

明 細 書

発明の名称：

エクソン 50 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 50 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, 500 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みられる。その後、DMD 患者の筋力低下は進行し、DMD 患者は 12 歳頃までに歩行不能になり、20 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、220 万塩基の 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 79 個のエクソンが結合して翻訳領域に対応する mRNA は 11, 058 塩基になる。この mRNA から 3, 685 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 Wilton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4%程度は、第50番目のエクソン（以下、「エクソン50」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（非特許文献5）。近年では、ジストロフィン遺伝子のエクソン50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、出願人も含めた複数の研究機関から報告がなされている（特許文献1～6及び非特許文献6）。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第2013/100190号

特許文献2：国際公開第2004/048570号

特許文献3：国際公開第2006/000057号

特許文献4：国際公開第2010/050802号

特許文献5：国際公開第2010/048586号

特許文献6：国際公開第2011/057350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 15:1288-96 (2007)

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

非特許文献5: Bladen C. L. et al., Human Mutation 36:395-402 (2015)

非特許文献6: Bo Wu et al., PLoSOne 6(5):e19906 (2011)

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50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50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物性（例えば溶解性）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3～5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50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、前記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50のスキッピングを高効率に誘導しつつ、かつ優れた溶解性を有することを見出した。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)～(d)：

- (a) 配列番号3～5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) 配列番号3～5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50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) 配列番号3～5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5

0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) 配列番号3～5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50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3～5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3～5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50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3～5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からなり、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン50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3～5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50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3～5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50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〕

オリゴヌクレオチドである、上記〔1〕～〔3〕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。

〔5〕

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〔4〕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が、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で置換されたりボースである、上記〔4〕又は〔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。

（上記Rは、アルキル又はアリールを示し、上記R'は、アルキレンを示す。）

〔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〔4〕～〔6〕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。

[8]

モルホリノオリゴマーである、上記〔１〕～〔３〕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。

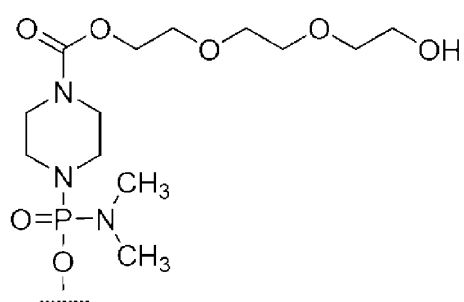
[9]

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〔８〕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。

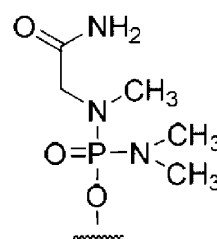
 $[10]$

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〔８〕又は〔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。

$$[1 \ 1]$$

アンチセンスオリゴマーの長さが１９または２０塩基である、上記〔１〕～〔１０〕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 2]

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５０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５０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５０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５１、５１－５３、５１－５５、または５１－５７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使用。

〔１９〕

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

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〔12〕～〔16〕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。

〔20〕

前記患者がヒトである、上記〔19〕に記載の治療方法。

〔21〕

筋ジストロフィーの治療に使用するための、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、または上記〔12〕～〔16〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔22〕

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〔21〕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50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50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。

図面の簡単な説明

〔0015〕 〔図1〕PMO No. 1および2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50のスキッピング効率を示す。

〔図2〕PMO No. 1、3、および4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50のスキッピング効率を示す。

〔図3〕PMO No. 1、5、6および7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50のスキッピング効率を示す。

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50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50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、cDNA、mRNA前駆体及びmRNAも含まれる。好ましくは、遺伝子は、mRNA前駆体、即ち、pre-mRNA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Xp21.2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14kbに過ぎず、該コード領域は79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, R.G., 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pre-mRNAは、スプライシングを受けて14kbの成熟mRNA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50とイントロン50の5'端付近の配列とを含む塩基配列を配列番号1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50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50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)～(d)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) 配列番号3～5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) 配列番号3～5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50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) 配列番号3～5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を含み、かつヒトジストロフィン遺伝子のエクソン50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) 配列番号3～5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50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3～5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3～5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50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3～5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50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3～5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50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] 上記(b)～(d)のアンチセンスオリゴマーおよび(f)～(h)のアンチセンスオリゴマーは、具体的にはそれぞれ(a)のアンチセンスオリゴマーおよび(e)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。

