)で示される基を、それぞれ「基(1)」、「基(2)」及び「基(3)」と呼ぶ。

[0086] 本発明のアンチセンスオリゴマーは、リン酸結合部分のリン原子が不斉中心となるため、リン原子の立体化学が光学的に純粋な化合物を含むものであってもよい。当業者であれば純粋な光学活性体を異性体の混合物から得ることができる(国際公開第2017/024264号)。また、本発明のアン

チセンスオリゴマーは、純粋な光学活性体として合成したものであってもよい。当業者であれば合成反応を制御して純粋な光学活性体を得ることができる（公表特許公報第2018-537952号）。

[0087] 2. ペプチド結合型アンチセンスオリゴマー

本発明のアンチセンスオリゴマーは、有効性の向上を目的とした機能性ペプチド（例えば、標的細胞への輸送効率の向上を目的とした膜透過性ペプチド）との複合体を形成しているものであってもよい（国際公開第2008/036127号、国際公開第2009/005793号、国際公開第2012/150960号、国際公開第2016/187425号、国際公開第2018/118662号、国際公開第2018/118599号、国際公開第2018/118627号、J. D. Ramsey, N. H. Flynn, *Pharmacology & Therapeutics* 154, 78-86 (2015)、M. K. Tsoumpra et al., *EBioMedicine*, 45, 630-645 (2019)）。結合部位は特に限定されないが、アンチセンスオリゴマーの5' 端または3' 端と機能性ペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端が結合していることが好ましい。

また、別の態様として、本発明のアンチセンスオリゴマーと機能性ペプチドは、リンカーを介して複合体を形成していてもよい。リンカーは特に限定されないが、アンチセンスオリゴマーの5' 端または3' 端とリンカーの一方の端が結合し、機能性ペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端とリンカーのもう一方の端が結合していることが好ましい。また、機能性ペプチドとリンカーの間には、付加的なアミノ酸が存在していてもよい。

[0088] 3. 医薬組成物

本発明のアンチセンスオリゴマーは、従来技術に係るアンチセンスオリゴマーと比較してその長さが短い場合であっても、エクソン51のスキッピングを高効率に誘導することができる。また、本発明のアンチセンスオリゴマーは、エクソン51のスキッピングを高効率に誘導する活性を維持しつつ、かつ優れた溶解性を有する。さらに、本発明のアンチセンスオリゴマーは、エクソン51のスキッピングを高効率に誘導する活性を維持しつつ、かつ優

れた溶解性および安全性を有する。したがって、ジストロフィン遺伝子にエクソン51のスキッピングの対象となる変異（例えば、フレームシフト突然変異、エクソン51の中でのミスセンス突然変異／ナンセンス突然変異など）を有するDMD患者であれば、本発明のアンチセンスオリゴマーを投与することによって、高効率に筋ジストロフィーの症状を緩和することができる予測される。例えば、少なくともエクソン51近傍のエクソンを欠失した所定の変異ジストロフィン遺伝子を有するDMD患者に本発明のアンチセンスオリゴマーを投与することによって、高効率に筋ジストロフィーの症状を緩和することができると予測される。なお、所定の変異ジストロフィン遺伝子とは、少なくともエクソン51近傍のエクソンを欠失してフレームシフト突然変異を有するとともにエクソン51を省いた場合（スキップした場合）にアミノ酸の読み取り枠が修正されるジストロフィン遺伝子を意味する。DMD患者としては、例えば、エクソン13-50、29-50、40-50、43-50、45-50、47-50、48-50、49-50、50、52、52-63等の欠失を有することによるフレームシフト突然変異を有するDMD患者が挙げられる。

より具体的に述べると、本発明のアンチセンスオリゴマーを含む医薬組成物をDMD患者（エクソン51スキッピングで*in-frame*化する変異を有する患者、例えば、エクソン13-50欠失患者、エクソン29-50欠失患者、エクソン40-50欠失患者、エクソン43-50欠失患者、エクソン45-50欠失患者、エクソン47-50欠失患者、エクソン48-50欠失患者、エクソン49-50欠失患者、エクソン50欠失患者、エクソン52欠失患者、エクソン52-63欠失患者等）に投与することにより、高効率に筋ジストロフィーの症状を緩和することができると予測される。例えば、本発明のアンチセンスオリゴマーを含む医薬組成物を用いる場合、従来技術に係るオリゴマーと比べて少量の投与量でも同程度の治療効果を得られるため、副作用を軽減することができ、かつ経済的である。

