

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6384845号
(P6384845)

(45) 発行日 平成30年9月5日 (2018.9.5)

(24) 登録日 平成30年8月17日 (2018.8.17)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

A 6 1 P 21/04 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/7125 (2006.01)

A 6 1 K 31/712 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 Z N A Z

A 6 1 P 21/04

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 31/7125

A 6 1 K 31/712

請求項の数 21 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-539975 (P2017-539975)
 (86) (22) 出願日 平成28年9月15日 (2016.9.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2016/077305
 (87) 国際公開番号 W02017/047707
 (87) 国際公開日 平成29年3月23日 (2017.3.23)
 審査請求日 平成30年5月23日 (2018.5.23)
 (31) 優先権主張番号 特願2015-182145 (P2015-182145)
 (32) 優先日 平成27年9月15日 (2015.9.15)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 000004156
 日本新薬株式会社
 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町1-4
 番地
 (73) 特許権者 510147776
 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究
 センター
 東京都小平市小川東町4丁目1番1号
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100141195
 弁理士 西澤 恵美子
 (74) 代理人 100147131
 弁理士 今里 崇之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アンチセンス核酸

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 3 0、2 5、3 3、7 9 及び 8 0 よりなる群から選ばれるいずれか一つの塩基配列からなる、アンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

【請求項 2】

配列番号 3 0 の塩基配列からなる、アンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

【請求項 3】

配列番号 2 5 の塩基配列からなる、アンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

【請求項 4】

配列番号 3 3 の塩基配列からなる、アンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

【請求項 5】

配列番号 7 9 の塩基配列からなる、アンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

【請求項 6】

配列番号 8 0 の塩基配列からなる、アンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

【請求項 7】

オリゴヌクレオチドである、請求項1～6のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

【請求項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糖部分及び/又はリン酸結合部分が修飾されている、請求項7に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

【請求項9】

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、請求項7又は8に記載のアンチ

10

センスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。
(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。)

【請求項10】

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より選択されるいずれか1つのものである、請求項7～9のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

【請求項11】

モルホリノオリゴマーである、請求項1～6のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

20

【請求項12】

ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーである、請求項11に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

【請求項13】

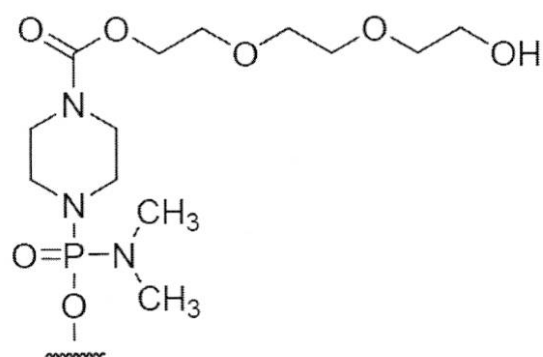
ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーである、請求項1～6のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

【請求項14】

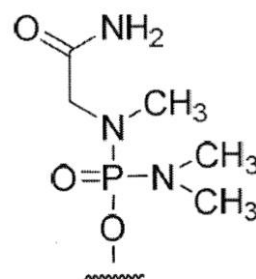
5'末端が、下記化学式(1)～(3)のいずれかの基である、請求項11～13のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

30

【化25】



(1)



(2)



(3)

40

【請求項15】

請求項1～14のいずれか一項に記載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、筋ジストロフィー患者の治療用医薬組成物。

【請求項16】

さらに医薬的に許容可能な担体を含む、請求項15に記載の医薬組成物。

【請求項17】

前記筋ジストロフィー患者が、ジストロフィン遺伝子にエクソン45スキップの対象とな

50

る変異を有する患者である、請求項 1 5 又は 1 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

前記患者がヒトである、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

筋ジストロフィー治療用医薬組成物の製造における請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬上許容される塩若しくは水和物の使用。

【請求項 2 0】

前記治療の対象となる筋ジストロフィー患者が、ジストロフィン遺伝子にエクソン45スキップの対象となる変異を有する患者である、請求項 1 9 に記載の使用。

【請求項 2 1】

前記患者がヒトである、請求項 1 9 又は 2 0 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、ヒトジストロフィン遺伝子の第45番目のエクソンのスキッピングを可能にするアンチセンスオリゴマー及び該オリゴマーを含む医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

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遺伝性進行性筋疾患である。乳幼児期には正常のヒト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。その後筋力低下は進行し12歳頃までに歩行不能になり、20歳代で心不全又は呼吸不全により死に至る重篤な疾患である。現在、DMDに対する有効な治療法はなく、新たな治療薬の開発が強く求められている。

【0 0 0 3】

DMDはジストロフィン遺伝子の変異が原因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のエクソンが結合したmRNAは13,993塩基になる。このmRNAから3,685のアミノ酸に翻訳され、ジストロフィンタンパク質が生成される。ジストロフィン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ン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。

【0 0 0 4】

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。

【0 0 0 5】

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

10

20

30

40

50

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）へのセリンとアルギニンに富むSRタンパク質の結合が必要であると考えられており、ESEをターゲティ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。

10

【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。ジストロフィン遺伝子の単一エクソンに対して、一つの連続する配列を標的と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について複数の報告がある（特許文献1～6、並びに非特許文献1及び2）。また、ジストロフィン遺伝子の同一エクソンを標的とする二種類のアンチセンス核酸を混合して作用させると（二重標的化）、各アンチセンス核酸を単独で用いた場合よりスキッピング活性が増強される場合があることが報告されている（特許文献7）。

20

【0008】

しかし、同一のエクソン内の2箇所以上を標的とする連結された一本鎖アンチセンス核酸（連結型）がスキッピング活性を示すことは未だ報告されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開公報第2004/048570号

【特許文献2】国際公開公報第2009/139630号

【特許文献3】国際公開公報第2010/048586号

【特許文献4】米国特許公開公報第2010/0168212号

【特許文献5】国際公開公報第2011/057350号

【特許文献6】国際公開公報第2006/000057号

【特許文献7】国際公開公報第2007/135105号

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Annemieke Aartsma-Rus et al., (2002) Neuromuscular Disorders 12: S71-S77

【非特許文献2】Wilton S. D., et al., Molecular Therapy 2007: 15: p. 1288-96

【発明の概要】

40

【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、本発明は、ジストロフィン遺伝子の同一エクソン内の別の2箇所の塩基配列を標的としてエクソンスキッピングを誘導する新規な連結型アンチセンスオリゴマー及び同オリゴマーを含む筋ジストロフィー治療薬を提供することを主な目的とする。

【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、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン45の異なる2箇所を標的とするオ

50

リゴマーを連結して得られるアンチセンスオリゴマーが同エクソンのスキッピングを誘導できることを見出した。本発明者らは、この知見に基づき、本発明を完成させた。

【 0 0 1 3 】

即ち、本発明は、以下のとおりである。

[1]

以下の (a) ~ (e) よりなる群より選ばれる2つのユニットオリゴマーが連結した、14 ~ 32塩基長のアンチセンスオリゴマーであって、2つのユニットオリゴマーは連続又は互いに重複するものではない、アンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物；

(a) ヒトジストロフィン遺伝子の第45番目のエクソンの5'末端から第 - 5 ~ 15番目のヌクレオチド配列から選択される連続する7~16塩基のヌクレオチド配列に相補的な塩基配列からなるユニットオリゴマー；

(b) ヒトジストロフィン遺伝子の第45番目のエクソンの5'末端から第48 ~ 70番目のヌクレオチド配列から選択される連続する7~16塩基のヌクレオチド配列に相補的な塩基配列からなるユニットオリゴマー；

(c) ヒトジストロフィン遺伝子の第45番目のエクソンの5'末端から第128 ~ 150番目のヌクレオチド配列から選択される連続する7~16塩基のヌクレオチド配列に相補的な塩基配列からなるユニットオリゴマー；

(d) ヒトジストロフィン遺伝子の第45番目のエクソンの5'末端から第15 ~ 40番目のヌクレオチド配列から選択される連続する7~16塩基のヌクレオチド配列に相補的な塩基配列からなるユニットオリゴマー；及び