[0023] 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3～5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。

[0024] 本明細書中、「ストリンジェントな条件」とは、低ストリンジェントな条件、中ストリンジェントな条件及び高ストリンジェントな条件のいずれでもよい。「低ストリンジェントな条件」とは、例えば、 $5\times$ SSC、 $5\times$ デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、32℃の条件である。また、「中ストリンジェントな条件」とは、例えば、 $5\times$ SSC、 $5\times$ デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、42℃又は $5\times$ SSC、1% SDS、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50%ホルムアミド、42℃の条件である。「高ストリンジェントな条件」とは、例えば、(1) $5\times$ SSC、 $5\times$ デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、50℃、(2) 0.2 $\times$ SSC、0.1% SDS、60℃、(3) 0.2 $\times$ SSC、0.1% SDS、62℃、(4) 0.2 $\times$ SSC、0.1% SDS、65℃、又は(5) 0.1 $\times$ SSC、0.1% SDS、65℃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ェ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ェ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。

[0025] なお、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 Detect

ion 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 3～5 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デオキシジゲニン（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。

[0026] 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 3～5 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。

[0027] なお、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、word length=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] 「ヒトジストロフィン遺伝子の第50番目のエクソンのスキッピングを誘導する（可能にする）」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50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50の除外が起こり、例えばエクソン51が欠失したDMD患者の場合、エクソン49の3'末端に相当する塩基配列にエクソン52の5'末端に相当する塩基配列が連結し、コー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。

[0029] したがって、ジストロフィン遺伝子にエクソン50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50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50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50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51、51-53、51-55、51-57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。

[0030] 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。

[0031] ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン50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50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50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50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。

[0032]
$$ES = 100 \times A / (A + B) \cdots (1)$$

[0033] 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50をスキッピングする。

[0034] 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、16～25塩基、16～23塩基、19塩基又は20塩基の長さが好ましく、モルホリノオリゴマーが好ましい。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 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)。

[0040] 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。

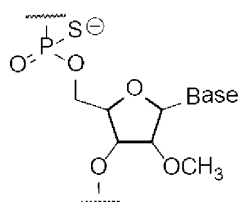
[0041] 本発明において、アリールとしては、炭素数6～10のアリールが好ましい。具体的には、例えば、フェニル、 α -ナフチル、 β -ナフチルを挙げることができる。とりわけフェニルが好ましい。当該アリールは置換されていてもよく、かかる置換基としては、例えば、アルキル、ハロゲン、アルコキシ、シアノ、ニトロを挙げることができ、これらが1～3個置換されていてもよい。

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。

[0042] 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]

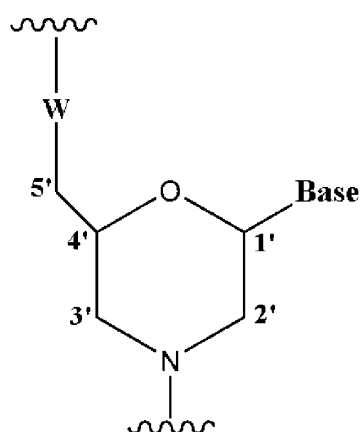


(式中、Baseは、核酸塩基を表す。)

[0043] 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。

[0044] 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]

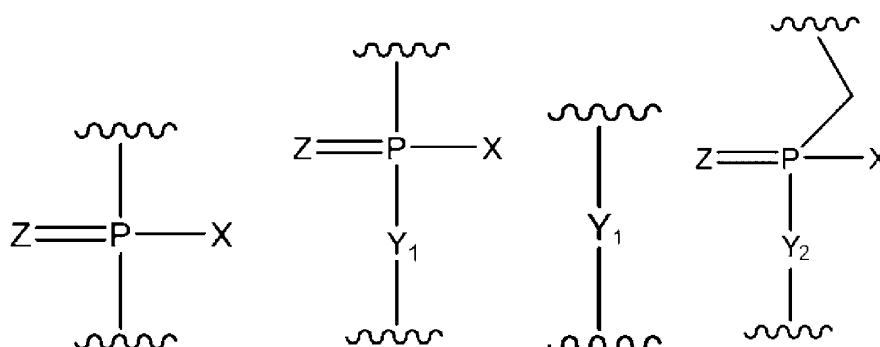


(式中、Baseは、前記と同義であり；

Wは、以下のいずれかの式で表わされる基を表す。

[0045]