また、本発明のアンチセンスオリゴマーは、エクソン51のスキッピング

を高効率に誘導する活性を維持しつつ、かつ優れた溶解性を有するため、医薬組成物の調製において有用である。さらに、本発明のアンチセンスオリゴマーは、エクソン 51 のスキッピングを高効率に誘導する活性を維持しつつ、かつ優れた溶解性および安全性を有するため、医薬組成物として有用である。

そこで、別の実施態様として、本発明のアンチセンスオリゴマー、その医薬的に許容可能な塩又は水和物を有効成分とする、筋ジストロフィー治療用医薬組成物（以下、「本発明の組成物」という）を提供する。

また、本発明は、本発明のアンチセンスオリゴマーを、DMD 患者に投与する工程を含む、筋ジストロフィーの治療方法を提供する。

当該治療方法において、本発明のアンチセンスオリゴマーは、前記筋ジストロフィー治療用医薬組成物として投与してもよい。

さらに、本発明は、筋ジストロフィー治療用医薬組成物の製造における本発明のアンチセンスオリゴマーの使用、及び筋ジストロフィー治療に使用するための本発明のアンチセンスオリゴマーを提供する。

[0089] 本発明の組成物に含まれる本発明のアンチセンスオリゴマーの医薬的に許容可能な塩の例としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩のようなアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩、コバルト塩などの金属塩；アンモニウム塩；*t*-オクチルアミン塩、ジベンジルアミン塩、モルホリン塩、グルコサミン塩、フェニルグリシンアルキルエステル塩、エチレンジアミン塩、*N*-メチルグルカミン塩、グアニジン塩、ジエチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、*N*, *N'*-ジベンジルエチレンジアミン塩、クロロプロカイン塩、プロカイン塩、ジエタノールアミン塩、*N*-ベンジルーフェネチルアミン塩、ピペラジン塩、テトラメチルアンモニウム塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩のような有機アミン塩；弗化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、沃化水素酸塩のようなハロゲン化水素酸塩；硝酸塩、過塩素酸塩、硫酸塩、リン酸塩などの無機酸

塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩のような低級アルカンスルホン酸塩；ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩のようなアリースルホン酸塩；酢酸塩、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩などの有機酸塩；グリシン塩、リジン塩、アルギニン塩、オルニチン塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩のようなアミノ酸塩などが挙げられる。これらの塩は、公知の方法で製造することができる。あるいは、本発明の組成物に含まれる本発明のアンチセンスオリゴマーは、その水和物の形態にあってもよい。

[0090] 本発明の組成物の投与形態は、医薬的に許容可能な投与形態であれば特に制限されず、治療方法に応じて選択することができるが、筋組織への送達容易性の観点から、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、経口投与、組織内投与、経皮投与等が好ましい。また、本発明の組成物を取り得る剤型としては、特に制限されないが、例えば、各種の注射剤、経口剤、点滴剤、吸入剤、軟膏剤、ローション剤等を挙げることができる。

[0091] 本発明のアンチセンスオリゴマーを筋ジストロフィー患者に投与する場合、本発明の組成物は、該オリゴマーの筋組織への送達を促進する担体を含むことができる。このような担体は、医薬的に許容可能なものであれば特に制限されず、その例として、カチオン性リポソーム、カチオン性ポリマー等のカチオン性担体、またはウイルスエンベロープを利用した担体を挙げることができる。カチオン性リポソームとしては、例えば、2-0-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1, 3-0-ジオレオイルグリセロールとリン脂質とを必須構成成分として形成されるリポソーム（以下、「リポソームA」という）、オリゴフェクトアミン（登録商標）（Invitrogen社製）、リポフェクチン（登録商標）（Invitrogen社製）、リポフェクトアミン（登録商標）（Invitrogen社製）、Lipofectamine 2000（登録商標）（Invitrogen社製）、DMRIE-C（登録商標）（Invitrogen社製）、GeneSi

lencer (登録商標) (Gene Therapy Systems社製)、TransMessenger (登録商標) (QIAGEN社製)、TransIT TKO (登録商標) (Mirus社製)、Nucleofector II (Lonza) を挙げることができる。それらの中で、リポソームAが好ましい。カチオン性ポリマーとしては、例えば、JetSi (登録商標) (Qbiogene社製)、Jet-PEI (登録商標) (ポリエチレンイミン、Qbiogene社製) を挙げることができる。ウイルスエンベロープを利用した担体としては、例えば、GenomeOne (登録商標) (HVJ-Eリポソーム、石原産業社製) を挙げることができる。あるいは、特許2924179号に記載の医薬デバイス、特許再公表公報第2006/129594号及び特許再公表公報第2008/096690号に記載のカチオン性担体を用いることもできる。

