



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116209478 A

(43) 申请公布日 2023.06.02

(21) 申请号 202180061076.3

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(22) 申请日 2021.07.16

专利代理师 王灵菇

(30) 优先权数据

2020-122975 2020.07.17 JP

2021-025158 2021.02.19 JP

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/026798 2021.07.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/014703 JA 2022.01.20

(71) 申请人 田边三菱制药株式会社

地址 日本大阪府

(72) 发明人 石川洁 村田俊平

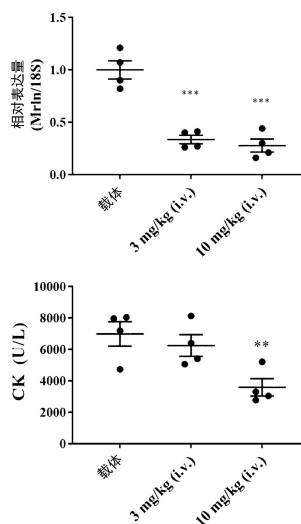
权利要求书1页 说明书14页
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

肌病的预防或治疗剂

(57) 摘要

将针对肌调素的反义寡核苷酸、抗肌调素抗体等肌调素抑制物质用作肌营养不良、包涵体肌炎、肌萎缩侧索硬化症、废用性肌萎缩及肌减少症等肌病的预防或治疗剂的有效成分。



Mean ± S.E.M. n=4. **P<0.005, ***P<0.0005, vs. 载体 (William's多重比较检验)

1. 一种肌病的预防或治疗剂, 其将肌调素抑制物质作为有效成分。
2. 根据权利要求1所述的预防或治疗剂, 其中, 肌调素抑制物质为核酸。
3. 根据权利要求2所述的预防或治疗剂, 其中, 肌调素抑制物质是针对肌调素的反义寡核苷酸。
4. 根据权利要求1~3中任一项所述的预防或治疗剂, 其中, 肌病选自包含肌营养不良、包涵体肌炎、肌萎缩侧索硬化症、废用性肌萎缩及肌减少症的组。
5. 根据权利要求4所述的预防或治疗剂, 其中, 肌营养不良选自包含杜氏肌营养不良、贝克肌营养不良及肌聚糖病的组。
6. 根据权利要求4所述的预防或治疗剂, 其中, 肌营养不良为杜氏肌营养不良。
7. 根据权利要求4所述的预防或治疗剂, 其中, 肌营养不良为肌聚糖病。

肌病的预防或治疗剂

技术领域

[0001] 本发明涉及用于预防或治疗肌病的药剂。

背景技术

[0002] 抗肌营养不良蛋白-糖蛋白复合物(dystrophin-glycoprotein complex:DGC)具有连接骨骼肌和细胞外基质的作用。DGC由抗肌营养不良蛋白、肌聚糖(sarcoglycan)、抗肌营养不良蛋白聚糖(dystroglycan)等蛋白构成。若构成DGC的上述蛋白中的任一个因基因突变而缺损,则会出现肌营养不良的病理状态。抗肌营养不良蛋白缺损的类型被称为杜氏肌营养不良(duchenne muscular dystrophy:DMD)。DMD是出现频率最高的肌营养不良,在男童中以3,000分之一的概率发病。DMD在肌营养不良中也是重症的类型,在10岁前后不能步行,变成轮椅生活。在抗肌营养不良蛋白的表达异常轻微的情况下,症状与DMD相比为轻度,这样的病理状态被称为贝克肌营养不良(becker muscular dystrophy:BMD)。肌聚糖缺损的类型被分为肢带型肌营养不良(limb-girdle muscular dystrophy:LGMD)的2C~2F型、统称为肌聚糖病(sarcoglycanopathy)。肌聚糖病也为重症的类型,其大多表现出与DMD同样的临床症状。

[0003] 认为因构成DGC的蛋白的缺损而发病的肌营养不良的细胞内的钙调节发生异常是病理状态进展的一个原因(非专利文献1)。报告了DMD在其小鼠模型的骨骼肌中,当使肌浆/内质网钙ATP酶(Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase,SERCA)1的表达亢进时,肌营养不良病理状态得到改善(非专利文献2)。同样地,在肌聚糖病的小鼠模型中也弄清楚了,通过SERCA1的表达亢进,肌营养不良病理状态得到改善(非专利文献3)。SERCA局部存在于内质网膜中,是通过承担用于将钙从细胞质摄入到内质网内的泵的作用而有助于细胞内钙量的调节的蛋白,其中SERCA1是骨骼肌特异性地表达的类型。

[0004] 以上内容启示了,对于因构成DGC的蛋白的缺损而发病的肌营养不良,使SERCA1活性亢进与肌营养不良病理状态的改善相关。另外,即使在钙调节发生异常的其他肌病中,使SERCA1活性亢进也有可能和病理状态的改善相关。但是,能够选择性地使SERCA1的活性充分亢进的化合物目前为止尚没有报告。

[0005] 发现了肌调素(Myoregulin,MRLN)是由长非编码RNA(Long noncoding RNA)编码、骨骼肌特异性地表达、是通过抑制SERCA活性来调节肌质网内的钙的微肽。报告了MRLN的基因缺损小鼠的肌质网内的钙量和运动能力增加,启示其机理是介由解除SERCA1的抑制(非专利文献4)。但是,该文献中使用的小鼠是使野生型小鼠的MRLN缺损而得到的小鼠,不能反映肌病的病理状态。还有DMD的小鼠模型(mdx小鼠)中SERCA1的表达降低的报告,不清楚在肌病的状态下通过调节MRLN的表达、使SERCA1的活性提高,是否也可改善肌病的病理状态(非专利文献5)。

[0006] 如此,虽然报告了MRLN和SERCA1的关系,但未报告MRLN的表达抑制与以肌营养不良为代表的肌病的病理状态之间的关系。

[0007] 现有技术文献

- [0008] 非专利文献
[0009] 非专利文献1:Biomed Res Int.,2015:131436(2015)
[0010] 非专利文献2:Am J Physiol Cell Physiol.,308(9):C699-709
[0011] 非专利文献3:J Clin Invest.,121(3):1044-52(2011)
[0012] 非专利文献4:Cell,160(4):595-606(2015)
[0013] 非专利文献5:HUMAN GENE THERAPY,21:1735-1739(2010)

发明内容

- [0014] 发明所要解决的课题
[0015] 本发明的课题在于提供一种用于治疗或预防肌营养不良等肌病的药剂。
[0016] 用于解决课题的手段
[0017] 本发明者们进行了深入研究,结果发现MRLN抑制物质对肌病的治疗、预防是有效的,从而完成了本发明。
[0018] 本发明的主旨如下。
[0019] [1]一种肌病的预防或治疗剂,其将肌调素抑制物质作为有效成分。
[0020] [2]根据[1]所述的预防或治疗剂,其中,肌调素抑制物质为核酸。
[0021] [3]根据[2]所述的预防或治疗剂,其中,肌调素抑制物质是针对肌调素的反义寡核苷酸。
[0022] [4]根据[1]~[3]中任一项所述的预防或治疗剂,其中,肌病选自包含肌营养不良、包涵体肌炎、肌萎缩侧索硬化症、废用性肌萎缩及肌减少症的组。
[0023] [5]根据[4]所述的预防或治疗剂,其中,肌营养不良选自包含杜氏肌营养不良、贝克肌营养不良及肌聚糖病的组。
[0024] [6]根据[4]所述的预防或治疗剂,其中,肌营养不良为杜氏肌营养不良。
[0025] [7]根据[4]所述的预防或治疗剂,其中,肌营养不良为肌聚糖病。
[0026] 发明效果
[0027] 根据本发明,能够改善肌营养不良等肌病的症状,并提供对该疾病的预防、治疗有效的药物。

附图说明

- [0028] 图1是表示由MRLN特异性反义寡核苷酸带来的MRLN表达抑制效果的图表。
[0029] 图2是表示对mdx小鼠给药MRLN特异性反义寡核苷酸时的MRLN的表达量比和肌酸激酶(CK)的值的图表。
[0030] 图3是表示对Sgcb敲除小鼠给药MRLN特异性反义寡核苷酸时的MRLN的表达量比和CK的值的图表。
[0031] 图4是表示将向DMD患者来源的细胞添加MRLN特异性siRNA时的4-氯甲卡西酮(4-Chloromethcathinone,CMC)依赖性钙浓度上升与添加阴性对照时进行比较的结果的图。

具体实施方式

- [0032] 应理解,上述的概要以及以下的详细说明这两者只不过是例示性的并且是说明性

的,并不对所要求的本发明进行限制。另外,本说明书中使用的部分的标题仅是出于构成上的目的,不应被解释为对所记载的主题进行限制。

[0033] (定义)