[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。))

[0046] 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。

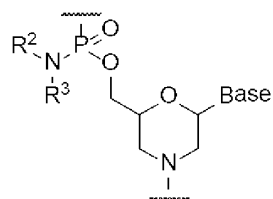
[0047]

[表1]

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)

[0048] モルホリノオリゴマーは、好ましくは、以下の式で表わ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。

[0049] 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

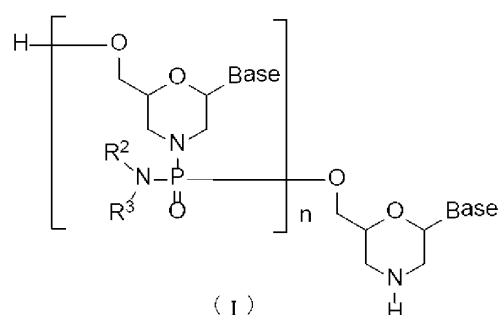
を挙げることができる（例えば、特許再公表公報第2006/129594号及び第2006/038608号を参照）。

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。

[0050] [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、15～34、15～24又は15～22の範囲内にある任意の整数であり、より好ましくは、18又は19である。]

[0051] 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。

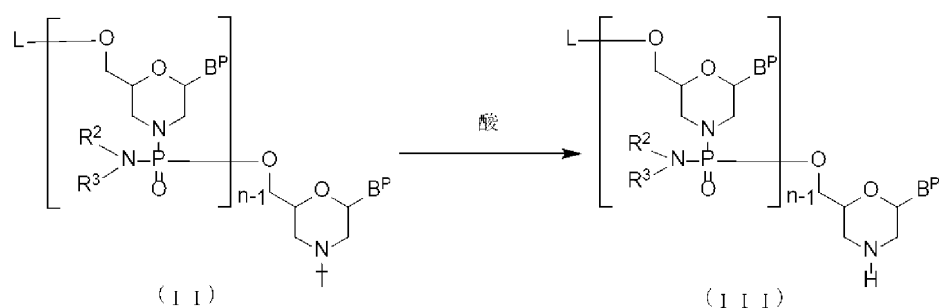
また、下記のすべての工程は、液相法又は固相法（マニュアル又は市販の

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。

[0052] (1) 工程 A :

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

[化7]



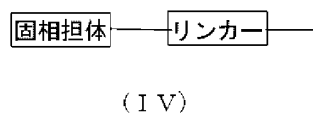
[式中、 n 、 R^2 、 R^3 は、前記と同義であり；

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（ⅠⅤ）で表される基（以下、基（ⅠⅤ）という。）を表す。

[化8]



[0053] B^Pに係る「核酸塩基」としては、Base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)。

[0054] 「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)処理中にかかる高圧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 Poly

styrene 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-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-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。

[0055] 本工程は、化合物 (I I) に酸を作用させることにより実施することができる。

[0056] 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 (I I) 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。

[0057] 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。

[0058] 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。

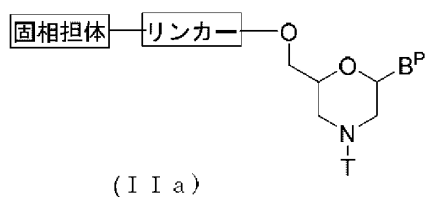
本工程に用いる溶媒としては、反応に関与しなければ特に限定されないが、ジクロロメタン、アセトニトリル、アルコール類（エタノール、イソプロパノール、トリフルオロエタノールなど）、水又はこれらの混合物を挙げることができる。反応温度は、例えば、10℃～50℃の範囲内が好ましく、より好ましくは、20℃～40℃の範囲内であり、さらに好ましくは、25℃～35℃の範囲内である。