詳細については米国特許第4,235,871号、同第4,737,323号、国際公開第96/14057号、“New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990) pages 33-104”等を参照することができる。

[0092] 本発明の組成物に含まれる本発明のアンチセンスオリゴマーの濃度は、担体の種類等によって異なるが、一態様において、 $0.1 \text{ nM} \sim 100 \text{ } \mu\text{M}$ の範囲内が適当であり、 $100 \text{ nM} \sim 10 \text{ } \mu\text{M}$ の範囲内が好ましい。また、本発明の組成物に含まれる本発明のアンチセンスオリゴマーと担体との重量比(担体/本発明のアンチセンスオリゴマー)は、該オリゴマーの性質及び該担体の種類等によって異なるが、 $0.1 \sim 100$ の範囲内が適当であり、 $0.1 \sim 10$ の範囲内が好ましい。

[0093] 本発明の組成物は、水溶液の形態であってもよい。その場合、本発明の組成物は、本発明のアンチセンスオリゴマーを、 $2.5 \sim 500 \text{ mg/mL}$ 、 $5 \sim 450 \text{ mg/mL}$ 、 $10 \sim 400 \text{ mg/mL}$ 、 $15 \sim 350 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 300 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 250 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 200 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 150 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 100 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 50 \text{ mg/mL}$

／mL、20～40mg／mL、20～30mg／mL、23～27mg／mL、24～26mg／mL、又は25mg／mLの濃度で含んでもよい。または、本発明の組成物は、本発明のアンチセンスオリゴマーを、10～100mg／mL、15～95mg／mL、20～80mg／mL、25～75mg／mL、30～70mg／mL、35～65mg／mL、40～60mg／mL、45～55mg／mL、47～53mg／mL、48～52mg／mL、49～51mg／mL、又は50mg／mLの濃度で含んでもよい。

[0094] 本発明の組成物は、乾燥形態であってもよい。その場合、水溶液形態の本発明の組成物を調製するために、例えば125mg又は250mgの乾燥形態の本発明のアンチセンスオリゴマーを含む乾燥形態の本発明の組成物を、0.5mL～100mLの水と混合して（1.25mg／mL～250mg／mL又は2.5mg／mL～500mg／mLの本発明のアンチセンスオリゴマー濃度に相当する）、好ましくは1mL～50mLの水と混合して（2.5mg／mL～125mg／mL又は5mg／mL～250mg／mLの本発明のアンチセンスオリゴマー濃度に相当する）、より好ましくは5mL～10mLの水と混合して（12.5mg／mL～25mg／mL又は25mg／mL～50mg／mLの本発明のアンチセンスオリゴマー濃度に相当する）用いてもよい。

[0095] 本発明の組成物には、本発明のアンチセンスオリゴマーと上述した担体以外に、任意に医薬的に許容可能な添加剤を配合することができる。かかる添加剤として、例えば、乳化補助剤（例えば、炭素数6～22の脂肪酸やその医薬的に許容可能な塩、アルブミン、デキストラン）、安定化剤（例えば、コレステロール、ホスファチジン酸、スクロース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール）、等張化剤（例えば、塩化ナトリウム、グルコース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール）、pH調整剤（例えば、塩酸、硫酸、リン酸、酢酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、トリエタノールアミン）を挙げる

ことができる。これらを一種又は二種以上使用することができる。本発明の組成物中の当該添加剤の含有量は、90重量%以下が適当であり、70重量%以下が好ましく、50重量%以下がより好ましい。

[0096] 本発明の組成物は、担体の分散液に本発明のアンチセンスオリゴマーを加え、適当に攪拌することにより調製することができる。また、添加剤は、本発明のアンチセンスオリゴマーの添加前でも添加後でも適当な工程で添加することができる。本発明の組成物が水溶液の形態である場合、本発明のアンチセンスオリゴマーを添加する際に用い得る水性溶媒としては、医薬的に許容可能なものであれば特に制限されず、例えば、注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水等の電解質液、ブドウ糖液、マルトース液等の糖液を挙げることができる。また、かかる場合のpH及び温度等の条件は、当業者が適宜選択することができる。

[0097] 本発明の組成物は、例えば、液剤やその凍結乾燥製剤とすることができる。本発明の組成物の乾燥形態の一態様として、当該凍結乾燥製剤は、常法により、液剤の形態を有している本発明の組成物を凍結乾燥処理することにより調製することができる。例えば、液剤の形態を有している本発明の組成物を適当な滅菌を行った後、所定量をバイアル瓶に分注し、約-40~-20℃の条件で予備凍結を2時間程度行い、約0~10℃で減圧下に一次乾燥を行い、次いで、約15~25℃で減圧下に二次乾燥して凍結乾燥することができる。そして、一般的にはバイアル内部を窒素ガスで置換し、打栓して本発明の組成物の凍結乾燥製剤を得ることができる。