[0034] 只要没有给出具体的定义,则本说明书中记载的与分析化学、有机合成化学、以及医疗化学及药物化学相关地使用的命名法、及它们的顺序和技术方法在本技术领域中公知的,是通常使用的。可以将标准的技术方法用于本说明书中使用的化学合成和化学分析。在允许的情况下,通过本说明书的公开整体提及的所有的专利、申请、公开申请以及其他出版物、可通过国立生物技术信息中心(NCBI)等数据库获得的GenBank保藏编号以及相关的序列信息以及其他数据中有关提及的内容的一部分及其整体通过参照而纳入本说明书中。

[0035] 另外,本说明书与电子格式的序列列表一起提出申请,该电子格式中记载的序列列表的信息通过参照将其整体纳入本说明书中。

[0036] 只要没有其他指示,以下的用语具有以下的含义。

[0037] “MRLN”是指被称为肌调素的寡核苷酸或蛋白。MRLN例如包含从MRLN基因转录的各种剪切突变体、单碱基替换体(SNP)等序列突变体以及由它们翻译的突变体蛋白。

[0038] “核酸碱基”是指能够与其他核酸的碱基形成对的杂环部分。

[0039] “核酸碱基序列”是指构成寡核苷酸的连续的核酸碱基的顺序。

[0040] “核苷”是指将糖和核酸碱基连结而成的分子。在某种实施方式中,核苷与磷酸基连结。

[0041] “核苷酸”是指在核苷的糖部分上键合有磷酸基的分子。天然存在的核苷酸的糖部分为核糖或脱氧核糖,经由磷酸基通过磷酸二酯键共价键合。

[0042] “寡核苷酸”是指各核苷和各核苷间键相互独立地连结而成的核苷的聚合物。

[0043] “互补”是指针对第一核酸与第二核酸的核酸碱间形成对的能力。在某种实施方式中,腺嘌呤与胸苷或尿嘧啶互补。在某种实施方式中,胞嘧啶与鸟嘌呤互补。在某种实施方式中,5-甲基胞嘧啶与鸟嘌呤互补。

[0044] “完全互补(也称为互补性)”或“100%互补(也称为互补性)”是指第一核酸的核酸碱基序列的各核酸碱基全部在第二核酸的第二核酸碱基序列中具有互补的核酸碱基。在某种实施方式中,第一核酸为修饰寡核苷酸,靶核酸为第二核酸。

[0045] “修饰核苷”是指具有修饰糖和/或修饰核酸碱基的核苷。“修饰寡核苷酸”是指包含至少1个该修饰核苷和/或该修饰核苷间键的寡核苷酸。

[0046] “核苷间键”是指核苷间的化学键,“修饰核苷间键”是指源自天然存在的核苷间键(即3'-5'磷酸二酯核苷间键)的取代或任意的变化。例如,有硫代磷酸酯核苷间键,但并不限于此。“硫代磷酸酯核苷间键”是指通过用硫原子替换非交联氧原子中的1个而修饰有磷酸二酯键的核苷间的键。

[0047] “修饰碱基”是指除腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸苷或尿嘧啶以外的任意的核酸碱基。例如有5-甲基胞嘧啶,但并不限于此。“非修饰核酸碱基”是指嘌呤碱基的腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)、以及嘧啶碱基的胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。

[0048] “糖”或“糖部分”是指天然糖部分或修饰糖部分。“修饰糖”是指源自天然的糖的取代或变化,例如可举出取代糖部分及二环式糖。在此,“取代糖部分”是指RNA或DNA的除天然糖以外的呋喃基,“二环式糖”是指通过存在于同一环上的2个不同碳原子的交联而修饰的

呋喃基。“二环式核酸”是指核苷或核苷酸的呋喃糖部分包含“二环式糖”的核苷或核苷酸。

[0049] “siRNA”是小干扰RNA (small interfering RNA) 的简称,是由用于通过RNA干扰 (RNAi) 进行的基因沉默的20~30个碱基左右的碱基对构成的双链RNA。另外,shRNA是短发夹RNA (short hairpin RNA) 的简称,是用于通过RNA干扰进行的基因沉默的发夹型的RNA序列。

[0050] “抗体”是与特定抗原特异性结合的多肽,包含多克隆抗体、单克隆抗体及抗原结合片段。

[0051] “化合物”是指C、H、O、N、S等原子通过化学键产生的全部物质,包含低分子化合物、肽、糖、高分子化合物等。

[0052] “给药”是指将药剂给予动物,可举出由医疗专家进行的给药和自给药,但并不限定于这些。

[0053] “有效量”是指足以在需要药剂的个体中实现所期望的生理回转的本发明的修饰寡核苷酸的量。有效量可以根据所处置的个体的健康和身体状态、所处置的个体的分类组、组合物的药剂、个体的医学状态的评价以及其他相关因素而在个体之间变动。

[0054] “预防”是指在几分钟至无期限的期间,使疾病、障碍或不优选的健康状态、或与该疾病、障碍或不优选的健康状态相关的1个以上的症状、发病或发生延缓或防范于未然。预防是指降低发生疾病、障碍或不优选的健康状态的危险性。

[0055] “治疗”是指减轻、改善或排除疾病、障碍或不优选的健康状态、或与该疾病、障碍或不优选的健康状态相关的1个以上的症状、或使其进展延缓,或者部分消除或根除该疾病、障碍、或不优选的健康状态本身的1个或1个以上的原因。

[0056] (具体实施方式)

[0057] 以下所示的某种具体的实施方式并不限定于这些,本发明提供肌疾病的预防或治疗剂(以下,有时称为本发明的药剂),其以肌调素抑制物质为有效成分。

[0058] <肌调素>

[0059] 肌调素(MRLN)是在骨骼肌中表达,调节肌质网内钙量,具体而言,是抑制肌质网内的钙摄入的微肽。作为MRLN,只要是在人或小鼠等哺乳动物中表达的MRLN即可,但优选人的MRLN。作为小鼠MRLN基因的核酸碱基序列,例如可举出在NCBI GenBank中以保藏编号NM_001304739.1登记的核酸碱基序列(序列号1),作为由该核酸碱基序列编码的小鼠MRLN蛋白的氨基酸序列,可举出序列号2。作为人MRLN基因的核酸碱基序列,例如可举出在NCBI GenBank中以保藏编号NM_001304731.2登记的核酸碱基序列(序列号3),作为由该核酸碱基序列编码的人MRLN蛋白的氨基酸序列,可举出序列号4。另外,在表示mRNA的核酸碱基序列时,在序列编号1和3中,T替换地读为U。

[0060] 但是,MRLN基因的核酸碱基序列有时因个体不同而在序列上具有差异,因此,并不限定于上述序列,只要编码调节肌质网内钙、具体而言抑制肌质网内钙的摄入的微肽即可,例如小鼠MRLN的核酸碱基序列可以是与序列号1具有90%、95%或98%以上的同源性的核酸碱基序列,人MRLN基因的核酸碱基序列可以是与序列号3具有90%、95%或98%以上的同源性的核酸碱基序列。另外,只要具有调节肌质网内钙、具体而言抑制肌质网内钙的摄入的功能即可,小鼠MRLN蛋白的氨基酸序列可以是与序列号2具有90%、95%或98%以上的同源性的氨基酸序列,人MRLN蛋白的氨基酸序列可以是与序列号4具有90%、95%或98%以上的

同源性的氨基酸序列。

[0061] <MRLN抑制物质>

[0062] MRLN抑制物质包括抑制MRLN功能的物质和抑制表达的物质。

[0063] 作为MRLN的功能,例如可举出抑制钙向肌质网的摄入的功能。

[0064] 因此,MRLN抑制物质是能够增加钙向肌质网的摄入的物质。其中,MRLN抑制物质的增加钙向肌质网的摄入的效果有可能是基于SERCA1活性抑制解除。

[0065] 钙向肌质网的摄入的增加可以在后述的系统中进行测定,本发明的药剂优选将钙向肌质网的摄入与不添加该药剂时或添加阴性对照时相比增加到1.1倍以上,优选增加到1.2倍以上,更优选增加到1.5倍以上。

[0066] 本发明的药剂可以是直接作用于MRLN而抑制上述功能的药剂,也可以是间接作用于MRLN而抑制上述功能的药剂。

[0067] 另一方面,MRLN的表达抑制是指降低MRLN的pre-mRNA、mRNA和蛋白中的任意1种以上的量。

[0068] MRLN的表达抑制可以通过后述的表达测定系统进行评价,本发明的药剂优选使MRLN的pre-mRNA、mRNA和/或蛋白的量与不添加该药剂时或添加阴性对照时相比降低至70%以下,优选降低至50%以下,优选降低至30%以下。