(e) ヒトジストロフィン遺伝子の第45番目のエクソンの5'末端から第110 ~ 125番目のヌクレオチド配列から選択される連続する7~16塩基のヌクレオチド配列に相補的な塩基配列からなるユニットオリゴマー。

[2]

前記2つのユニットオリゴマーのうちの 하나가 (a) である、前記 [1] に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

[3]

配列番号7~12、14~33、40~52、57、64、65、79~86よりなる群から選ばれるいずれか一つの塩基配列からなる、前記 [1] 又は [2] に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

[4]

配列番号8、10、25、30、33、79、80よりなる群から選ばれるいずれか一つの塩基配列からなる、前記 [1] ~ [3] のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

[5]

オリゴヌクレオチドである、前記 [1] ~ [4] のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

[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、前記 [5] に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

[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、前記 [5] 又は [6] に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

(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。)

[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

10

20

30

40

50

、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より選択されるいずれか1つのものである、前記〔6〕又は〔7〕に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

〔9〕 モルホリノオリゴマーである、前記〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

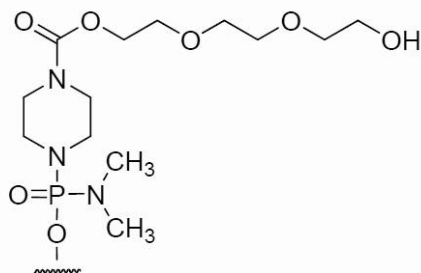
〔10〕 ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーである、前記〔9〕に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

10

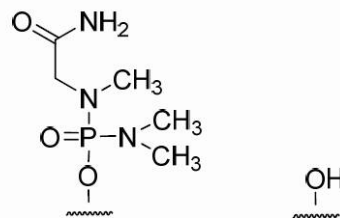
〔11〕 ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーである、前記〔4〕に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

〔12〕 5'末端が、下記化学式(1)～(3)のいずれかの基である、前記〔9〕～〔11〕のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

【化1】



(1)



(2)



(3)

20

〔13〕 前記〔1〕～〔12〕のいずれかに記載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。

30

〔14〕 さらに医薬的に許容可能な担体を含む、前記〔13〕に記載の医薬組成物。

〔15〕

前記〔1〕～〔12〕のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬上許容される塩若しくは水和物、又は前記〔13〕若しくは〔14〕に記載の前記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。

〔16〕 前記筋ジストロフィー患者が、ジストロフィン遺伝子にエクソン45スキップの対象となる変異を有する患者である、前記〔15〕に記載の治療方法。

40

〔17〕

前記患者がヒトである、前記〔15〕又は〔16〕に記載の治療方法。

〔18〕

筋ジストロフィー治療用医薬組成物の製造における前記〔1〕～〔12〕のいずれかに記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬上許容される塩若しくは水和物の使用。

〔19〕

筋ジストロフィー治療に使用するための前記〔1〕～〔12〕のいずれか一項に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

〔20〕

前記治療において、筋ジストロフィー患者が、ジストロフィン遺伝子にエクソン45スキ

50

ップの対象となる変異を有する患者である、前記[19]に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

[21]

前記患者がヒトである、前記[19]又は[20]に記載のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物。

【発明の効果】

【0014】

本発明のアンチセンスオリゴマーにより、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン45のスキッピングを効果的に誘導することが可能である。また、本発明の医薬組成物を投与することにより、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの症状を、効果的に軽減することができる。対象となる患者の欠失エクソンは18-44, 44, 46, 46-47, 46-48, 46-49, 46-51, 46-53等が挙げられる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図2】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図3】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図4】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図5】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図6】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図7】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図8】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図9】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図10】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図11】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図12】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図13】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図14】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図15】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図16】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図17】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図18】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45のスキッピング効率を示す図である。

10

20

30

40

50

【図19】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図20】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図21】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図22】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図23】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図24】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45のスキッピング効率を示す図である。

【図25】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45のスキッピング効率を示す図である。

【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。

なお、本明細書において引用した全ての文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、2015年9月15日に出版された本願優先権主張の基礎となる日本国特許出願(特願2015-182145号)の明細書及び図面に記載の内容を包含する。

【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45番目のエクソンをスキッピングしうるアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物(以下、「本発明のオリゴマー」という)を提供する。

【0018】

[ヒトジストロフィン遺伝子の第45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、3.0 Mbp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, RG., et al., Genomics, 16: 536-538 (1993))。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45の塩基配列を配列番号13に示す。また、ヒトの野生型ジストロフィン遺伝子のエクソン45のヌクレオチド配列(配列番号13)のうち、5'末端から数えて-5~15番目の塩基からなる配列を配列番号3に示す。同様に、48~70番目の塩基からなる配列、128~150番目の塩基からなる配列、15~40番目の塩基からなる配列及び110~125番目の塩基からなる配列を、それぞれ配列番号4~6、143に示す。

【0019】

本発明のオリゴマーは、ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン45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、本発明の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45には、野生型だけでなく、変異型も含まれる。

変異型のヒトジストロフィン遺伝子のエクソン45又はその一部は、具体的には、以下の(Ⅰ)又は(Ⅱ)に記載のポリヌクレオチドである。

(Ⅰ) 配列番号13、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6及び配列番号143からなる群より選択されるいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

(Ⅱ) 配列番号13、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6及び配列番号143からなる群より選択されるいずれかの塩基配列に対して、90%以上の同一性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチド

【0020】

本明細書中、「ポリヌクレオチド」とは、DNA又はRNAを意味する。

10

本明細書中、「ストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、例えば、配列番号13、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6及び配列番号143からなる群より選択されるいずれかの塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリ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ポリヌクレオチドをいう。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。

20

【0021】

本明細書中、「相補的な塩基配列」とは、対象となる塩基配列とワトソン・クリック対を形成する塩基配列に限定されるものではなく、揺らぎ塩基対(Wobble base pair)を形成する塩基配列も含む。ここで、ワトソン・クリック対とは、アデニン-チミン、アデニン-ウラシル及びグアニン-シトシン間に水素結合が形成される塩基対を意味し、揺らぎ塩基対とは、グアニン-ウラシル、イノシン-ウラシル、イノシン-アデニン及びイノシン-シトシン間に水素結合が形成される塩基対を意味する。また、「相補的な塩基配列」とは、対象となる塩基配列と100%の相補性を有していなくてもよく、例えば、対象となる塩基配列に対して、1~3個、1~2個又は1個の非相補的塩基が含まれていてもよい。

【0022】

30

本明細書中、「ストリンジентな条件」とは、低ストリンジентな条件、中ストリンジентな条件及び高ストリンジентな条件のいずれでもよい。「低ストリンジентな条件」は、例えば、5×SSC、5×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ентな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5%SDS、50%ホルムアミド、42 又は5×SSC、1% SDS、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、50%ホルムアミド、42 の条件である。「高ストリンジентな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5%SDS、50%ホルムアミド、50 又は0.2×SSC、0.1% SDS、65 の条件である。これらの条件において、温度を上げるほど高い同一性を有するポリヌクレオチド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。

40

【0023】

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 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ールにしたがい、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ポリヌクレオチドを検出することができる。あるいは、配列番号13、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6及び配列番号143からなる群より選択されるいずれか、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6及び配列番号143か

50

らなる群より選択される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。

【0024】

上記のハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド以外のポリヌクレオチドとしては、相同性検索ソフトウェアであるBLAST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13、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6及び配列番号143からなる群より選択されるいずれかのポリヌクレオチドからなる配列と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%以上の同一性を有するポリヌクレオチドをあげることができる。

10

なお、塩基配列の同一性は、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 872264-2268, 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やBLASTX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。

20

【0025】

ある態様では、本発明のオリゴマーは、以下の(a)～(e)よりなる群より選ばれる2つのユニットオリゴマーが連結した、14～32塩基長のアンチセンスオリゴマー又はその医薬的に許容可能な塩若しくは水和物である。