[0098] 本発明の組成物の凍結乾燥製剤は、一般には任意の適当な溶液（再溶解液）の添加によって再溶解し使用することができる。このような再溶解液としては、注射用水、生理食塩水、その他一般輸液を挙げることができる。この再溶解液の液量は、用途等によって異なり特に制限されないが、凍結乾燥前の液量の0.5~2倍量、又は500mL以下が適当である。

[0099] 本発明の組成物を投与する際の用量としては、含有される本発明のアンチセンスオリゴマーの種類、剤形、年齢や体重等の患者の状態、投与経路、疾

患の性質と程度を考慮した上で調製することが望ましいが、成人に対して本発明のアンチセンスオリゴマーの量として、1日当たり0.1mg～10g／ヒトの範囲内が、好ましくは1mg～1g／ヒトの範囲内が一般的である。この数値は標的とする疾患の種類、投与形態、標的分子によっても異なる場合がある。従って、場合によってはこれ以下でも十分であるし、また逆にこれ以上の用量を必要とするときもある。また1日1回から数回の投与又は1日から数日間の間隔で投与することができる。

[0100] 本発明の組成物の別の態様として、本発明のオリゴヌクレオチドを発現し得るベクターと上述した担体とを含む医薬組成物を挙げることができる。かかる発現ベクターは、複数の本発明のオリゴヌクレオチドを発現し得るものであってもよい。当該組成物には、本発明のオリゴマーを含有する本発明の組成物と同様に、医薬的に許容可能な添加剤を添加することができる。当該組成物中に含まれる発現ベクターの濃度は、担体の種類等によって異なるが、一態様において、0.1nM～100μMの範囲内が適当であり、100nM～10μMの範囲内が好ましい。当該組成物中に含まれる発現ベクターと担体との重量比（担体／発現ベクター）は、発現ベクターの性質、担体の種類等によって異なるが、0.1～100の範囲内が適当であり、0.1～10の範囲内が好ましい。また、当該組成物中に含まれる担体の含有量は、本発明のアンチセンスオリゴマーを含有する本発明の組成物の場合と同様であり、その調製方法等に関しても、本発明の組成物の場合と同様である。

[0101] 以下に、実施例及び試験例を掲げて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明は実施例に示される範囲に限定されるものではない。

実施例

[0102] [実施例1：アンチセンスオリゴマーの合成]

国際公開第2015／137409号に記載の方法に従い、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51および／またはその5'側隣接イントロンであるイントロン50の一部の塩基配列を標的とする、表1に示すアンチセンス

オリゴマー（PMO No. 1～93（配列番号1～93））を合成した。表中には、各アンチセンスオリゴマーの分子量の理論値およびESI-TOF-MSによる実測値も示す。

表1中において、例えば「H51_67-81_131-142」は、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン51の5'末端の塩基を1番目の塩基とし、3'側に続く塩基に順番に番号を付した場合に、アンチセンスオリゴマーが67番目～81番目の塩基の配列および131番目～142番目の塩基の配列を標的とするものであることを示す。なお、標的塩基配列中の-1番目以前の塩基の配列は、イントロン50中の塩基配列である。ヒトの野生型ジストロフィン遺伝子のエクソン51の配列とイントロン50の3'端付近の配列とを含む塩基配列を配列番号128に示す。

[表3-1]

表1 合成したアンチセンスオリゴマー (PMO No.1 ~93)