[0069] MRLN抑制物质只要是能够抑制MRLN的功能和/或表达的物质,则其种类没有特别限制,可举出核酸(寡核苷酸)、抗体、化合物等。

[0070] 作为属于MRLN抑制物质的核酸,具体而言,例如可举出针对MRLN的反义寡核苷酸、siRNA、shRNA或表达它们的载体,优选使用针对MRLN的反义寡核苷酸。

[0071] 作为针对MRLN的反义寡核苷酸,优选为包含由10~50个碱基、优选15~30个碱基构成、且与MRLN的核酸碱基序列(例如,与序列号1、3或它们具有90%、95%或98%以上的同源性的核酸碱基序列)的等长部分为100%互补的连续的至少8个碱基的核酸碱基序列(以下称为“MRLN互补核酸碱基序列”)的反义寡核苷酸。这里所说的等长部分是指,反义寡核苷酸的核酸碱基序列与MRLN的核酸碱基序列具有互补性的部分。

[0072] 针对MRLN的反义寡核苷酸只要是具有包含上述MRLN互补核酸碱基序列的全长10~50个碱基的核酸碱基序列的寡核苷酸即可,可以在除MRLN互补核酸碱基序列以外的部分具有1个或多个失配核酸碱基、附加碱基,作为全长,可以与MRLN的核酸碱基序列(例如,序列号1、3)的等长部分具有85%以上、90%以上、优选95%以上的互补性。

[0073] 另外,MRLN的核酸碱基序列与属于MRLN抑制物质的反义寡核苷酸的互补性百分比例如可以使用本技术领域已知的BLAST程序(basic local alignment search tools,基于局部比对算法的搜索工具)、PowerBLAST程序(Altschul et al., J.Mol.Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)、Genetyx软件(GENETYX CORPORATION)的默认设定,依照惯例来确定。同源性百分比、序列同源性或互补性例如可以通过Cap程序(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.),使用Smith and Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)的算法的默认设定、Genetyx软件(GENETYX CORPORATION)的默认设定来确定。

[0074] 针对MRLN的反义寡核苷酸可以为修饰寡核苷酸。作为修饰寡核苷酸,可以是包含

5-甲基胞嘧啶这样的修饰碱基的修饰寡核苷酸,也可以是构成寡核苷酸的至少1个核苷包含修饰糖的修饰寡核苷酸。另外,也可以是核苷间键被修饰的修饰寡核苷酸。

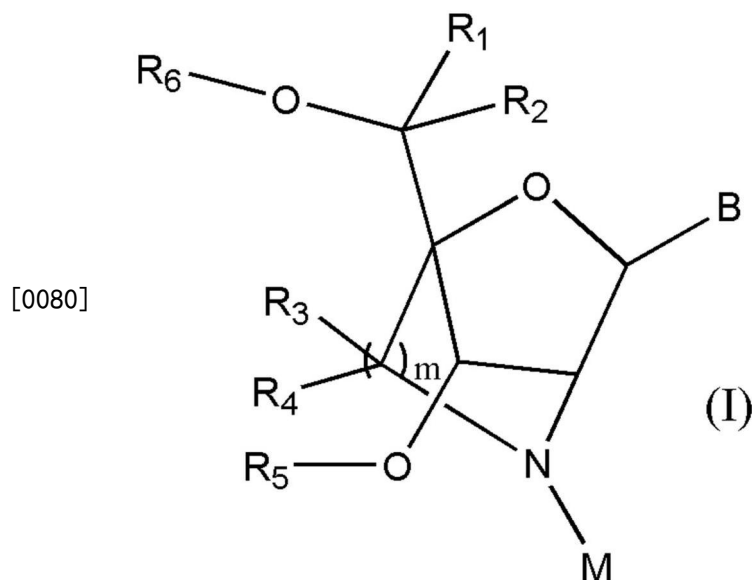
[0075] 在此,修饰糖是指糖部分被修饰的糖,含有1个以上该修饰糖的修饰寡核苷酸具有核酸酶稳定性的增强、结合亲和性的增大等有利的特征。修饰糖中的至少一个优选具有二环式糖或取代糖部分。

[0076] 作为具有修饰糖的核苷的例子,可举出5'-乙炔基、5'-甲基(R或S)、4'-S、2'-F、2'-OCH₃、2'-OCH₂CH₃、2'-OCH₂CH₂F及2'-O(CH₂)₂OCH₃取代基的核苷。2'位的取代基还可以选自烯丙基、氨基、叠氮基、硫、0-烯丙基、0-C₁~C₁₀烷基、OCF₃、OCH₂F、O(CH₂)₂SCH₃、O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n)、O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n)和O-CH₂-C(=O)-N(R₁)-(CH₂)₂-N(R_m)(R_n) (式中,各R₁、R_m和R_n独立地为H或者取代或未取代的C₁~C₁₀烷基)。

[0077] 作为具有二环式糖的核苷的例子,可举出包含4'与2'的核糖环原子间的交联的核苷。在某种实施方式中,本说明书中提供的寡核苷酸包括交联包含以下的式中的1个的、具有1个或多个二环式糖的核苷:4'-(CH₂)-O-2'(LNA);4'-(CH₂)-S-2';4'-(CH₂)₂-O-2'(ENA);4'-CH(CH₃)-O-2'及4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2'(及它们的类似物。参照美国专利7,399,845号);4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2'(及它们的类似物。参照W02009/006478号);4'-CH₂-N(OCH₃)-2'(及它们的类似物。参照W02008/150729号);4'-CH₂-O-N(CH₃)-2'(参照US2004-0171570号);4'-CH₂-N(R)-O-2'(式中,R为H、C₁~C₁₂烷基或保护基)(参照美国专利7,427,672号);4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2'(参照Chattopadhyaya et al., J.Org.Chem., 2009, 74, 118-134);以及4'-CH₂-C(=CH₂)-2'(及它们的类似物。参照W02008/154401号)。

[0078] 在某种实施方式中,含有二环式糖的核苷可以是W02020/100826中公开的包含交联型人工核酸ALNA的糖部分的核苷,例如可以是包含下述通式(I)所示的ALNA[Ms]的糖部分的核苷。

[0079] [化学式1]



[0081] [式中],

[0082] B为核酸碱基;

[0083] R₁、R₂、R₃和R₄各自独立地为氢原子、或可以被1个以上的取代基取代的C₁₋₆烷基;

[0084] R₅和R₆各自独立地为氢原子、羟基的保护基、可被取代的磷酸基、与磷部分或支撑

体键合的共价键等；

[0085] m为1或2；

[0086] M为被可被1个以上的取代基取代的甲基取代的磺酰基。ALNA[Ms]的典型的具体例是M为被未取代的甲基取代的磺酰基的核苷。

[0087] 在某种实施方式中，作为MRLN抑制物质的反义寡核苷酸具有至少1个核酸碱基为胞嘧啶的核酸碱基序列。在某种实施方式中，至少1个胞嘧啶为修饰核酸碱基的5-甲基胞嘧啶。

[0088] RNA和DNA的天然存在的核苷间键为3'-5'磷酸二酯键。具有1个或多个修饰的、即天然不存在的核苷间键的寡核苷酸例如出于细胞摄入的增强、对靶核酸的亲亲和性的增强以及核酸酶存在下的稳定性的增大等特性的理由，比具有天然存在的核苷间键的寡核苷酸更优选。

[0089] 具有修饰核苷间键的寡核苷酸包括保持磷原子的核苷间键及不具有磷原子的核苷间键。作为代表性的含磷的核苷间键，并不限于这些，可举出磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、磷酰胺及硫代磷酸酯中的1种以上。含磷和不含磷键的制备方法是公知的。

[0090] 在某种实施方式中，作为MRLN抑制物质的反义寡核苷酸的核苷间键全部为硫代磷酸酯核苷间键。

[0091] 作为MRLN抑制物质的反义寡核苷酸可以通过常规方法合成，例如可以通过市售的核酸合成装置容易地合成。另外，反义寡核苷酸中可以包含的核苷的糖修饰的ALNA[Ms]可以通过WO2020/100826中公开的方法来合成。

[0092] 针对MRLN的siRNA是具有与MRLN的mRNA的部分序列(通常为20个碱基以上、优选为21个碱基以上、且通常为30个碱基以下、优选为27个碱基以下、更优选为23个碱基以下)互补的序列的双链寡聚RNA，只要是能够通过特异性地识别并切断该转录产物来抑制MRLN的表达的siRNA就没有特别限制。本领域技术人员可以根据序列号1中记载的小鼠MRLN基因的核酸碱基序列或序列号3中记载的人MRLN基因的核酸碱基序列，确定可用于抑制人或小鼠的MRLN表达的siRNA的正义链和反义链的序列。siRNA的合成可以通过本身公知的方法进行，例如可以通过DNA/RNA化学合成或酶合成分别合成正义链和反义链，通过使它们退火来合成。