(a) ヒトジストロフィン遺伝子の第45番目のエクソンの5'末端から第5～15番目のヌクレオチド配列から選択される連続する7～16塩基のヌクレオチド配列に相補的な配列からなるユニットオリゴマー；

(b) ヒトジストロフィン遺伝子の第45番目のエクソンの5'末端から第48～70番目のヌクレオチド配列から選択される連続する7～16塩基のヌクレオチド配列に相補的な配列からなるユニットオリゴマー；

30

(c) ヒトジストロフィン遺伝子の第45番目のエクソンの5'末端から第128～150番目のヌクレオチド配列から選択される連続する7～16塩基のヌクレオチド配列に相補的な配列からなるユニットオリゴマー；

(d) ヒトジストロフィン遺伝子の第45番目のエクソンの5'末端から第15～40番目のヌクレオチド配列から選択される連続する7～16塩基のヌクレオチド配列に相補的な配列からなるユニットオリゴマー；及び

(e) ヒトジストロフィン遺伝子の第45番目のエクソンの5'末端から第110～125番目のヌクレオチド配列から選択される連続する7～16塩基のヌクレオチド配列に相補的な塩基配列からなるユニットオリゴマー。

40

【0026】

上記(a)～(e)の各ユニットオリゴマー（以下、単に「ユニット」と称する場合もある）のサイズは、7～16塩基長であり、好ましくは8～16塩基長、9～16塩基長である。各ユニットのサイズは同じであってもよく、異なってもよい。

【0027】

また、(a)～(e)よりなる群より2つのユニットオリゴマーを選ぶ際、2つのユニットオリゴマーは(a)～(e)の同じ組合せ（つまり、(a)と(a)、(b)と(b)、(c)と(c)、(d)と(d)、(e)と(e)）であってもよく、あるいは異なった組合せであってもよいが、好ましくは異なった組合せである。例えば、1つのユニットとして(a)を選んだ場合、他方のユニットは(b)～(e)のいずれか1つとなることが好ましい。同様に一方にユニット(b)を選んだ

50

場合、他方のユニットは(a)、(c)、(d)又は(e)となることが好ましく、また、一方にユニット(c)を選んだ場合、他方のユニットは(a)、(b)、(d)又は(e)となることが好ましい。

【0028】

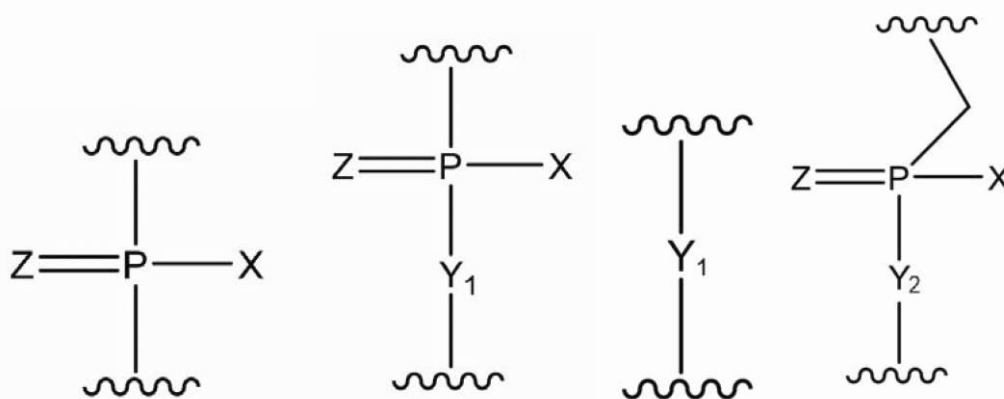
(a)～(e)より2つのユニットを選択した場合、選択された2つのユニットのいずれが5'末端側に配置されてもよいが、(a)と(b)を選択した場合であればユニット(a)が3'末端側に連結され、(b)と(c)を選択した場合であればユニット(b)が3'末端側に連結され、(a)と(c)を選択した場合であればユニット(a)が3'末端側に連結され、(a)と(d)を選択した場合であればユニット(a)が3'末端側に連結され、(a)と(e)を選択した場合であればユニット(a)が3'末端側に連結されることが好ましい。

10

【0029】

ここで、「連結」とは、(a)～(e)より選択された2つのユニットが直結していることを意味する。すなわち、2つのユニットが連結している場合、5'末端側に位置するユニットの3'末端と、3'末端側に位置するユニットの5'末端とがリン酸結合又は以下の基を形成することを意味する。

【化2】



20

(式中、Xは、-OH、-CH₂R¹、-O-CH₂R¹、-S-CH₂R¹、-NR²R³又はFを表し；

R¹は、H、アルキルを表し；

R²及びR³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；

Y₁は、O、S、CH₂又はNR¹を表し；

Y₂は、O、S又はNR¹を表し；

Zは、O又はSを表す。)

30

【0030】

「ヒトジストロフィン遺伝子の第45番目のエクソンのスキッピングを可能にする」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45に相当する部位に本発明の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た際に、例えばエクソン44に欠失を有するDMD患者の場合、エクソン43の3'末端に相当する塩基にエクソン46の5'末端に相当する塩基が連結し、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。

40

【0031】

ここで、前記「結合」は、本発明の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℃、pH 5～8、好ましくは、pH 7.4であって、塩化ナトリウム濃度が150 mMの条件が挙げられる。

【0032】

50

ヒトジストロフィン遺伝子のエクソン45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）に本発明のオリゴマーを導入し、前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45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45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45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、以下の式に従って計算することができる。

$$\text{スキッピング効率}(\%) = A / (A + B) \times 100$$

10

【0033】

好ましくは、本発明のオリゴマーは、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45をスキッピングする。

スキッピング効率の計算については、国際公開公報第2012/029986号を参照することができる。

【0034】

20

本発明のオリゴマーとしては、例えば、14～32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。好ましくは、本発明のオリゴマーは、16～30塩基、17～30塩基、18～30塩基、19～30塩基、20～30塩基、20～29塩基、20～28塩基、20～27塩基、20～26塩基又は21～26塩基の長さにあり、モルホリノオリゴマーであることが好ましい。

【0035】

前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】

30

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】

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。

40

【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

50

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】

アルキルとしては、直鎖状又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。

【0041】

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。

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、直鎖状又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。

【0042】

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、-ナフチル、-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。

アルキレンとしては、直鎖状又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。

【0043】

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。

【0044】

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

10

20

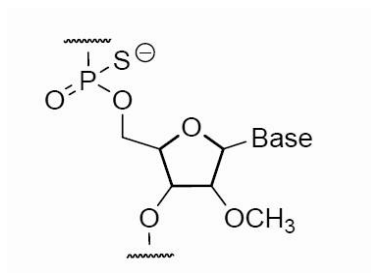
30

40

50

成単位とする本発明のオリゴマーである。

【化 3】



10

(式中、Baseは、核酸塩基を表す。)

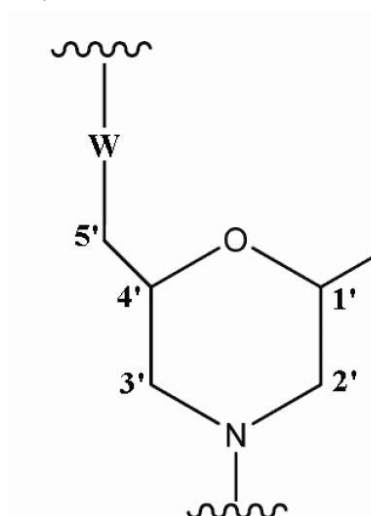
【 0 0 4 5 】

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社又はTakara社）等に委託して作製することもできる。