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。

[0059] なお、化合物 (I I) において、 $n = 1$ であって、L が基 (I V) である、次の一般式 (I I a) で表される化合物 (以下、化合物 (I I a) 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]

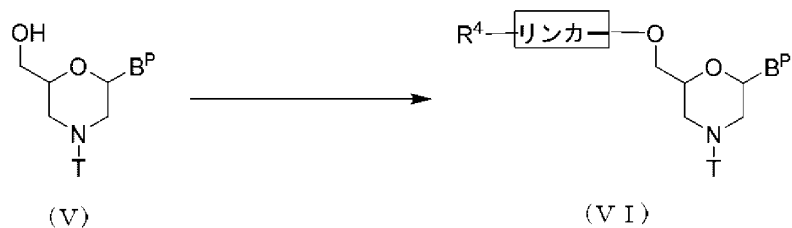


[式中、B^P、T、リンカー、固相担体は、前記と同義である。]

[0060] 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 (V I) で表される化合物 (以下、化合物 (V I) という。) を製造する工程。

[化10]



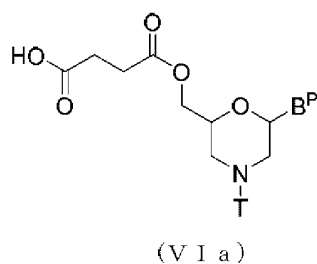
[式中、B^P、T、リンカーは、前記と同義であり；

R⁴は、水酸基、ハロゲン、カルボキシ基、又は、アミノを表す。]

[0061] 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 l 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]

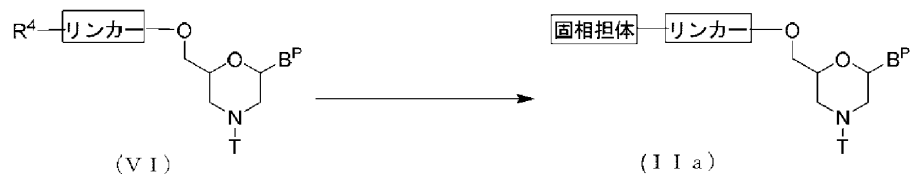


[式中、 B^P 、 T は、前記と同義である。]

[0062] 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]



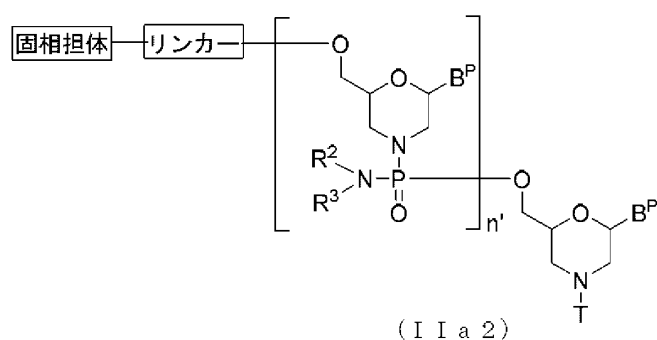
[式中、 B^P 、 R^4 、 T 、リンカー、固相担体は、前記と同義である。]

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 (I1) において、 $n=2\sim 99$ (好ましくは $16\sim 35$ 、 $16\sim 25$ 又は $16\sim 23$ の範囲内にある任意の整数であり、好ましくは、 19 又は 20 である) であって、 L が基 (IV) である、次の一般式 (I1a2)

で表される化合物は、化合物 (I I a) を出発原料とし、本明細書に記載の P M O 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]