[0093] 作为表达载体，可以使用该技术领域中使用的任意的载体，例如除了可举出大肠杆菌来源的质粒(例如pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草杆菌来源的质粒(例如pUB110, pTP5, pC194)、酵母来源的质粒(例如pSH19, pSH15)、λ噬菌体等细菌、逆转录病毒、轮状病毒、杆状病毒等动物病毒等以外，还可举出pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo等。

[0094] 针对所述MRLN的抗体是与MRLN特异性结合的抗体，优选使用通过结合而抑制MRLN的功能的拮抗剂抗体。

[0095] 本说明书中所说的“抗体”包括多克隆抗体、单克隆抗体等天然型抗体、可使用基因重组技术制造的嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体、可使用人抗体产生转基因动物等制造的人抗体、通过噬菌体展示制作的抗体以及它们的结合性片段。

[0096] 结合性片段是指上述抗体的一部分区域，具体而言，例如可举出F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv(variable fragment of antibody, 抗体可变片段)、sFv、dsFv(disulphide stabilized Fv, 二硫键稳定性Fv)、dAb(single domain antibody, 单域抗体)等

(Exp. Opin. Ther. Patents, Vol. 6, No. 5, P. 441-456, 1996)。

[0097] 抗体的类别没有特别限定,也包含具有IgG、IgM、IgA、IgD或IgE等中的任意同型物的抗体。优选IgG或IgM,若考虑精制的容易性等,则更优选为IgG。

[0098] 多克隆抗体例如可以如下制造。即,通过将免疫原注射到小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、山羊、马或兔等动物的皮下内、肌肉内、静脉内、脚垫内或腹腔内1~数次来实施免疫致敏。通常,从初次免疫起每隔约1~14天进行1~5次免疫,在最终免疫起的约1~5天后从经免疫致敏的该哺乳动物获取血清。可以将血清直接用作多克隆抗体,但优选通过超滤、硫酸铵分级、球蛋白沉淀法、己酸法、辛酸法、离子交换色谱法(DEAE或DE52等)、抗免疫球蛋白柱或蛋白A/G柱、使用了交联有免疫原的柱等的亲和柱色谱法进行分离和/或精制。

[0099] 单克隆抗体例如可以如下制造。即,通过从被给药至了免疫原的小鼠、大鼠或仓鼠等免疫致敏动物得到的抗体产生细胞和没有自抗体产生能力的骨髓瘤系细胞(骨髓瘤细胞)制备杂交瘤,将该杂交瘤克隆化,选择产生对哺乳动物的免疫中使用的免疫原显示特异性亲和性的单克隆抗体的克隆来制造。

[0100] 分泌单克隆抗体的杂交瘤(融合细胞)的制备可以按照Köhler和Milstein等的方法(Nature, Vol. 256, P. 495-497, 1975)以及基于其的修饰方法来进行。作为用于细胞融合的骨髓瘤细胞,例如可以使用小鼠来源的骨髓瘤p3/X63-Ag8.653(653; ATCC No. CRL1580)、p3/NSI/1-Ag4-1(NS-1)、p3/X63-Ag8.U1(p3U1)、SP2/0-Ag14(Sp2/0、Sp2)、PAI、F0或BW5147、大鼠来源骨髓瘤210RCY3-Ag.2.3.、人来源骨髓瘤U-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11或CEM-T15。

[0101] 产生单克隆抗体的杂交瘤克隆的筛选可以通过例如ELISA等酶免疫测定法测定将杂交瘤在例如微量滴定板中培养而观察到增殖的孔的培养上清液对上述免疫致敏中使用的免疫原的反应性来进行。单克隆抗体优选与上述多克隆抗体同样地分离和/或纯化。

[0102] 嵌合抗体例如可以参考“实验医学(临时增刊号), Vol. 6, No. 10, 1988”、日本特公平3-73280号公报等,人源化抗体可以参考例如日本特表平4-506458号公报、日本特开昭62-296890号公报等,人抗体可以参考例如“Nature Genetics, Vol. 15, P. 146-156, 1997”、“Nature Genetics, Vol. 7, P. 13-21, 1994”、日本特表平4-504365号公报、国际申请公开W094/25585号公报、“Nature, Vol. 368, P. 856-859, 1994”、日本特表平6-500233号公报等来制造。

[0103] 利用噬菌体展示进行的抗体制作通过从为抗体筛选用制作的噬菌体文库中,例如通过生物淘选(biopanning)回收、浓缩对抗原具有亲和性的噬菌体,能够容易地得到Fab等抗体等。关于利用噬菌体展示进行的抗体制作,可参照“Nature, Vol. 348, P. 552-554, 1990”、“‘Phage display alaboratory manual’ In cold spring harbor laboratory press, 2001”、“Antibody Engineering-a Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1996”。

[0104] F(ab)₂和Fab'可以通过用属于蛋白水解酶的胃蛋白酶或木瓜蛋白酶对免疫球蛋白进行处理来分别制造。Fab可以通过与上述利用噬菌体展示进行的抗体制作方法同样地筛选Fab表达噬菌体文库来制造。

[0105] 作为本发明的药剂的有效成分的MRLN抑制物质也可以是抑制MRLN的功能、表达的化合物。化合物只要能够抑制MRLN的功能、表达,其结构没有限定,可以是低分子化合物、

肽、糖、高分子化合物等中的任意化合物。化合物可通过筛选得到。

[0106] <MRLN抑制物质的评价或筛选方法>

[0107] 作为评价或筛选(选拔)MRLN抑制物质的方法,只要是能够验证MRLN在细胞内的表达抑制或功能抑制的方法,则可以是任意的,具体而言,例如可以使用以下所示的体外(in vitro)、以及体内(in vivo)的验证方法。

[0108] 在MRLN抑制物质的评价或筛选中,在将MRLN表达抑制作为指标的情况下,可举出在表达MRLN的细胞或组织中添加抑制物质或其候补物质,测定MRLN的mRNA或蛋白的表达量,与未添加该抑制物质或候补物质时或添加阴性对照时进行比较的方法。

[0109] 作为表达MRLN的细胞,可举出成肌细胞、肌管细胞,作为培养肌细胞的一例,可举出实施例中使用的C2C12细胞。也可以使用外来导入有MRLN基因的细胞。

[0110] 另外,可以对非人动物给药MRLN抑制物质,测定该动物的肌肉组织中的MRLN的表达量,也可以对分离的肌肉组织给药MRLN抑制物质,测定该肌肉组织中的MRLN的表达量。

[0111] 通过在这样的体外或体内的MRLN表达量测定系统中测定MRLN表达量,能够对MRLN抑制物质进行筛选或评价。

[0112] 需要说明的是,使MRLN抑制物质与MRLN表达细胞接触的方法也没有特别限制,在MRLN抑制物质为核酸的情况下,通常可以使用用于将核酸导入细胞内的方法、例如脂转染法、电穿孔法、Gymnosis法等。

[0113] MRLN在细胞内的mRNA表达量可以通过本技术领域已知的各种方法进行测定。具体而言,可举出Northern blot分析、竞争性聚合酶链反应(PCR)或定量性实时PCR等。在分离mRNA时,可以使用本技术领域中公知的方法,例如按照制造商的推荐方案使用SuperPrep Cell Lysis&RT Kit for qPCR(Toyobo)、RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit(Qiagen)等。如此可测定MRLN的表达量。

[0114] MRLN在细胞内的蛋白的表达量可以通过本技术领域已知的各种方法进行分析。具体而言,例如可举出免疫沉降法、Western Blot分析(*免疫印迹法)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、定量性蛋白分析、蛋白活性分析(例如胱天蛋白酶活性分析)、免疫组化法、免疫细胞化学法或荧光活化细胞分选(FACS)等。

[0115] 在MRLN抑制物质的评价或筛选中,在以MRLN的功能抑制为指标对MRLN抑制物质进行筛选或评价的情况下,例如可以以钙向肌质网的摄入和钙从肌质网的释放为指标。作为一例,可以在对肌细胞添加雷诺丁(ryanodine)受体激动剂进行刺激、测定从肌质网释放的钙量的系统中,通过使MRLN抑制物质或其候补物质存在,研究其影响,对MRLN抑制物质进行筛选或评价。就肌病而言,发生钙从肌质网的漏出,肌质网内的钙量降低,由雷诺丁受体激动剂刺激引起的钙从肌质网的释放量降低,结果由于存在MRLN抑制物质,肌质网内的钙量恢复,钙从肌质网的释放量增加(恢复),因此可以以该钙释放的增加(恢复)为指标对MRLN抑制物质进行筛选或评价。

[0116] 另外,MRLN抑制物质也可以使用肌病动物模型进行评价或筛选。作为肌病动物模型,例如可以使用抗肌营养不良蛋白(dystrophin)的缺损小鼠或肌聚糖的缺损小鼠。