【 0 0 4 6 】

前記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オリゴマーである。

【化 4】



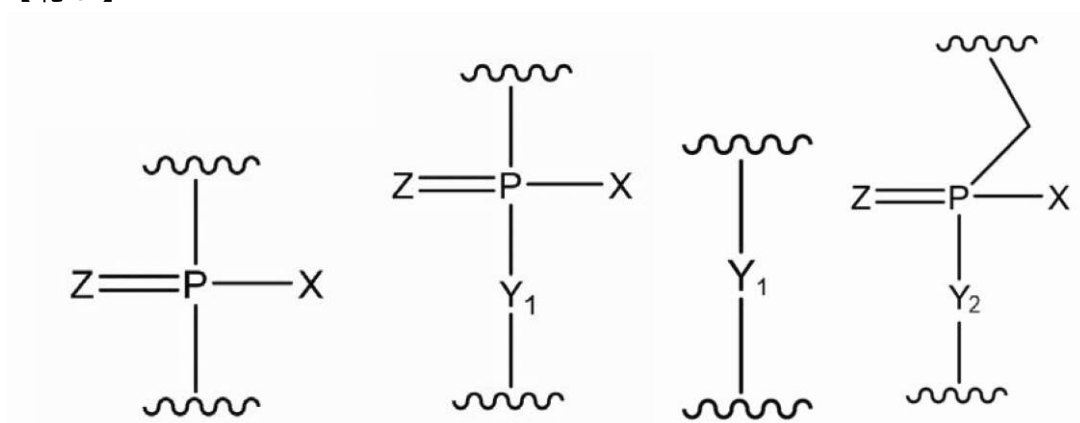
20

30

(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。

【化 5】



40

(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；

50

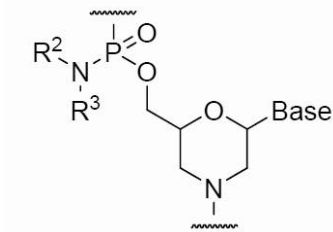
R^1 は、H、アルキルを表し；
 R^2 及び R^3 は、同一又は異なって、H、アルキル、シクロアルキル、又は、アリアルを表し；
 Y_1 は、O、S、 CH_2 又は NR^1 を表し；
 Y_2 は、O、S又は NR^1 を表し；
 Z は、O又はSを表す。))

【0047】

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。

10

【化6】



20

（式中、Base、 R^2 、 R^3 は、前記と同義である。）

【0048】

モルホリノオリゴマーは、例えば、国際公開公報第1991/009033号、又は国際公開公報第2009/064471号に従って製造することができる。特に、PMOは、国際公開公報第2009/064471号に記載の方法に従って製造するか、又は国際公開公報第2013/100190号に記載の方法に従って製造することができる。

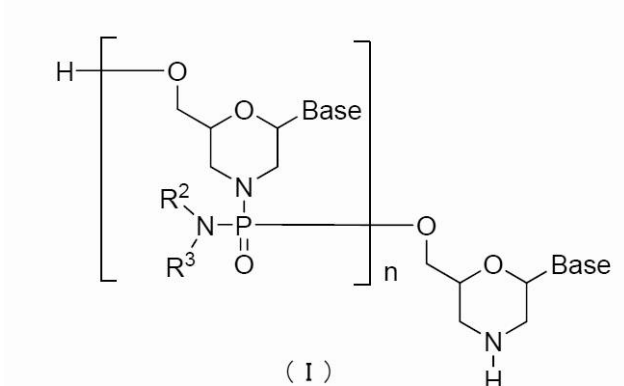
【0049】

[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。

30

【化7】



40

[式中、各Base、 R^2 、 R^3 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、13～31の範囲内にある任意の整数である。]

【0050】

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

50

のであれば特に限定されない。

【0051】

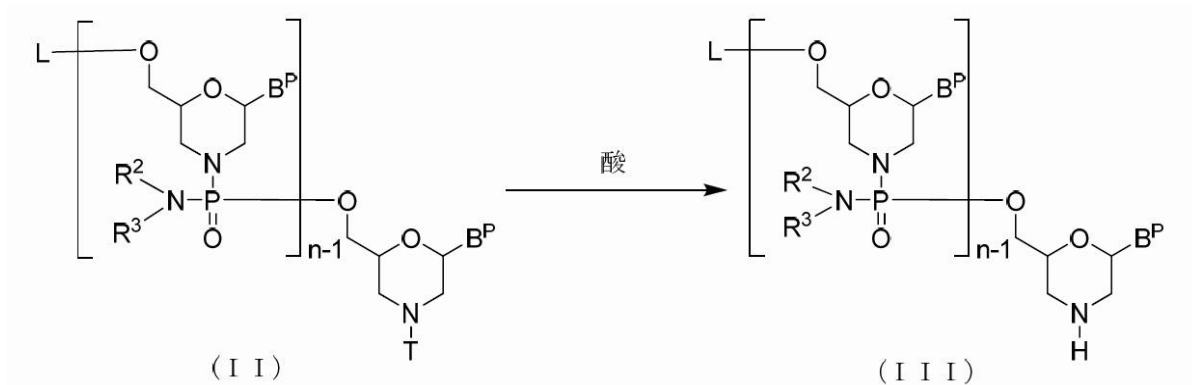
また、下記のすべての工程は、液相法又は固相法（マニュアル又は市販の固相自動合成機を用いる）で実施することができる。固相法でPMOを製造する場合、操作手順の簡便化及び合成の正確性の点から自動合成機を用いる方法が望ましい。

【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8】



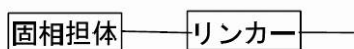
[式中、n、R²、R³は、前記と同義であり；

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（IV）で表される基（以下、基（IV）という。）を表す。]

【化9】



(IV)

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、国際公開公報第2009/064471号公報参照）。

【0053】

「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 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 - 定孔ガラス（例えば、AluIら, 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。

【0054】

「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(II)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(II)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。

【0057】

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、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。

【0058】

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。

【0059】

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

10

20

30

40

50

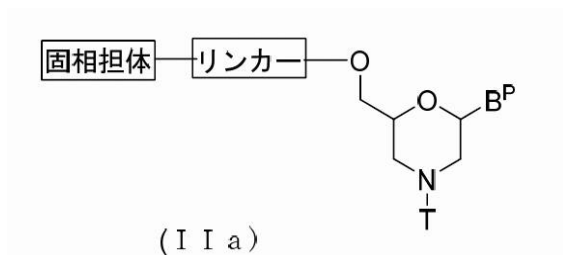
タン、アセトニトリル、アルコール類（エタノール、イソプロパノール、トリフルオロエタノールなど）、水又はこれらの混合物を挙げることができる。反応温度は、例えば、10～50 の範囲内が好ましく、より好ましくは、20～40 の範囲内であり、さらに好ましくは、25～35 の範囲内である。

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。

【0060】

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10】



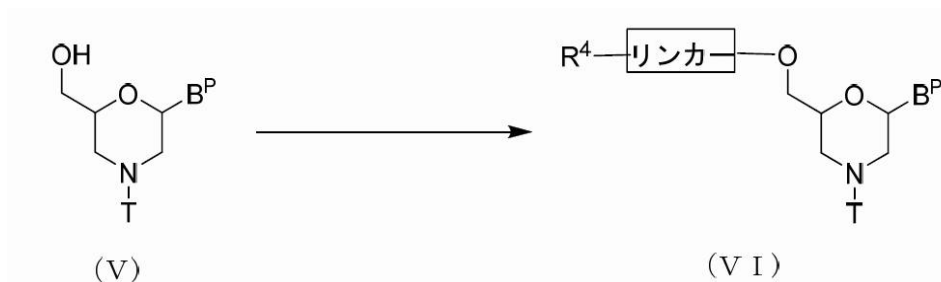
[式中、 B^P 、T、リンカー、固相担体は、前記と同義である。]

【0061】

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11】



[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、又は、アミノを表す。]

【0062】

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(VIa)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。