PMO No.	標的塩基配列	全長	PMO の塩基配列	分子量		配列番号
				理論値	実測値	
1	H51_67-81_131-142	27	TCGGTAAGTTCTAAGATGGCATTCTA	8977.10	8977.68	1
2	H51_68-81_131-142	26	TCGGTAAGTTCTAAGATGGCATTCT	8637.98	8637.42	2
3	H51_74-89_132-142	27	TCGGTAAGTTCCATCAAGGAAGATGGC	9021.13	9021.40	3
4	H51_73-89_132-141	27	CGGTAAGTTCCATCAAGGAAGATGGCA	9030.14	9030.55	4
5	H51_69-81_128-142	28	TCGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATTTC	9308.21	9308.75	5
6	H51_66-79_131-142	26	TCGGTAAGTTCTGATGGCATTCTAG	8653.98	8653.47	6
7	H51_67-79_134-146	26	CCAGTCGGTAAGTGATGGCATTCTA	8647.99	8647.86	7
8	H51_68-80_130-142	26	TCGGTAAGTTCTGAGATGGCATTCT	8653.98	8654.05	8
9	H51_70-81_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTAAGATGGCATT	8677.99	8677.82	9
10	H51_70-81_128-141	26	CGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATT	8662.99	8663.07	10
11	H51_68-80_131-142	25	TCGGTAAGTTCTAGATGGCATTCT	8298.86	8298.84	11
12	H51_67-78_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTATGGCATTCTA	8628.97	8628.97	12
13	H51_67-79_130-142	26	TCGGTAAGTTCTGGATGGCATTCTA	8653.98	8653.04	13
14	H51_68-79_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTGATGGCATTCT	8644.97	8644.45	14
15	H51_68-79_130-142	25	TCGGTAAGTTCTGGATGGCATTCT	8314.86	8315.29	15
16	H51_69-80_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTAGATGGCATTTC	8653.98	8653.51	16
17	H51_70-81_130-142	25	TCGGTAAGTTCTGAAGATGGCATT	8347.88	8348.16	17
18	H51_69-80_131-143	25	GTCGGTAAGTTCTAGATGGCATTTC	8323.87	8324.63	18
19	H51_69-79_131-142	23	TCGGTAAGTTCTGATGGCATTTC	7629.63	7629.47	19
20	H51_68-80_130-141	25	CGGTAAGTTCTGAGATGGCATTCT	8323.87	8323.29	20
21	H51_69-80_130-142	25	TCGGTAAGTTCTGAGATGGCATTTC	8323.87	8323.51	21
22	H51_72-82_130-142	24	TCGGTAAGTTCTGGAAGATGGCAT	8042.78	8042.42	22
23	H51_69-80_129-141	25	CGGTAAGTTCTGTAGATGGCATTTC	8323.87	8324.17	23
24	H51_70-80_130-141	23	CGGTAAGTTCTGAGATGGCATT	7678.65	7678.31	24
25	H51_69-79_130-141	23	CGGTAAGTTCTGGATGGCATTTC	7654.64	7654.67	25
26	H51_68-78_130-141	23	CGGTAAGTTCTGATGGCATTCT	7629.63	7629.34	26
27	H51_68-78_129-141	24	CGGTAAGTTCTGTATGGCATTCT	7959.74	7959.98	27
28	H51_69-79_131-141	22	CGGTAAGTTCTGATGGCATTTC	7299.52	7299.75	28
29	H51_68-78_132-145	25	CAGTCGGTAAGTTTCATGGCATTCT	8283.86	8283.22	29
30	H51_73-82_127-141	25	CGGTAAGTTCTGTCCGAAGATGGCA	8342.89	8342.97	30

[表3-2]