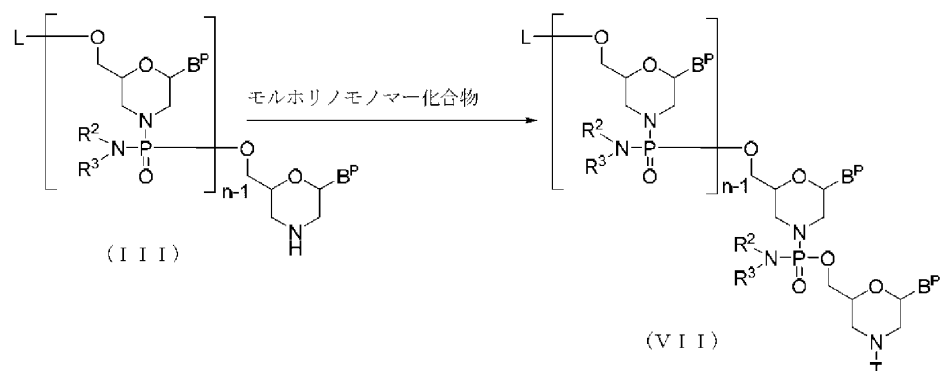


[式中、B^p、R²、R³、T、リンカー、固相担体は、前記と同義であり；
n' は、1～98（特定の態様ではn' は、例えば、1～34、1～24、1～23、1～22、1～21、1～20、1～19、1～18、1～17、1～16、1～15である）を表す。]

[0063] (2) 工程 B：

化合物 (I I I) 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 (V I I) で表される化合物（以下、化合物 (V I I) という。）を製造する工程。

[化14]

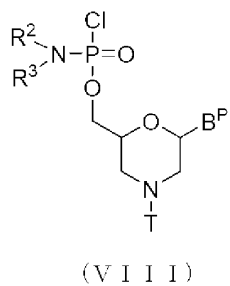


[式中、各 B^P 、 L 、 n 、 R^2 、 R^3 、 T は、前記と同義である。]

[0064] 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。

[0065] 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 、 R^2 、 R^3 、 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。

る。塩基の使用量としては、例えば、化合物(111) 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。

[0066] 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。

[0067] 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

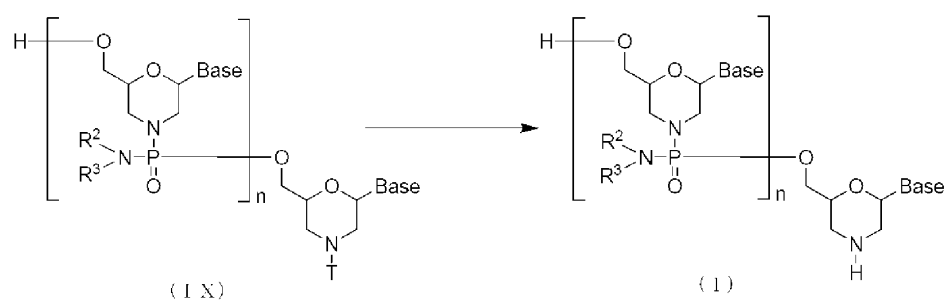
ルに対して、例えば、１モル当量～１００００モル当量の範囲内が適当であり、好ましくは１０モル当量～１０００モル当量の範囲内である。

[0071] 反応温度は、例えば、１５℃～７５℃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（ⅤⅠⅠ）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。

[0072] （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。]

[0073] 本工程は、化合物（ⅠⅩ）に酸を加えることによって実施することができる。

[0074] 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。

[0075] 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。

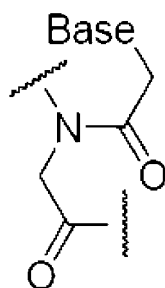
[0076] PMO (I) は、本工程で得られた反応混合物から通常分離精製手段、例えば、抽出、濃縮、中和、濾過、遠心分離、再結晶、C₈からC₁₈の逆相カラムクロマトグラフィー、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、透析、限界ろ過などの手段を単独若しくは組み合わせるにより得ることができ、所望のPMO (I) を単離精製することができる（例えば、国際公開第1991/09033号を参照）。

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20mM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。

[0077] 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]



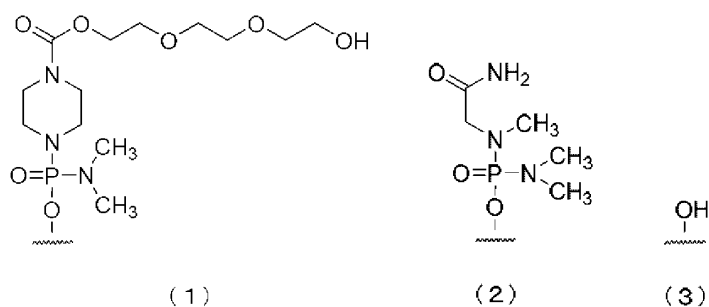
(式中、Baseは、前記と同義である。)