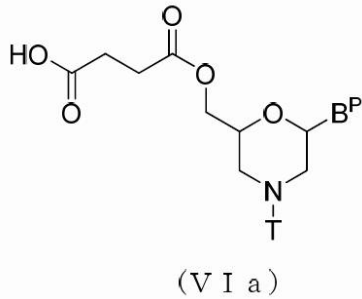
10

20

30

40

【化 1 2】



10

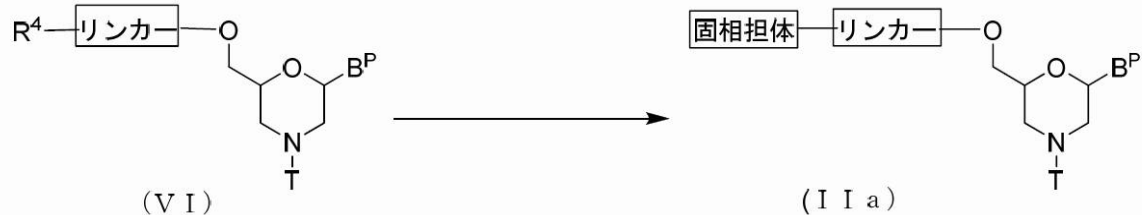
[式中、 B^P 、 T は、前記と同義である。]

【 0 0 6 3】

工程2：

化合物 (VI) 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 (II a) を製造する工程。

【化 1 3】



20

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

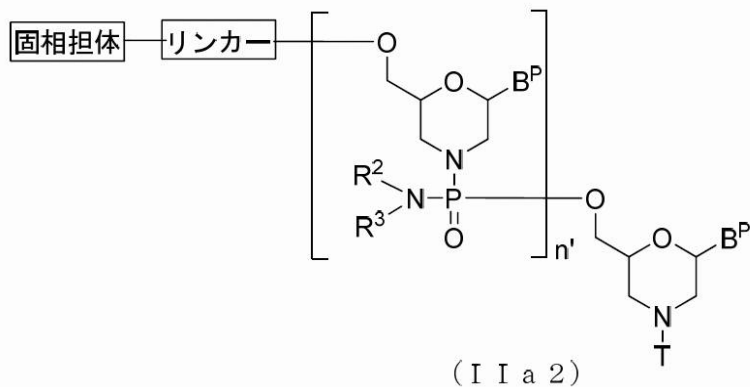
本工程は、化合物 (VI) と固相担体とを用いて縮合反応として知られた方法により製造することができる。

【 0 0 6 4】

化合物 (II) において、 $n=2 \sim 99$ であって、 L が基 (IV) である、次の一般式 (II a2) で表される化合物は、化合物 (II a) 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。

30

【化 1 4】



40

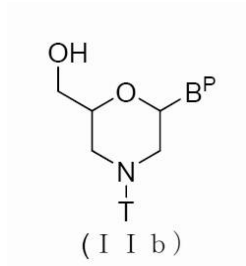
[式中、 B^P 、 R^2 、 R^3 、 T 、リンカー、固相担体は、前記と同義であり； n' は、 $1 \sim 98$ を表す。]

【 0 0 6 5】

50

また、化合物(II)において、 $n=1$ であって、 L が水素である、次の一般式(IIb)で表される化合物は、例えば、国際公開公報第1991/009033号に記載の方法により製造することができる。

【化 1 5】



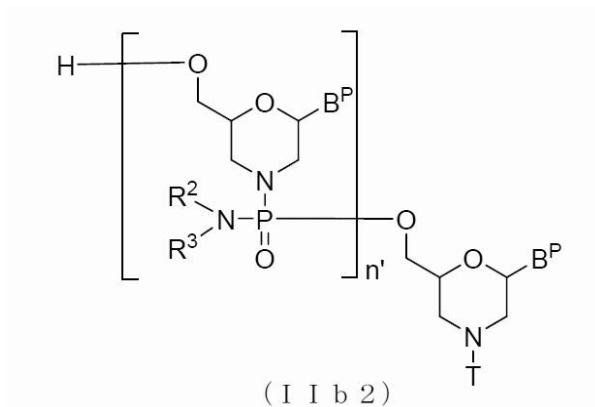
10

[式中、 B^P 、 T は、前記と同義である。]

【 0 0 6 6 】

化合物(II)において、 $n=2 \sim 99$ であって、 L が水素である、次の一般式(IIb2)で表される化合物は、化合物(IIb)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 1 6】



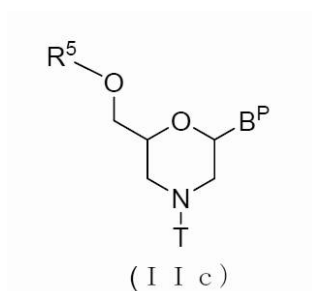
20

[式中、 B^P 、 n' 、 R^2 、 R^3 、 T は、前記と同義である。]

【 0 0 6 7 】

また、化合物(II)において、 $n=1$ であって、 L がアシルである、次の一般式(IIc)で表される化合物は、化合物(IIb)に対してアシ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 1 7】



40

[式中、 B^P 、 T は、前記と同義であり；

R^5 は、アシルを表す。]

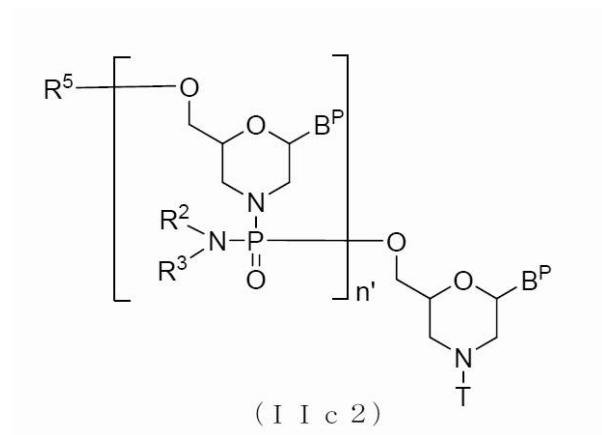
【 0 0 6 8 】

化合物(II)において、 $n=2 \sim 99$ であって、 L がアシルである、次の一般式(IIc2)で表される化合物は、化合物(IIc)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

50

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18】



10

[式中、 B^p 、 n' 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、 T は、前記と同義である。]

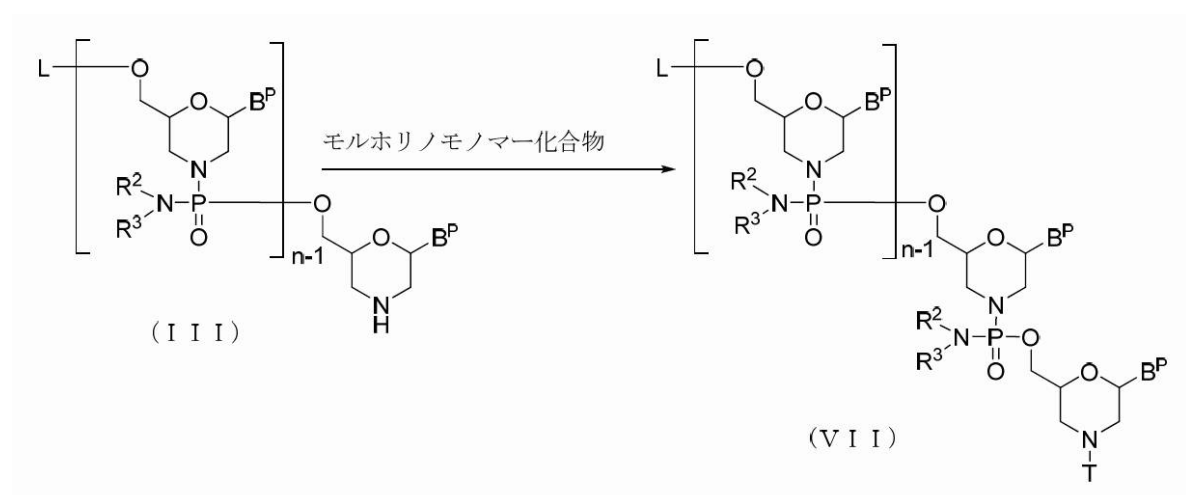
【0069】

(2) 工程B:

化合物(III)に塩基存在下にモ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。

20

【化19】



30

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

【0070】

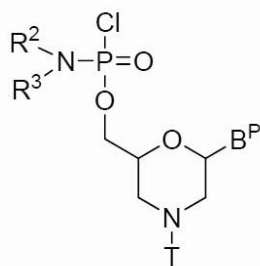
本工程は、化合物(III)に塩基存在下にモルホリノモノマー化合物を作用させることにより実施することができる。