31	H51_68-79_129-141	25	CGGTAAGTTCTGTGATGGCATTCT	8314.86	8314.76	31
32	H51_68-78_128-141	25	CGGTAAGTTCTGTGATGGCATTCT	8274.85	8274.92	32
33	H51_77-89_132-145	27	CAGTCGGTAAGTTCCATCAAGGAAGAT	9005.13	9005.19	33
34	H51_74-88_131-142	27	TCGGTAAGTTCTATCAAGGAAGATGGC	9036.13	9035.95	34
35	H51_69-82_133-145	27	CAGTCGGTAAGTTGAAGATGGCATTTC	9027.12	9026.95	35
36	H51_77-90_137-150	28	AAAGCCAGTCGGTAACATCAAGGAAGAT	9362.27	9362.13	36
37	H51_74-88_131-145	30	CAGTCGGTAAGTTCTATCAAGGAAGATGGC	10045.48	10045.48	37
38	H51_77-91_134-148	30	AGCCAGTCGGTAAGTAACATCAAGGAAGAT	10047.50	10047.18	38
39	H51_77-91_139-150	27	AAAGCCAGTCGGAACATCAAGGAAGAT	9032.16	9032.47	39
40	H51_69-82_132-145	28	CAGTCGGTAAGTTCCAAGATGGCATTTC	9342.23	9342.41	40
41	H51_77-89_137-150	27	AAAGCCAGTCGGTACATCAAGGAAGAT	9023.15	9023.88	41
42	H51_70-81_128-142	27	TCGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATT	8993.10	8993.92	42
43	H51_68-81_134-146	27	CCAGTCGGTAAGTAAGATGGCATTCT	8987.11	8987.53	43
44	H51_77-88_128-142	27	TCGGTAAGTTCTGTGATCAAGGAAGAT	9011.12	9011.04	44
45	H51_72-86-131-142	27	TCGGTAAGTTCTCAAGGAAGATGGCAT	9036.13	9036.50	45
46	H51_73-87_131-143	28	GTCGGTAAGTTCTTCAAGGAAGATGGCA	9391.25	9391.64	46
47	H51_73-88_131-142	28	TCGGTAAGTTCTATCAAGGAAGATGGCA	9375.25	9375.16	47
48	H51_78-90_132-145	27	CAGTCGGTAAGTTCACATCAAGGAAGA	9014.14	9014.43	48
49	H51_77-92_131-141	27	CGGTAAGTTCTCAACATCAAGGAAGAT	8989.13	8988.67	49
50	H51_77-89_131-143	26	GTCGGTAAGTTCTCATCAAGGAAGAT	8681.01	8680.23	50
51	H51_77-91_135-146	27	CCAGTCGGTAAGAACATCAAGGAAGAT	9023.15	9022.73	51
52	H51_77-91_137-149	28	AAGCCAGTCGGTAAACATCAAGGAAGAT	9362.27	9362.60	52
53	H51_76-89_130-142	27	TCGGTAAGTTCTGCATCAAGGAAGATG	9036.13	9036.49	53
54	H51_71-85_131-142	27	TCGGTAAGTTCTAAGGAAGATGGCATT	9051.13	9051.24	54
55	H51_71-87_131-142	29	TCGGTAAGTTCTTCAAGGAAGATGGCATT	9696.35	9696.96	55
56	H51_74-89_141-152	28	AGAAAGCCAGTCCATCAAGGAAGATGGC	9363.26	9363.78	56
57	H51_77-91_132-144	28	AGTCGGTAAGTTCAACATCAAGGAAGAT	9368.26	9368.63	57
58	H51_77-91_133-146	29	CCAGTCGGTAAGTTAACATCAAGGAAGAT	9683.37	9683.05	58
59	H51_77-91_131-144	29	AGTCGGTAAGTTCTAACATCAAGGAAGAT	9698.37	9698.22	59
60	H51_77-91_134-146	28	CCAGTCGGTAAGTAACATCAAGGAAGAT	9353.26	9353.46	60
61	H51_74-89_131-142	28	TCGGTAAGTTCTCATCAAGGAAGATGGC	9351.24	9351.27	61
62	H51_77-91_136-148	28	AGCCAGTCGGTAAACATCAAGGAAGAT	9362.27	9362.95	62
63	H51_-2-12_127-142	30	TCGGTAAGTTCTGTCTCTGAGTAGGAGCT	9994.43	9995.15	63
64	H51_128-141_6-18	27	TAACAGTCTGAGTCGGTAAGTTCTGTC	8978.10	8978.67	64
65	H51_8-20_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTGAGTAACAGTCTGA	8987.11	8987.52	65

[表3-3]

66	H51_4-16_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTCACAGTCTGAGTAG	9003.11	9003.22	66
67	H51_6-17_127-141	27	CGGTAAGTTCTGTCCAACAGTCTGAGT	8963.09	8963.28	67
68	H51_5-15_128-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCCAGTCTGAGTA	8638.98	8638.76	68
69	H51_5-16_129-142	26	TCGGTAAGTTCTGTACAGTCTGAGTA	8663.99	8633.39	69
70	H51_6-16_128-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCACAGTCTGAGT	8638.98	8638.34	70
71	H51_5-17_129-142	27	TCGGTAAGTTCTGTAAACAGTCTGAGTA	9002.11	9002.21	71
72	H51_6-17_128-142	27	TCGGTAAGTTCTGTCAACAGTCTGAGT	8978.10	8978.75	72
73	H51_6-18_129-142	27	TCGGTAAGTTCTGTAAACAGTCTGAGT	8993.10	8993.63	73
74	H51_2-12_128-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCTCTGAGTAGGA	8678.99	8679.82	74
75	H51_2-11_128-142	25	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGA	8348.74	8348.88	75
76	H51_-1-13_131-142	26	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGAGC	8704.00	8703.95	76
77	H51_5-15_128-141	25	CGGTAAGTTCTGTCCAGTCTGAGTA	8308.87	8308.76	77
78	H51_4-13_131-142	22	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAG	7339.53	7339.90	78
79	H51_-3-7_128-142	25	TCGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGAGCTA	8348.88	8348.60	79
80	H51_-2-9_129-142	25	TCGGTAAGTTCTGTGAGTAGGAGCT	8388.89	8388.22	80
81	H51_2-11_127-141	25	CGGTAAGTTCTGTCCCTGAGTAGGA	8333.88	8333.90	81
82	H51_-2-13_127-138	27	TAAGTTCTGTCCGTCTGAGTAGGAGCT	8994.10	8994.30	82
83	H51_-7-7_128-141	28	CGGTAAGTTCTGTCTGAGTAGGAGCTAAAAT	9366.24	9366.55	83
84	H51_-3-11_120-133	28	TCTGTCCAAGCCCGCTGAGTAGGAGCTA	9288.21	9288.36	84
85	H51_6-18_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTCTAACAGTCTGAGT	8978.10	8978.58	85
86	H51_-1-15_125-136	28	AGTTCTGTCCAACAGTCTGAGTAGGAGC	9327.22	9326.72	86
87	H51_-1-12_125-138	27	TAAGTTCTGTCCAATCTGAGTAGGAGC	8987.11	8987.28	87
88	H51_6-17_128-141	26	CGGTAAGTTCTGTCAACAGTCTGAGT	8647.99	8648.53	88
89	H51_6-18_130-142	26	TCGGTAAGTTCTGTAAACAGTCTGAGT	8662.99	8663.19	89
90	H51_73-87_127-141	30	CGGTAAGTTCTGTCTCAAGGAAGATGGCA	10021.94	10021.47	90
91	H51_70-82_128-142	28	TCGGTAAGTTCTGTGCAAGATGGCATT	9348.22	9348.21	91
92	H51_69-81_128-141	27	CGGTAAGTTCTGTCAAGATGGCATTTC	8978.10	8978.55	92
93	H51_70-82_127-141	28	CGGTAAGTTCTGTCCGAAGATGGCATT	9333.22	9333.36	93