[0078] 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. Ottelson, H. Orum, J. Pept. Res., 49, 80 (1997)

[0079] 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。

[0080] 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）。

[0081] 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*, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.036>）。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。

[0082] 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50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50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。したがって、ジストロフィン遺伝子にエクソン50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50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と予測される。例えば、少なくともエクソン50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50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50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。エクソン51、51-53、51-55、51-57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50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51欠失患者、エクソン51-53欠失患者、エクソン51-55欠失患者、エクソン51-57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50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。

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。

[0083] 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'*-ジベンジリ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ルスルホン酸塩；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。

[0084] 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。

[0085] 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）、GeneSilencer（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）、Nucleof

ector 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、Jet S I (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、Genome One (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。

[0086] 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。

[0087] 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、 $2.5 \sim 500 \text{ mg/mL}$ 、 $5 \sim 450 \text{ mg/mL}$ 、 $10 \sim 400 \text{ mg/mL}$ 、 $15 \sim 350 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 300 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 250 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 200 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 150 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 100 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 50 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 40 \text{ mg/mL}$ 、 $20 \sim 30 \text{ mg/mL}$ 、 $23 \sim 27 \text{ mg/mL}$ 、 $24 \sim 26 \text{ mg/mL}$ 、又は 25 mg/mL の濃度で含んでいてもよい。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、 $10 \sim$

100 mg/mL、15~95 mg/mL、20~80 mg/mL、25~75 mg/mL、30~70 mg/mL、35~65 mg/mL、40~60 mg/mL、45~55 mg/mL、47~53 mg/mL、48~52 mg/mL、49~51 mg/mL、又は50 mg/mLの濃度で含んでいてもよい。

[0088] 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125 mg又は250 mg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、0.5 mL~100 mLの水と混合して（1. 25 mg/mL~250 mg/mL又は2. 5 mg/mL~500 mg/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1 mL~50 mLの水と混合して（2. 5 mg/mL~125 mg/mL又は5 mg/mL~250 mg/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5 mL~10 mLの水と混合して（12. 5 mg/mL~25 mg/mL又は25 mg/mL~50 mg/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。

[0089] 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。

- [0090] 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。
- [0091] 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°C ～ -20°C の条件で予備凍結を2時間程度行い、約 0°C ～ 10°C で減圧下に一次乾燥を行い、次いで、約 15°C ～ 25°C 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。
- [0092] 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 $0.5\sim 2$ 倍量、又は 500 mL 以下が適当である。
- [0093] 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 $0.1\text{ mg}\sim 10\text{ g}$ ／ヒトの範囲内が、好ましくは $1\text{ mg}\sim 1\text{ g}$ ／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。

[0094] 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、 $0.1 \text{ nM} \sim 100 \text{ }\mu\text{M}$ 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。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、 $0.1 \sim 100$ の範囲内が適当であり、 $0.1 \sim 10$ の範囲内が好ましい。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。

[0095] 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

[0096] [実施例1：アンチセンスオリゴマーの製造]

国際公開第2013/100190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50および／またはその3'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. 1～7（配列番号2～8））を合成した。各アンチセンスオリゴマーの全長は19～21merである。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「H50_109-129」は、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン50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109番目～129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、エクソン50の全長は109塩基であるため、この例では標的塩基配列中の110番目～130番目の塩基の配列は、イントロン50中の塩基配列である。

。

[表2]

表1 合成したアンチセンスオリゴマー (PMO No. 1～7)

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	H50_109-129	21	ATGGGATCCAGTATACTTACA	6946.42	6946.25	2
2	H50_110-129	20	ATGGGATCCAGTATACTTAC	6607.30	6607.72	3
3	H50_110-128	19	TGGGATCCAGTATACTTAC	6268.18	6268.26	4
4	H50_111-129	19	ATGGGATCCAGTATACTTA	6292.19	6291.8	5
5	H50_107-125	19	GATCCAGTATACTTACAGG	6277.19	6276.75	6
6	H50_108-126	19	GGATCCAGTATACTTACAG	6277.19	6277.13	7
7	H50_112-130	19	AATGGGATCCAGTATACTT	6292.19	6292.97	8