【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(VIII)で表される化合物を挙げることができる。

40

【化 20】



(VII I)

10

[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。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。

【0072】

本工程に使用しうるモルホリノモノマー化合物及び塩基は、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、反応に参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。

20

【0073】

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。

【0074】

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、反応に参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。

30

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。

40

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 ～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、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。

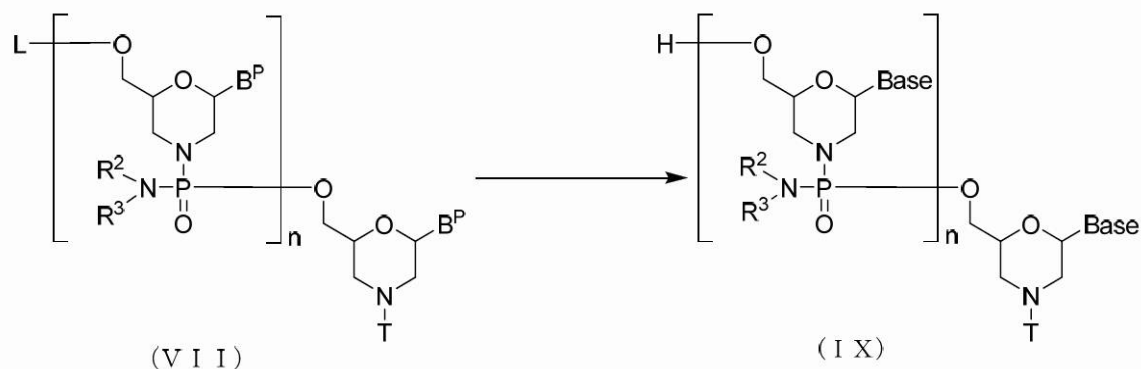
【0075】

(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。

50

【化 2 1】



10

【式中、Base、B^P、L、n、R²、R³、Tは、前記と同義である。】

【0076】

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。

【0077】

「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。なかでも、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～100000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。

20

【0078】

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。

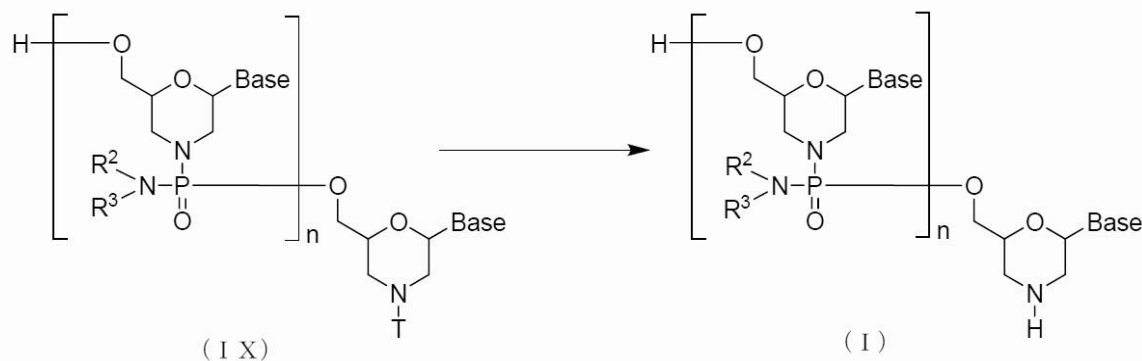
【0079】

30

(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 2 2】



40

【式中、Base、n、R²、R³、Tは、前記と同義である。】

【0080】

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。

【0081】

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

50

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。

【0082】

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。

【0083】

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、国際公開公報W01991/09033を参照)。

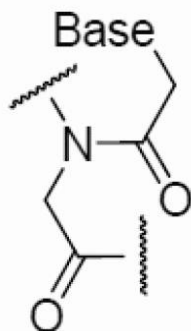
逆相クロマトグラフィーを用いてPMO(I)を精製する場合には、溶出溶媒として、例えば20mMのトリエチルアミン/酢酸緩衝液とアセトニトリルの混合溶液を使用することができる。

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、1Mの食塩水と10mM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。

【0084】

前記ペプチド核酸オリゴマーは、下記一般式で表される基を構成単位とする本発明のオリゴマーである。

【化23】



(式中、Baseは、前記と同義である。)

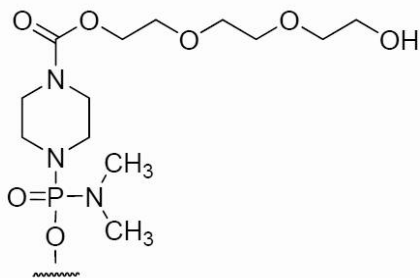
ペプチド核酸は、例えば、以下の文献に従って製造することができる。

- 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, 57 67 (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)

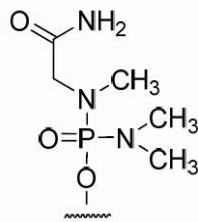
【0085】

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 2 4】



(1)



(2)



(3)

10

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】

2. 医薬組成物

本発明のオリゴマーは、ジストロフィン遺伝子のエクソン45のスキッピングを可能にする。従って、本発明のオリゴマーを含む医薬組成物をジストロフィン遺伝子にエクソン45スキップの対象となる変異（エクソン45スキッピングでin-frame化する変異）を有するDM

20

D患者に投与することにより、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。また、短い鎖長からなる本発明のオリゴマーは製造工程が簡便であり、さらに製造コストが抑えられるというメリットがある。

【0087】

本発明の組成物に含まれる本発明の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、フェニルグリシナルキルエステル塩、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-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、りんご酸塩、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オリゴマーは、その水和物の形態にあってもよい。

30

40

【0088】

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。

50

【0089】

本発明の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好ましい。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、又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)、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。

【0090】

本発明の組成物に含まれる本発明のオリゴマーの濃度は、担体の種類等によって異なるが、0.1 nM~100 μ Mの範囲内が適当であり、1 nM~10 μ Mの範囲内が好ましく、10 nM~1 μ Mの範囲内がより好ましい。また、本発明の組成物に含まれる本発明のオリゴマーと担体との重量比(担体/本発明のオリゴマー)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、0.1~100の範囲内が適当であり、1~50の範囲内が好ましく、10~20の範囲内がより好ましい。

【0091】

本発明の組成物には、本発明の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)、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)、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。

【0092】

本発明の組成物は、担体の分散液に本発明のオリゴマーを加え、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。本発明のオリゴマーを添加させ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。

【0093】

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。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。

【0094】

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500 mL以下が適当である。

【0095】

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1 mg～1 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。

【0096】

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、0.1 nM～100 μMの範囲内が適当であり、1 nM～10 μMの範囲内が好ましく、10 nM～1 μMの範囲内がより好ましい。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、1～50の範囲内が好ましく、10～20の範囲内がより好ましい。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。

【0097】

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】

【0098】

[参考例1]

アミノポリスチレン樹脂に担持された4 - { [(2S , 6R) - 6 - (4 - ベンズアミド - 2 - オキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸

【0099】

工程1: 4 - { [(2S , 6R) - 6 - (4 - ベンズアミド - 2 - オキソピリミジン - 1 (2H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸の製造

アルゴン雰囲気下、N - { 1 - [(2R , 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] - 2 - オキソ - 1 , 2 - ジヒドロピリミジン - 4 - イル } ベンズアミド3.44gと4 - ジメチルアミノピリジン (4 - DMAP) 1.1gをジクロロメタン50mLに懸濁し、無水コハク酸0.90gを加え、室温で3時間攪拌した。反応液にメタノール10mLを加え、減圧濃縮した。残渣に酢酸エチルと0.5Mのリン酸二水素カリウム水溶液を用いて抽出操作を行った。得られた有機層を0.5Mのリン酸二水素カリウム水溶液、水、飽和食塩水の順で洗浄した。得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮し、4.0gの目的物を得た。