[0117] 例如,这些缺损小鼠的血中肌酸激酶量与正常小鼠相比增加,结果通过给药MRLN抑制物质,血中肌酸激酶量降低,因此可以以该血中肌酸激酶量的降低量为指标对MRLN抑制物质进行评价或筛选。

[0118] 另外,也可以以肌病动物模型中的肌纤维的崩解、细胞死亡等病理状态改善为指标来对MRLN抑制物质进行评价或筛选。

[0119] 通过本发明的筛选方法得到的MRLN抑制物质,由于抑制肌病的发生或进展,可以用作肌病的预防和/或治疗药。即,本发明提供一种肌病的预防和/或治疗药的筛选方法,其包含通过上述方法筛选MRLN抑制物质的工序。该筛选方法优选包含对候补物质的MRLN表达抑制能力和钙从肌质网的释放等MRLN功能抑制能力这两者进行评价的工序。

[0120] <利用MRLN抑制物质进行的肌病治疗>

[0121] 在本发明中,可以利用MRLN抑制物质治疗或预防肌病。

[0122] 作为肌病,例如可举出肌营养不良、包涵体肌炎、肌萎缩侧索硬化症、废用性肌萎缩、肌减少症,但并不特别限定于这些。其中,优选肌营养不良。肌营养不良代表性地可举出抗肌营养不良蛋白-糖蛋白复合物(DGC)的构成因子具有突变或缺损的肌营养不良,例如可举出杜氏肌营养不良、贝克肌营养不良、肢带型肌营养不良(肌聚糖病等)。其中,肌聚糖病包括LGMD2C、LGMD2D、LGMD2E、LGMD2F。

[0123] 肌病优选为伴随肌细胞的细胞质中的钙异常流入的疾病。

[0124] MRLN抑制物质通过抑制MRLN的功能或表达而具有肌质网钙摄入增加功能,由此使细胞质内的钙量降低。

[0125] 因此,对于伴随钙向细胞质内异常流入的上述那样的肌病的治疗、预防是有效的。

[0126] 特别是启示了肌营养不良的病理状态存在如下2种机理:1)由于DGC的缺损,膜的透过性亢进,由此细胞质内钙量增加,引起细胞死亡;2)由于DGC的缺损,nNOS(neuronal nitric oxide synthase,神经元型一氧化氮合酶)减少,细胞质中iNOS(inducible nitric oxide synthase,诱导型一氧化氮合酶)增加,雷诺丁受体被亚硝基化,肌质网内钙减少,肌收缩降低。

[0127] MRLN抑制剂通过减少细胞质内钙量、且增加肌质网内的钙摄入,抑制肌细胞死亡,维持、恢复肌收缩力,对肌病发挥治疗效果和/或预防效果。

[0128] 即,本发明的药剂可以是抑制肌细胞死亡的药剂或维持、恢复肌收缩力的药剂。

[0129] 因此,本发明提供:肌病的治疗或预防剂或者用于治疗或预防肌病的药物组合物,其将MRLN抑制物质作为有效成分;肌病的治疗或预防方法,其包含将有效量的MRLN抑制物质给药至需要治疗或预防肌病的对象的工序;用于治疗或预防肌病的MRLN抑制物质;MRLN抑制物质在制造肌病的治疗或预防用药物中的用途。

[0130] 本发明的药剂可以通过将MRLN抑制物质直接或配合药理学上可接受的载体来制备。作为药理学上可接受的载体,可使用常用的各种有机或无机载体物质作为制剂原料,作为固体制剂中的赋形剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂;液态制剂中的溶剂、溶解辅助剂、悬浮剂、等渗剂、缓冲剂、无痛化剂等进行配合。另外,根据需要,还可以使用防腐剂、抗氧化剂、着色剂、甜味剂等制剂添加物。

[0131] 另外,MRLN抑制物质为核酸时,本发明的药剂可以含有核酸导入用试剂。作为该核酸导入用试剂,可以使用脂质体、Lipofectin、Lipofectamine、DOGS(Transfectam)、DOPE、DOTAP、DDAB、DHDEAB、HDEAB、聚凝胺、或聚(乙烯亚胺)(PEI)等阳离子性脂质等。

[0132] 本发明的药剂可以经口或非经口给药至需要治疗或预防肌病的对象。作为非经口给药,例如可举出皮下给药、静脉内给药、肌内给药、动脉内给药、腹腔内给药等。给药可以

是持续的或长期的,也可以是短期或间断的。

[0133] 作为经口给药时的剂型,例如可举出片剂(包括糖衣片、膜包衣片)、丸剂、颗粒剂、散剂、胶囊剂(包括软胶囊剂、微胶囊剂)、糖浆剂、乳剂、悬浮剂等。

[0134] 另一方面,作为非经口给药时的剂型,例如可举出注射剂、注入剂、点滴剂、栓剂等。另外,与适当的基剂(例如丁酸的聚合物、乙醇酸的聚合物、丁酸-乙醇酸的共聚物、丁酸的聚合物与乙醇酸的聚合物的混合物、聚甘油脂肪酸酯等)组合而制成缓释制剂也是有效的。

[0135] 作为将MRLN抑制物质制成上述剂型的方法,可以应用本领域中通常使用的公知的制造方法。另外,在制成上述剂型的情况下,根据需要,可以适当含有适量的在制成其剂型时制剂领域中通常使用的赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂等载体、甜味剂、表面活性剂、悬浮剂、乳化剂等各种制剂添加物等。

[0136] 例如,作为用于非经口给药的药剂,优选使用注射剂。作为注射剂,除了静脉注射剂以外,还包括皮下注射剂、皮内注射剂、肌肉注射剂、点滴注射剂等。该注射剂按照自身公知的方法,例如通过将上述反义寡核苷酸等MRLN抑制物质溶解、悬浮或乳化于通常注射剂中使用的无菌的水性或油性液体中来制备。作为注射用水性液,可以使用例如含有磷酸缓冲盐水、生理盐水、葡萄糖、或其他辅助药的等渗液等,可以与适当的溶解辅助剂、例如醇(例如乙醇)、多元醇(例如丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂(例如聚山梨糖醇80、HCO-50(polyoxyethylene(50mol)adduct of hydrogenated castor oil,氢化蓖麻油聚氧乙烯醚(50mol)加合物)等并用。另外,还可以含有缓冲剂、pH调节剂、等渗剂、无痛化剂、防腐剂、稳定剂等。该组合物可以通过公知的方法制造。

[0137] 本发明的药剂中含有的有效成分即MRLN抑制物质的比例可以在能够起到所期望的效果的范围内适当设定,通常为0.01~100重量%,优选为0.1~99.9重量%,更优选为0.5~99.5重量%。

[0138] 含有MRLN抑制物质作为有效成分的本发明的药剂因为稳定且低毒性而可以安全地使用。其1天的给药量根据有效成分的种类、给药对象的体重、年龄、症状等的不同不能一概而论,1次每1kg体重可以在0.1ng~1000mg的范围、优选在1ng~100mg/kg/周的范围进行选择。

[0139] 本发明的药剂的给药次数没有特别限定,通常每1月为1~10次左右。另外,给药期间可以为数天~1周左右的短期服用,也可以为数周~数月左右的长期服用,也可以为数年~数十年。需要说明的是,在隔开相当程度的间隔所述疾病的症状复发的情况下,可以再次给药本发明的药剂。

[0140] 作为本发明的药剂的给药对象,是需要治疗或预防肌病的对象,可举出小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、猫、狗、牛、马、山羊、猴、人等哺乳动物,优选为灵长类,特别优选为人。

[0141] 通过非限定公开和参照的引入

[0142] 本说明书中记载的某种化合物、组合物及方法按照某种实施方式进行了特异性的记载,但以下的实施例只不过是例示本说明书中记载的化合物的作用,并不是为了对其进行限定。本申请中记载的参考文献分别通过参照将其整体纳入本说明书中。

[0143] 实施例

[0144] 以下,举出实施例对本发明进行更具体的说明,但本发明并不限于这些实施例。

[0145] 实施例1

[0146] 修饰反义寡核苷酸的制备

[0147] 修饰反义寡核苷酸是按照通常的寡聚核酸的固相合成法由株式会社NIPPON GENE公司/株式会社NIPPON GENE MATERIAL公司合成和精制的。其中,化合物的鉴定利用高速液相色谱质谱仪进行。

[0148] 合成的MRLN反义寡核苷酸是由与小鼠MRLN的核酸碱基序列(序列号1)的第409~424位互补的16个碱基构成的修饰反义寡核苷酸。

[0149] 实施例2

[0150] 体外MRLN敲减活性试验(Gymnosis法)