[0103] [実施例2：アンチセンスオリゴマーのエクソンスキッピング活性試験]

ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン5 1スキッピングの *In vitro* 試験

(1) 試験方法

R D細胞（ヒト横紋筋肉腫細胞株、CCL-136、ATCCより購入）

3. 5×10^5 個に対して、表1、2の各アンチセンスオリゴマー0.3~120 μ MをAmaxa Cell Line Nucleofector Kit Lを用いてNucleofector II (Lonza)により導入した。導入のためのパルスプログラムはT-030を用いた。

[0104] 導入後のRD細胞を、10%ウシ胎児血清(FBS)(インビトロジェン社製)を含むEagle's minimal essential medium (EMEM) 培地(シグマ社製、以下同じ)2 mL中、37℃、5%CO₂条件下で三晩培養した。

培養後のRD細胞をPBS(ニッスイ社製、以下同じ)で1回洗浄した後、1%の2-メルカプトエタノール(ナカライテスク社製)を含むBuffer RA1(タカラバイオ社製)を350 μ L細胞に添加し、数分間室温に放置して細胞を溶解させ、NucleoSpin(登録商標) Filter(タカラバイオ社製)上に回収した。11,000×gで1分間遠心し、ホモジネートを作製した。NucleoSpin(登録商標) RNA(タカラバイオ社製)に添付のプロトコルに従って全RNAを抽出した。抽出した全RNAの濃度はNanoDrop ONE(Thermo Fisher社製)を用いて測定した。

[0105] 抽出した全RNA 400ngに対し、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit(キアゲン社製)およびサーマルサイクラーを用いてOne-Step RT-PCRを行った。上記キットに添付のプロトコルに従って、反応液を調製した。サーマルサイクラーはTakara PCR Thermal Cycler Dice Touch(タカラバイオ社製)を用いた。用いたRT-PCRのプログラムは、以下の通りである。

50℃、30分間：逆転写反応

95℃、15分間：ポリメラーゼ活性化、逆転写酵素不活性化、cDNA熱変性

[94℃、30秒間；60℃、30秒間；72℃、1分間]×35サイクル：PCR増幅

72℃、10分間：最終伸長反応

[0106] RT-PCRに使用したフォワードプライマーとリバースプライマーの塩基配列は以下の通りである。

フォワードプライマー：5' - CTGAGTGGGAAGCGGTAAAC -3' (配列番号 95)

リバースプライマー：5' - GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA -3' (配列番号 96)

[0107] 上記PCRの反応産物1 μ LをBioanalyzer (アジレント社製)、又はMultiNA (島津製作所製)を用いて解析した。

エクソン51がスキップしたバンドのポリヌクレオチド量「A」と、エクソン51がスキップしなかったバンドのポリヌクレオチド量「B」を、バンドのシグナル強度として測定した。これら「A」及び「B」の測定値に基づき、上述の式(1)に従って、スキッピング効率を求めた。