【0100】

工程2: アミノポリスチレン樹脂に担持された4 - { [(2S , 6R) - 6 - (4 - ベンズアミド - 2 - オキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4

- オキソブタン酸の製造

4 - { [(2S, 6R) - 6 - (4 - ベンズアミド - 2 - オキソピリミジン - 1 (2H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸4.0gをピリジン (脱水) 200mLに溶解し、4 - DMAP0.73g、1 - エチル - 3 (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩11.5gを加えた。次いで、アミノポリスチレン樹脂 Primer support 200 amino (GE Healthcare Japan社製、17-5214-97) 25.0g、トリエチルアミン8.5mLを加え、室温で4日間振とうした。反応後、樹脂をろ取した。得られた樹脂をピリジン、メタノール、ジクロロメタンの順で洗浄し、減圧乾燥した。得られた樹脂にテトラヒドロフラン (脱水) 200mL、無水酢酸15mL、2, 6 - ルチジン15mLを加え、室温で2時間振とうした。樹脂をろ取し、ピリジン、メタノール、ジクロロメタンの順で洗浄し、減圧乾燥し、26.7gの目的物を得た。

10

【0101】

当該目的物のローディング量は、公知の方法を用いて、樹脂1g当たりのトリチルのモル量を409nmにおけるUV吸光度を測定することにより決定した。樹脂のローディング量は、129.2 μmol/gであった。

UV測定条件

機器：U-2910 (日立製作所)

溶媒：メタンスルホン酸

波長：409 nm

値：45000

20

【0102】

[参考例2]

アミノポリスチレン樹脂に担持された4 - { [(2S, 6R) - 6 - (5-メチル - 2,4 - ジオキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸

参考例1と同様の方法に従って、標記化合物を製造した。但し、参考例1の工程1で用いたN - {1 - [(2R, 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] - 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロピリミジン - 4 - イル} ベンズアミドの代わりに、本工程では、1 - [(2R, 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] - 5 - メチルピリミジン - 2, 4 (1H, 3H) - ジオンを使用した。

30

当該目的物のローディング量は、公知の方法を用いて、樹脂1g当たりのトリチルのモル量を409nmにおけるUV吸光度を測定することにより決定した。樹脂のローディング量は、164.0 μmol/gであった。

【0103】

[参考例3]

アミノポリスチレン樹脂に担持された4 - { [(2S, 6R) - 6 - (6 - ベンズアミドプリン - 9 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸

参考例1と同様の方法に従って、標記化合物を製造した。但し、参考例1の工程1で用いたN - {1 - [(2R, 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] - 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロピリミジン - 4 - イル} ベンズアミドの代わりに、本工程では、N - {9 - [(2R, 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルフォリン - 2 - イル] プリン - 6 - イル} ベンズアミドを使用した。

40

当該目的物のローディング量は、公知の方法を用いて、樹脂1g当たりのトリチルのモル量を409nmにおけるUV吸光度を測定することにより決定した。樹脂のローディング量は、185.7 μmol/gであった。

【0104】

[参考例4]

アミノポリスチレン樹脂に担持された4 - { { (2S, 6R) - 6 - {6 - (2 - シアノエトキシ

50

) - 2 - [(2 - フェノキシアセチル) アミノ] プリン - 9 - イル } - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル } メトキシ } - 4 - オキソブタン酸

参考例1と同様の方法に従って、標記化合物を製造した。但し、参考例1の工程1で用いたN - { 1 - [(2R , 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] - 2 - オキソ - 1 , 2 - ジヒドロピリミジン - 4 - イル } ベンズアミドの代わりに、本工程では、N - { 6 - (2 - シアノエトキシ) - 9 - [(2R , 6S) - 6 - (ヒドロキシメチル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] プリン - 2 - イル } - 2 - フェノキシアセトアミドを使用した。

当該目的物のローディング量は、公知の方法を用いて、樹脂1g当たりのトリチルのモル量を409nmにおけるUV吸光度を測定することにより決定した。樹脂のローディング量は、164 . 8 $\mu\text{mol/g}$ であった。

10

【 0 1 0 5 】

以下の実施例1の記載に従い、表 1 のPMO No.1 ~ 81の塩基配列を有するPMO (R^2 、 R^3 はメチルで5'末端は基 (3) である) を合成した。合成したPMOを注射用水 (大塚製薬工場社製) で溶解した。

【 0 1 0 6 】

【表 1 - 1】

PMO No.	塩基配列	配列名	配列番号
1	TTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTC	H45_1-13_18-30	14
2	GTTTGCCGCTGCCCTCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11_20-32	7
3	GCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_18-28	15
4	CCGCTGCCCAATGTCTGGAGTTCCT	H45_-2-11_15-27	16
5	TTGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11_18-30	17
6	TTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_21-31	18
7	TTTGCCGCTGCCCTCCTGGAGTTCC	H45_-1-11_20-31	19
8	TGCCGCTGCCCCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_19-29	20
9	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	H45_-2-10_21-32	8
10	CAGTTTGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_20-34	9
11	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	H45_-2-8_19-34	10
12	GTTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-12_20-32	21
13	CAGTTTGCCGCTGCTGGAGTTCCT	H45_-2-8_21-34	22
14	ACAGTTTGCCGCTCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_23-35	23
15	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCT	H45_-2-7_20-34	24
16	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_19-32	25
17	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCTG	H45_-3-7_20-34	26
18	CCGCTGCCCAATGTGGAGTTCCTGT	H45_-4-8_15-27	27
19	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	H45_1-8_19-34	28
20	CCGCTGCCCAATCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_16-27	29
21	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_19-34	30
22	TTGCCGCTGCCCCACTGGAGTTCCT	H45_-2-9_18-30	31
23	TTGCCGCTGCCCCACTGGAGTTCCTGT	H45_-4-9_18-30	32
24	ACAGTTTGCCGCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_25-35	33
25	GTTTGCCGCTGC	H45_21-32	34
26	CCTGGAGTTCCT	H45_-2-10	35
27	TGGAGTTCCT	H45_-2-8	36
28	CAGTTTGCCGCTGCCC	H45_19-34	37
29	TCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	H45_2-14_53-65	38
30	AGACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTT	H45_2-14_136-148	39
31	TTCTTCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_52-66	11
32	CAGACCTCCTGCCACGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_135-149	12
33	GACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTTC	H45_1-14_136-147	40

【 0 1 0 7 】

【表 1 - 2】

34	TCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_52-62	41	10
35	GACCTCCTGCCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_137-147	42	
36	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-14_53-64	43	
37	TTCCCCAGTTGCACATCCTGGAGTTC	H45_1-13_51-63	44	
38	CCTCCTGCCACCGCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_133-145	45	
39	ACCTCCTGCCACCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_134-146	46	
40	TTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_55-67	47	
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_138-150	48	
42	TTCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_52-66	49	
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_50-61	50	20
44	TTCTTCCCCAGTTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_52-66	51	
45	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_52-64	52	
46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGTTC	H45_1-11_135-149	53	
47	TGCAGACCTCCTGCCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_137-151	54	
48	CTGTTTGCAGACCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_144-156	55	
49	TTTGCAGACCTCCTGGAGTTCCTGTA	H45_-5-8_141-153	56	
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_128-142	57	
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGCCGCTGCCCAAT	H45_16-30_132-146	58	
52	TCCTGTAGAATACCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_98-110	59	30
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTTTT	H45_85-97_132-144	60	
54	ACCTCCTGCCACCGCTCTTCCCCAGTTGCA	H45_51-65_132-146	61	
55	TGGCATCTGTTTTTCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_85-97	62	
56	TTATTTCTTCCCCAGTTCTGTAAGA	H45_-8-5_58-70	63	
57	GCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTCC	H45_-1-15_114-123	64	
58	GGCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_114-124	65	
59	TTTCTGTCTGACAGCTCCTGCCACCGCAGA	H45_129-143_156-170	66	
60	TCCTGCCACCGCAGAGAGGATTGCTGAATT	H45_69-83_129-143	67	
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCTGTTTTT	H45_84-98_129-143	68	40
62	TCCTGCCACCGCAGATTTTCTGTAGAATA	H45_99-113_129-143	69	
63	GCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15	70	
64	TTCTTCCCCAGTTGC	H45_52-66	71	
65	CAGACCTCCTGCCAC	H45_135-149	72	
66	TCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11	73	
67	GTTTGCCGCTGCC	H45_20-32	74	
68	CTCCTGCCACCGCGCCGCTGCCCAAT	H45_16-28_132-144	75	