[0151] 将C2C12细胞接种于384平板,用CO₂培养箱培养。3小时后,添加实施例1中合成的MRLN反义寡核苷酸,用CO₂培养箱培养。约72小时后,从细胞中除去含有MRLN反义寡核苷酸的培养基,用磷酸缓冲生理盐水(Phosphate-buffered saline:PBS)进行清洗。其后,使用SuperPrep Cell Lysis&RT Kit for qPCR(Toyobo)进行含有RNA的细胞裂解物的制备、由裂解物进行的逆转录反应,进行模板cDNA的合成。使用该cDNA进行实时PCR,对MRLN的mRNA表达量进行定量。关于MRLN反义寡核苷酸的处理浓度,使最高浓度为1000nM,使用以公比3的4浓度稀释而得到的物质,计算IC₅₀作为MRLN敲减活性。进行3次试验,求出IC₅₀的平均值,结果为119.9nM。如此显示了MRLN反义寡核苷酸抑制MRLN表达。

[0152] 实施例3

[0153] 体内MRLN敲减活性试验

[0154] 将实施例1中合成的MRLN反义寡核苷酸用生理盐水调整至10和50mg/5mL/kg,尾静脉内给药至7周龄的C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J(mdx)小鼠(雄性、Jackson Laboratory)。mdx小鼠是作为DMD的小鼠模型最常使用的小鼠。约72小时后,在异氟烷(Pfizer)麻醉下,从腹部大静脉进行全采血,致死。致死后,采集胫骨前肌,浸渍于RNAlater Soln.(invitrogen)。在组织中加入RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit(Qiagen)的RLT缓冲液,使用Multi-Beads Shocker进行破碎,按照试剂盒记载的方案将RNA精制。对RNA 200ng进行逆转录,使用得到的cDNA进行定量PCR。关于MRLN反义寡核苷酸的敲减活性,用相对于载体(vehicle)组的相对值来表示相对于MRLN的18S rRNA的量比。将结果示于图1。显示了MRLN反义寡核苷酸抑制肌肉中的MRLN表达。

[0155] 实施例4

[0156] 针对肌营养不良小鼠模型的MRLN反义寡核苷酸给药试验

[0157] 将实施例1中合成的MRLN反义寡核苷酸用生理盐水调整成适当的浓度,尾静脉内给药至mdx小鼠、肌聚糖β(sarcoglycanβ:Sgcb)敲除小鼠、肌聚糖α(Sgca)敲除小鼠、肌聚糖γ(Sgcg)敲除小鼠、肌聚糖δ(Sgcd)敲除小鼠或抗肌营养不良蛋白/肌营养相关蛋白(utrophin)双敲除小鼠。设定进行适当给药次数的组,从最终给药的数天至1周后,在麻醉下从腹部大静脉进行全采血,致死。使用所采集的血浆或血清进行肌酸激酶(CK)的测定。致死后,采集骨骼肌组织的一部分用于病理分析,用10%中性缓冲福尔马林液浸渍固定。采集骨骼肌组织的一部分用于基因分析,浸渍于RNAlater Soln.(invitrogen)。用于基因分析的RNA提取是在组织中加入RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit(Qiagen)的RLT缓冲液后,使用Multi-Beads Shocker进行破碎,按照试剂盒记载的方案进行的。对RNA 200ng进行逆转

录,使用得到的cDNA进行定量PCR。用福尔马林固定后的骨骼肌组织制作石蜡切片,通过实施基于IgG抗体(Anti-IgG(H+L) Mouse, Goat-Poly Biotin, Vector Laboratories)的免疫染色来制作组织标本。各组织标本使用Aperio AT2(Leica Biosystems)进行拍摄。使用该数字图像,通过图像分析软件“HALO”的Area Quantification Module对IgG免疫染色的阳性面积进行定量分析,计算出单位整体面积的阳性面积的比率(%)。将IgG免疫染色的阳性区域作为细胞的坏死纤维的指标。通过MRLN反义寡核苷酸给药,确认MRLN基因的表达抑制、血浆或血清中CK的降低、以及骨骼肌病理图像的改善。

[0158] 具体而言,MRLN的表达量比和CK的值的分析如下进行。

[0159] 将实施例1中合成的MRLN反义寡核苷酸用生理盐水调整至3和10mg/5mL/kg,尾静脉内给药至8周龄的C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J(mdx)小鼠(雄性、Jackson Laboratory)。每周1次、2次给药,在最终给药的1周后,在异氟烷((Pfizer株式会社)麻醉下,从腹部大静脉进行全采血,致死。另外,将上述MRLN反义寡核苷酸用生理盐水调整至10和50mg/5mL/kg,尾静脉内给药至15周龄的肌聚糖 β (sarcoglycan β :Sgcb)敲除小鼠。Sgcb敲除小鼠是肌聚糖病的小鼠模型,通过使Sgcb基因的Exon2缺损来制作。给药3天后,在七氟烷(丸石制药)麻醉下,从腹部大静脉进行全采血,致死。致死后,采取胫骨前肌,浸渍于RNAlater Soln.(invitrogen)。在组织中加入RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit(Qiagen)的RLT缓冲液,使用Multi-Beads Shocker进行破碎,按照试剂盒记载的方案将RNA精制。对RNA 200ng进行逆转录,使用得到的cDNA进行定量PCR。使用所采集的血浆,进行肌酸激酶(CK)的测定。将mdx小鼠的结果示于图2,将Sgcb敲除小鼠的结果示于图3。MRLN反义寡核苷酸在无论哪种小鼠模型都在抑制MRLN表达的同时使CK降低。

[0160] 实施例5

[0161] 使用了肌营养不良患者来源的细胞的细胞内钙测定试验

[0162] 将DMD和肌聚糖病(LGMD2E)患者来源的成肌细胞接种于96孔平板或384孔平板,用CO₂培养箱培养。培养期间中,细胞在半铺满的状态下进行分化诱导。细胞分化为肌管后,用与MRLN反义寡核苷酸或siRNA或转染试剂(Lipofectamine RNAi Reagent等)混合的MRLN反义寡核苷酸或siRNA进行处置,进一步用CO₂培养箱培养。所用的MRLN反义寡核苷酸或siRNA为与人MRLN的核酸碱基序列(序列号3)的一部分互补的反义寡核苷酸或siRNA。在用MRLN反义寡核苷酸或siRNA处置数天后,从细胞中除去含MRLN反义寡核苷酸或siRNA的培养基,加入含有钙Dye的Loading Dye,在室温下进行培养。1小时后,进行基于FDSS的细胞内钙测定。在钙测定时,为了刺激细胞,使用雷诺丁受体激动剂等。通过MRLN反义寡核苷酸或siRNA处置,确认患者来源的细胞的肌质网内钙的增加。

[0163] 具体而言,细胞内钙测定如下进行。

[0164] 将DMD患者来源的细胞(NCNP Muscle Repository)接种于384孔平板,培养后,进行向肌管细胞的分化诱导。在分化为肌管后,将Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent(invitrogen)和作为针对人MRLN的核酸碱基序列(序列号3)的siRNA的RNAi Silencer Select siRNA(Thermo Fisher)、或作为阴性对照的Silencer Select Negative Control No.1siRNA(Thermo Fisher)混合后添加到细胞中,进一步用CO₂培养箱培养。培养7天后,从细胞中除去培养基,加入含有Cal-520(AAT Bioquest)的Loading Dye,在室温下培养1小时后,使用FDSS7000EX(滨松Photonics),在480nm的激发波长、540nm的检测波长

下,以1秒间隔测定10分钟的荧光值。测定1分钟的荧光值,作为基线。在测定开始1分钟后,以最终浓度达到1 mM的方式添加雷诺丁受体激动剂4-氯甲卡西酮(4-Chloromethcathinone,CMC:关东化学),再继续测定9分钟。计算出由细胞内钙浓度上升引起的荧光值的增大的最大值减去基线而得到的值,将该值作为肌质网内钙量进行分析。将结果示于图4。通过siRNA处置,钙从肌质网内的释放量增加,由此显示了通过基于siRNA的MRLN敲减,肌质网内钙量增加。

序 列 表

- <110> 田边三菱制药株式会社
- <120> 肌病的预防或治疗剂
- <130> A19106-0967
- <150> JP2020-122975
- <151> 2020-07-17
- <150> JP2021-025158
- <151> 2021-02-19
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 446
- <212> DNA
- <213> 小鼠 (Mus musculus)

- <220>
- <221> CDS
- <222> (231)..(368)