[0097] [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50スキッピングの *In vitro* 試験

(1) 試験方法

RD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の各アンチセンスオリゴマー0.1～1 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。

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。

導入後の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) 350 μL を上記細胞に添加し、数分間室温に放置して上記細胞を溶解させ、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) に添付のプロトコールに従って上記細胞から全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。

[0098] 抽出した全RNA 400 ng 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ールに従って、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

[0099] 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' - AACAAACCGGATGTGGAAGAG -3' (配列番号 9

)

リバースプライマー：5' - TTGGAGATGGCAGTTTCCTT -3' (配列番号 10

)

[0100] 上記PCRの反応産物1 μ LをBioanalyzer (アジレント社製)、及びMultina (島津製作所製)を用いて解析した。

エクソン50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50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。

[0101] (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50のスキッピング効率の結果を図1～3に示す。また、これらの結果より算出した、各アンチセンスオリゴマーが50%のスキッピング効率ESを示す有効濃度(EC_{50})の値を下記表2～4に示す。本試験により、各アンチセンスオリゴマーのうち、PMO No. 1～4はスキッピング効率ESが高く EC_{50} の値が低いため、エクソン50を有効にスキッピングさせることが判明した。

また、PMO No. 3及び4と同様に全長が19merと短いアンチセンスオリゴマーのうち、PMO No. 5～7はスキッピング効率が低く EC_{50} の値が高かった。PMO No. 3及び4とPMO No. 5～7は標的とする塩基配列の重複の程度も大きいことから、エクソン50のスキッピングに対するPMO No. 3及び4の有効性は特筆すべきものである。

この結果により、本発明のアンチセンスオリゴマーは、従来技術と比較してその長さが短い場合であっても、エクソン50のスキッピングを高効率に誘導することができることが示された。

[表3]

表2 アンチセンスオリゴマー (PMO No. 1 および 2) の EC₅₀

PMO No.	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ g/mL)
1	0.45	3.12
2	0.49	3.22

[表4]

表3 アンチセンスオリゴマー (PMO No. 1、3、および 4) の EC₅₀

PMO No.	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ g/mL)
1	0.31	2.16
3	0.45	2.82
4	0.52	3.28

[表5]

表4 アンチセンスオリゴマー (PMO No. 1、5、6、および 7) の EC₅₀

PMO No.	EC ₅₀ (μ M)	EC ₅₀ (μ g/mL)
1	0.41	2.87
5	16.08	100.99
6	3.13	9.78
7	1.23	7.75

[0102] [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ESが高かったアンチセンスオリゴマーのうち、全長が19～20merと短く合成が簡便であるPMO No. 2、3、4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。

[0103] (1) 試験方法

4.5 mg の上記各アンチセンスオリゴマーが入ったサンプル瓶に生理食塩水 45 μ L を加え、超音波とボルテックスを使って攪拌し、100 mg/mL の生理食塩水溶液とした。室温で 24 時間放置し、沈殿が生じないものを溶解性が高い配列と評価した。

[0104] (2) 試験結果

試験した各アンチセンスオリゴマーは、全て生理食塩水に対して 100 mg/mL 以上の溶解性を示した。これらのアンチセンスオリゴマーは、エクソン 50 のスキッピング効率が高く、生理食塩水に対する溶解性も高いため、医薬としての利用価値が高いアンチセンスオリゴマーである。

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 50 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物性を有することが示された。

産業上の利用可能性

[0105] 試験例に示す実験結果から、本発明のアンチセンスオリゴマーは、RD 細胞において、著しく高い効率でエクソン 50 のスキッピングを誘導することが示された。したがって、本発明のアンチセンスオリゴマーは、DMD の治療において、非常に有用である。

配列表フリーテキスト

[0106] 配列番号 1 ~ 10 : 合成核酸