[0108] (2) 試験結果

各アンチセンスオリゴマーについて得られたエクソン51のスキッピング効率の結果を図1～18に示す。なお、直接的または間接的な比較対照として、エクソン51のスキッピング薬であるetepirsen (WHO Drug Information 24, 2, 137-139 (2010), Proposed INN List 103) と同一の塩基配列を有し、かつ同一の5'末端修飾：すなわち5'末端が上記の基(1)を有しており、そのため全体の構造が同一である表2に示すアンチセンスオリゴマー (PMO No. 94 (配列番号94)) を、特開2015-91229号公報に記載の方法に従い合成して用いた。

表1の本発明のアンチセンスオリゴマーは、etepirsenと全体の構造が同一である表2のアンチセンスオリゴマーと比較してスキッピング効率が顕著に高く、エクソン51を極めて有効にスキッピングさせた。

[表4]

表2 合成した eteplirsen と同一の塩基配列および5'末端修飾を有するアンチセンスオリゴマー (PMO No. 94)

PMO No.	標的塩基配列	全長	PMO の塩基配列	分子量		配列番号
				理論値	実測値	
94	H51_66-95	30	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	10300.59	10300.43	94

[0109] [実施例3：アンチセンスオリゴマーの溶解性試験]

アンチセンスオリゴマーの生理食塩水に対する溶解性試験

実施例2でスキッピング効率が非常に高かったPMO No. 7、8、10、16、21、24、31、42、67、76および90の各アンチセンスオリゴマーについて、医薬用途への有用性をさらに検証するため、生理食塩水に対する溶解性試験を行った。

[0110] (1) 試験方法

5.7 mgの上記各アンチセンスオリゴマーの入ったサンプル瓶に注射用水57 μ Lを加え、超音波とボルテックスを使って溶解させた後、2倍濃度生理食塩水57 μ Lを加え、ボルテックスを使って攪拌し50 mg/mLの生理食塩水溶液とした。室温で24時間静置し、静置後に沈澱の有無を目視によって確認し、沈澱が見られなかったものを溶解性が高いアンチセンスオリゴマーと評価した。

[0111] (2) 試験結果

試験した各アンチセンスオリゴマーのうち、PMO No. 7、8、10、16、21、24、31、42、67および76の各アンチセンスオリゴマーは生理食塩水に対して50 mg/mL以上の溶解性を示した。

この結果から、これらのアンチセンスオリゴマーは、エクソン51のスキッピング効率が顕著に高く、生理食塩水に対する溶解性も高いため、医薬として利用価値が高いアンチセンスオリゴマーであることがわかった。

[0112] [実施例4：アンチセンスオリゴマーの安全性評価]

実施例3で生理食塩水に対する溶解性試験を実施した各アンチセンスオリ

ゴマーのうち、PMO No. 16、21、42、90について、医薬用途での安全性を検証するため、安全性評価を行った。

[0113] (1) 評価方法

各アンチセンスオリゴマーを生理食塩水に溶解し、C57BL/6N雄性6週齢マウスの尾静脈内へ投与した。翌日、マウスより血清を回収し、血中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 値、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値、尿素窒素量 (BUN) 値およびクレアチニン値を測定した。媒体として使用した生理食塩水のみを投与したマウスもしくは無処置マウスの対照群での測定値を正常値とし、統計学的有意差検定 (Studentのt検定またはDunnettの検定) を行って各アンチセンスオリゴマーの投与群で $p < 0.05$ の有意水準で値に有意に上昇が見られた場合、異常値と判定した。各検定には、統計解析システムSAS (登録商標、SAS Institute社) バージョン9.3を用いた。1000 mg/kgの用量においてAST値、ALT値、BUN値およびクレアチニン値のいずれにも異常値が見られない場合、安全性が高いアンチセンスオリゴマーであると判断した。

[0114] (2) 評価結果

PMO No. 16、21、42の各アンチセンスオリゴマーについては、1000 mg/kgの用量においてAST値、ALT値、BUN値およびクレアチニン値のいずれにも異常値が見られず、安全性が高い (具体的には、腎臓および肝臓の機能への影響がないか、影響を与える可能性が極めて低い) アンチセンスオリゴマーであることを確認した。それぞれの結果について、図19～21に示す。なお、 $p < 0.05$ の有意水準で有意に上昇が見られた値 (異常値) にはp値を示す。

[0115] 以上の結果より、本発明のアンチセンスオリゴマーは、ジストロフィン遺伝子のエクソン51のスキッピングを高効率に誘導する活性を示しつつ、かつ医薬として優れた物性および安全性を有することが示された。

配列表フリーテキスト

[0116] 配列番号 1 ～ 1 2 6 : 合成核酸