[0001] <400> 1

```

agtgagcttt tcgtccatgg agagcagatg gtgtttttga aaggaaggge ggccattccc      60
aggacttttg acttggtccc gttgcacccc tgaacagAAC caacgttgct aggagaacac      120
ctgtgccccA gcactttggt ccagcaaggG caggagagga gagctggaaa ctggtagagc      180
tgtgtacct  gctacctct gaggtctca gggagcagga gaatctgaac atg agt      236
                                     Met Ser
                                     1
ggc aag agc tgg gta ctg atc tct act act tcg ccc cag agc ctg gaa      284
Gly Lys Ser Trp Val Leu Ile Ser Thr Thr Ser Pro Gln Ser Leu Glu
                    5                10                15
gat gag att ctg gga cgg ctt ctg aaa att ctc ttc gtt ttg ttc gtt      332
Asp Glu Ile Leu Gly Arg Leu Leu Lys Ile Leu Phe Val Leu Phe Val
                20                25                30
gac tta atg tcc att atg tat gtc gtc ata acg tcc tagcaacctg      378
Asp Leu Met Ser Ile Met Tyr Val Val Ile Thr Ser
                35                40                45
actttcttta ctccgtgtgt aagtttcaaa ccaaatgCGA gcaaataaag atctacattt      438
taatctga      446
    
```

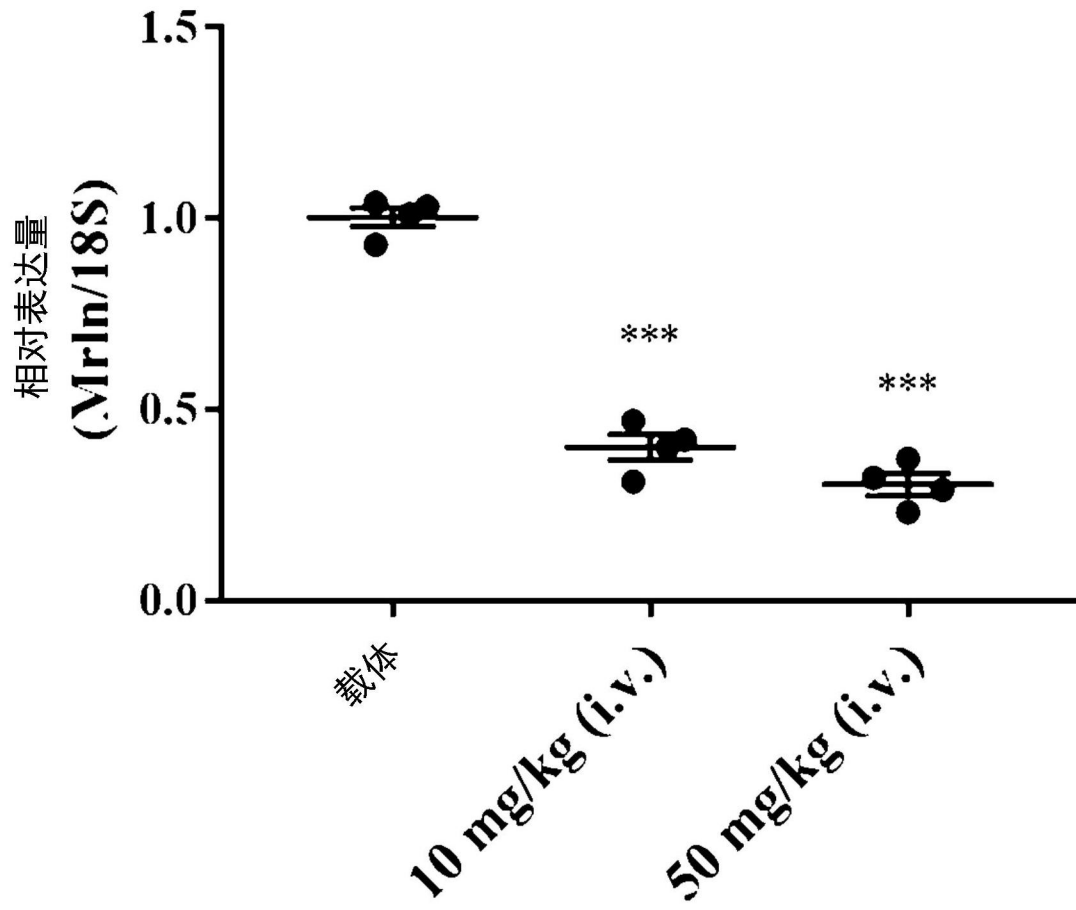
- <210> 2
- <211> 46
- <212> PRT
- <213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 2

```

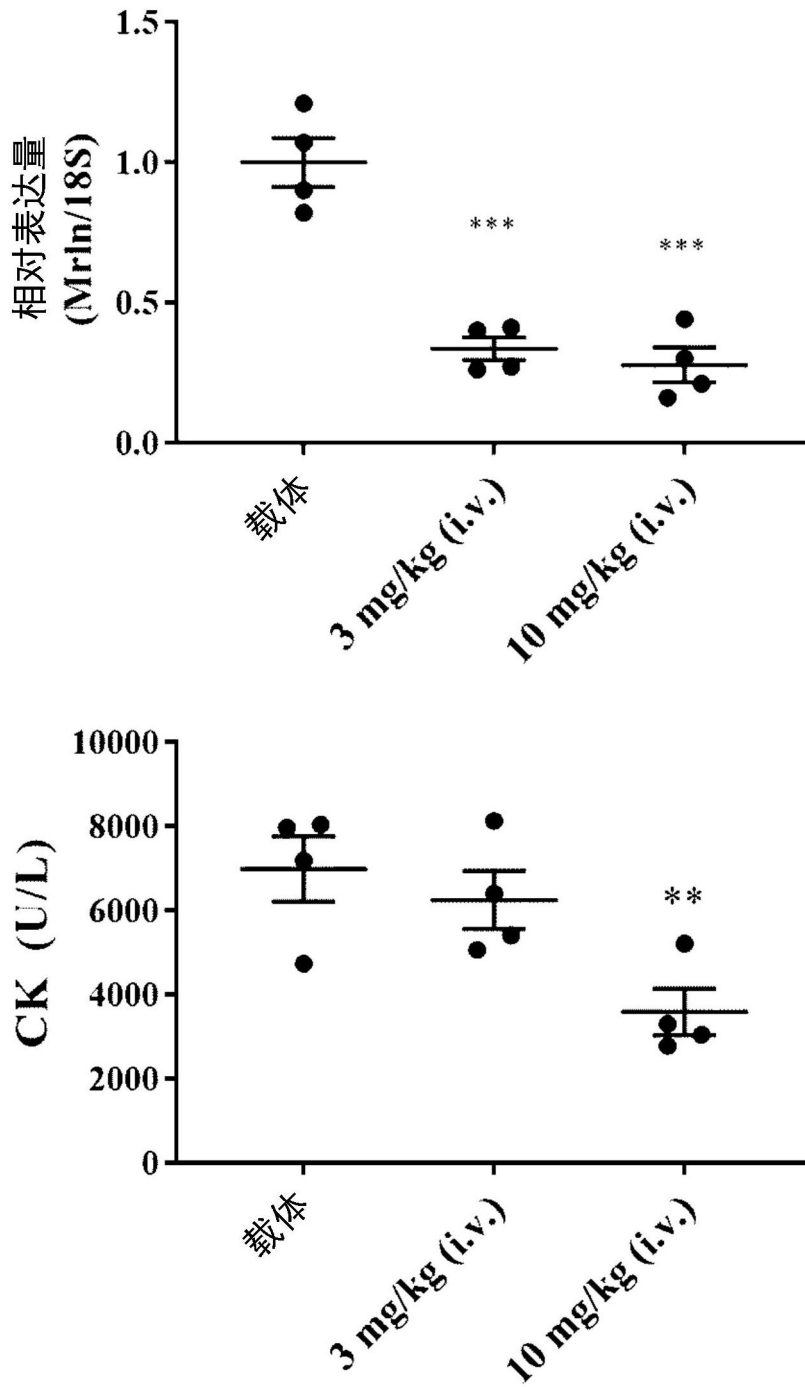
Met Ser Gly Lys Ser Trp Val Leu Ile Ser Thr Thr Ser Pro Gln Ser
1                    5                10                15
Leu Glu Asp Glu Ile Leu Gly Arg Leu Leu Lys Ile Leu Phe Val Leu
                20                25                30
Phe Val Asp Leu Met Ser Ile Met Tyr Val Val Ile Thr Ser
                35                40                45
    
```

	<210>	3	
	<211>	857	
	<212>	DNA	
	<213>	人 (Homo sapiens)	
	<220>		
	<221>	CDS	
	<222>	(349)..(486)	
	<400>	3	
		agaccagtga gcctcctgat ccaccaagac catatgggtgt ttttcataaa agagagagat	60
		cattcccttg actttggact tegettattg aacccttgga caacggaatc tcctctgtc	120
		gcccaggctg gaggtcagtg gcaccatctc ggcttaccgc aacctccgcc tcctgggttc	180
		aaacaatact cctaccttgg cctcctgagt agctgggatt acaggaatca aggttgctaa	240
		gagaccacct gtgctgaata cacttggtc tggcaagagc agaaaactga gaagccgtgt	300
		tacctaccac tacctgggat taattcaggg agcgggataa ttctggat atg act ggt	357
			Met Thr Gly
			1
		aaa aac tgg ata tta att tet act act act ccc aaa agt cta gaa gat	405
		Lys Asn Trp Ile Leu Ile Ser Thr Thr Thr Pro Lys Ser Leu Glu Asp	
		5 10 15	
		gaa att gtg gga aga ctt cta aaa att ttg ttt gtt atc ttt gtt gac	453
[0002]		Glu Ile Val Gly Arg Leu Leu Lys Ile Leu Phe Val Ile Phe Val Asp	
		20 25 30 35	
		tta att tet att ata tat gtt gtg ata act tet tagaaagctg acttccttc	506
		Leu Ile Ser Ile Ile Tyr Val Val Ile Thr Ser	
		40 45	
		catgtacatt tcaaaactgaa ttacagtgaa taaaaatttg tattttaact tgttgagtga	566
		ctcacatttt atgacattgc caatttattc tagaagccaa caggacactg caatacaaac	626
		aacattgtgt attgtttagt tctttatgg ttatgaaaca ttcacatata ctgaagtga	686
		tttttttccc caaaaacatc tatcctactg agtcatgaaa cttctagatt tttagccagg	746
		tgtggtgget cacacctgta atcccagcac tttgagaggc ccaggtaggc ggateccttg	806
		agtgcaggag ttcgatacgg gctgagcaa cctgaagaaa tcccatctct a	857
	<210>	4	
	<211>	46	
	<212>	PRT	
	<213>	人 (Homo sapiens)	
	<400>	4	
		Met Thr Gly Lys Asn Trp Ile Leu Ile Ser Thr Thr Thr Pro Lys Ser	
		1 5 10 15	
		Leu Glu Asp Glu Ile Val Gly Arg Leu Leu Lys Ile Leu Phe Val Ile	
		20 25 30	
		Phe Val Asp Leu Ile Ser Ile Ile Tyr Val Val Ile Thr Ser	
		35 40 45	



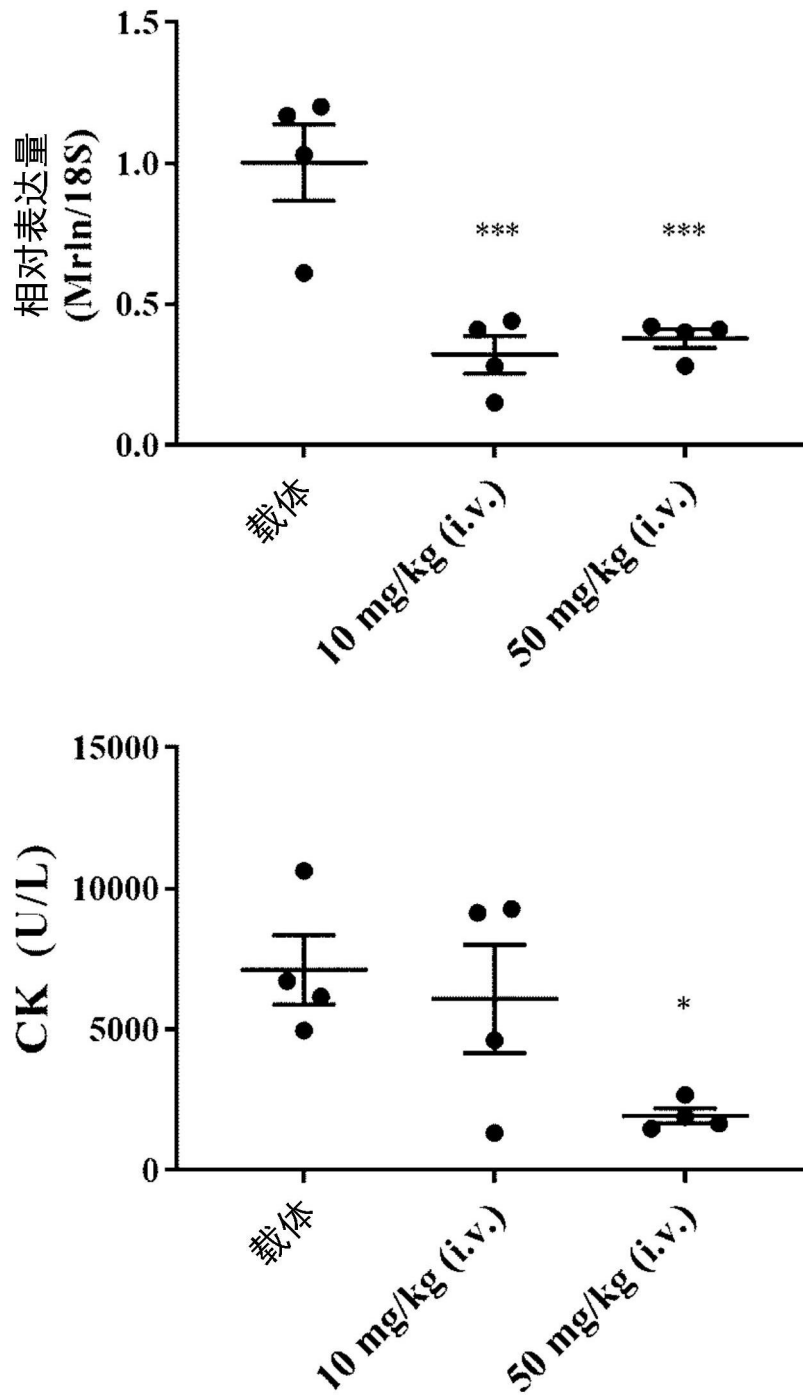
Mean \pm S.E.M. n=4. *** P < 0.0005, vs. 载体
(William's 多重比较检验)

图1



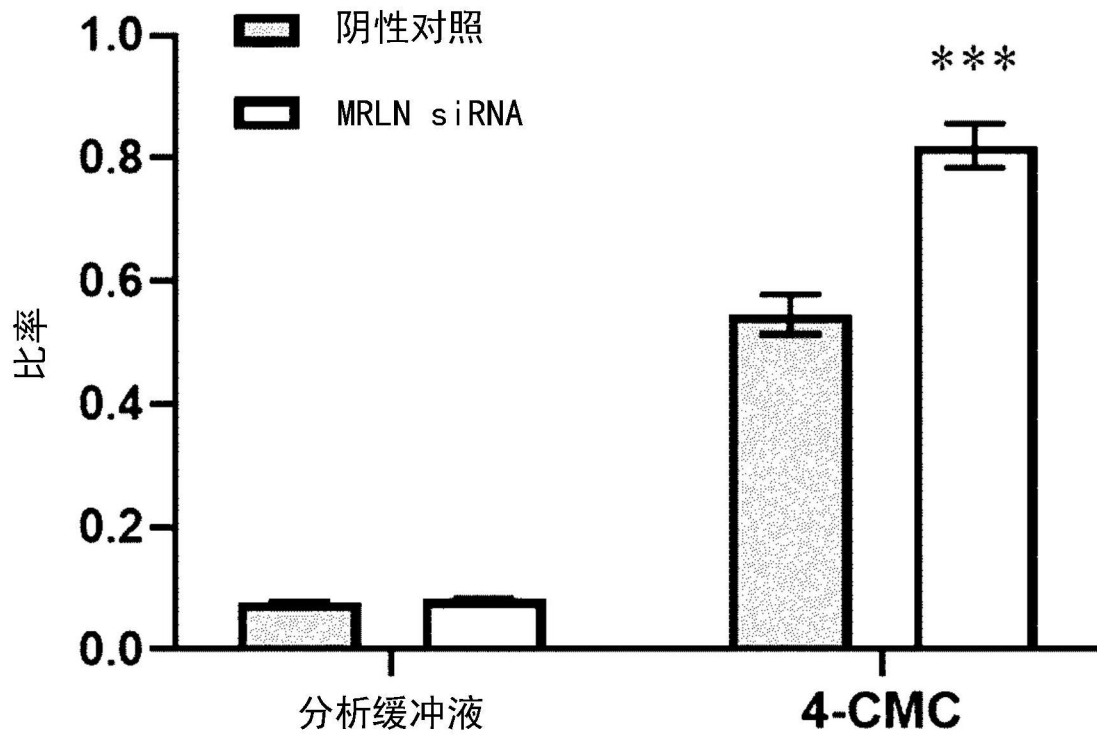
Mean \pm S.E.M. n=4. ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$, vs. 载体 (William's 多重比较检验)

图2



Mean \pm S.E.M. n=4. * P <0.025, *** P <0.0005, vs. 载体
(William's多重比较检验)

图3



Mean \pm S.E.M. n=15. *** P <0.001, vs. 阴性对照 (Student's t-检验)

图4