【表 1 - 3】

69	ATTCAGGCTTCCCTTCCCCAGTTGCA	H45_51-63_117-129	76
70	TGGAGTTCC	H45_-1-8	77
71	TGGAGTTC	H45_1-8	78
72	CAGTTTGCCGCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_25-34	79
73	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_25-35	80
74	GTTTGCCGCTGCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_20-32	81
75	AACAGTTTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_26-36	82
76	CAGTTTGCCGCCTGGAGTTC	H45_1-10_25-34	83
77	CAGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_24-34	84
78	AGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_24-33	85
79	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	H45_-1-9_25-35	86
80	TGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCC	H45_-1-11_18-29	87
81	CTGCCACCGCAGCCGCTGCCCAATGC	H45_14-27_130-141	88
82	CCTGGAGTTCC	H45_-1-10	144
83	CAGTTTGCCG	H45_25-34	145
84	ACAGTTTGCCG	H45_25-35	146

10

20

【 0 1 0 9 】

[実施例1]

5'末端塩基に対応する、アミノポリスチレン樹脂に担持された4 - { [(2S, 6R) - 6 - (4 - ベンズアミド - 2 - オキソピリミジン - 1(2H) - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸 (参考例1)、もしくは、アミノポリスチレン樹脂に担持された4 - { [(2S, 6R) - 6 - (5-メチル - 2,4 - ジオキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸 (参考例2)、もしくは、アミノポリスチレン樹脂に担持された4 - { [(2S, 6R) - 6 - (6 - ベンズアミドプリン - 9 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸 (参考例3)、もしくは、アミノポリスチレン樹脂に担持された4 - { { (2S, 6R) - 6 - { 6 - (2 - シアノエトキシ) - 2 - [(2 - フェノキシアセチル) アミノ] プリン - 9 - イル } - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル } メトキシ } - 4 - オキソブタン酸 (参考例4) 0.2gをフィルター付きカラムに充填し、核酸合成機 (AKTA Oligopilot 10 plus) を使用して、下記合成サイクルを開始した。表1に記載の各化合物の塩基配列になるよう、各カップリングサイクルにおいて所望のモルホリノモノマー化合物を添加した(下記表2を参照)。

30

【 0 1 1 0 】

40

【表 2】

ステップ	試薬	量 (mL)	時間 (分)
1	デブロック溶液	18～32	1.8～3.2
2	中和・洗浄溶液	30	1.5
3	カップリング溶液 B	5	0.5
4	カップリング溶液 A	1.3	0.25
5	ステップ 3 と 4 で投入した試薬によるカップリング反応		120～300
6	アセトニトリル	20	1.0
7	キャッピング溶液	9	2.0
8	アセトニトリル	30	2.0

(注) 3' 末端アセチル化の場合のみ、最終サイクルの後、ステップ 1, 2, 7, 8 のみを再度実施。

【 0 1 1 1 】

なお、デブロック溶液としては、3% (w/v) トリフルオロ酢酸を含有するジクロロメタン溶液を用いた。中和・洗浄溶液としては、N, N - ジイソプロピルエチルアミンを10% (v/v) になるように、かつテトラヒドロフランを5% (v/v) になるように、35% (v/v) のアセトニトリル含有するジクロロメタン溶液で溶解したものをを用いた。カップリング溶液 A としては、モルホリノモノマー化合物を0.10Mになるように、テトラヒドロフランで溶解したものをを用いた。カップリング溶液 B としては、N, N - ジイソプロピルエチルアミンを20% (v/v) になるように、かつテトラヒドロフランを10% (v/v) になるように、アセトニトリルで溶解したものをを用いた。キャッピング溶液としては、アセトニトリルに対して20% (v/v) の無水酢酸と30% (v/v) の2, 6 - ルチジンを溶解したものをを使用した。

【 0 1 1 2 】

上記で合成したPMOが担持されたアミノポリスチレン樹脂を反応容器から回収し、2時間以上室温で減圧乾燥した。乾燥したアミノポリスチレン樹脂に担持されたPMOを反応容器に入れ、28%アンモニア水 - エタノール (1/4) 5mLを加え、55℃で15時間撹拌した。アミノポリスチレン樹脂をろ別し、水 - エタノール (1/4) 1mLで洗浄した。得られたる液を減圧濃縮した。得られた残渣を20mMの酢酸 - トリエチルアミン緩衝液 (TEAA緩衝液) とアセトニトリルの混合溶媒 (4/1) 10mLに溶解し、メンブレンフィルターでろ過した。得られたる液を逆相HPLCにて精製した。使用した条件は、以下の表3に示す通りである。

【 0 1 1 3 】

【表 3】

カラム	XBridge 5 μ m C18 (Waters, ϕ 19×50mm, 1CV=14mL)
流速	10mL/分
カラム温度	室温
A 液	20mM TEAA 緩衝液
B 液	CH ₃ CN
Gradient	(B) conc. 10→70%/15CV

10

CV : カラムボリューム

【 0 1 1 4 】

各フラクションを分析して、目的物を回収し、減圧濃縮した。濃縮残渣に2Mのリン酸水溶液0.5mLを加え、15分間攪拌した。さらに、2Mの水酸化ナトリウム水溶液2mLを加えてアルカリ性とし、メンブレンフィルター（0.45 μ m）でろ過した。

得られた目的物を含有する水溶液を陰イオン交換樹脂カラムで精製した。使用した条件は下記表4に示す通りである。

【 0 1 1 5 】

20

【表 4】

カラム	Source 15Q (GE Healthcare, ϕ 10×108mm, 1CV=8.5mL)
流速	8.5mL/min
カラム温度	室温
A 液	10mM の水酸化ナトリウム水溶液
B 液	10mM の水酸化ナトリウム水溶液, 1M の塩化ナトリウム水溶液
Gradient	(B) conc. 1→50%/40CV

30

【 0 1 1 6 】

各フラクションを分析（HPLC）し、目的物を水溶液として得た。得られた水溶液に0.1Mのリン酸緩衝液（pH 6.0）を添加し中和した。次いで、下記表5に示す条件で逆相HPLCにて脱塩した。

【 0 1 1 7 】

【表 5】

40

カラム	XBridge 5 μ m C8 (Waters, ϕ 10×50mm, 1CV=4mL)
流速	4mL/分
カラム温度	60°C
A 液	水
B 液	CH ₃ CN
Gradient	(B) conc. 0→50%/20CV

50

【 0 1 1 8 】

目的物を回収し、減圧濃縮した。得られた残渣を水に溶かし、凍結乾燥して、白色綿状固体として目的化合物を得た。ESI-TOF-MSの計算値、測定値を下記表6に示す。

【 0 1 1 9 】

【表 6 - 1】

PMO No.	塩基配列	計算値	測定値	
1	TTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTC	8520.95	8520.65	
2	GTTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTCCT	8542.94	8542.57	
3	GCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTCCT	8505.95	8506.57	
4	CCGCTGCCCAATGTCCTGGAGTTCCT	8520.95	8521.37	
5	TTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTCCT	8511.94	8511.70	
6	TTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	8526.94	8527.07	10
7	TTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTCCT	7857.71	7857.32	
8	TGCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTC	8521.95	8521.98	
9	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	7897.72	7897.71	
10	CAGTTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	9851.40	9851.60	
11	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	8551.95	8551.80	
12	GTTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	8236.84	8236.69	
13	CAGTTTGCCGCTGCTGGAGTTCCT	7921.73	7921.91	20
14	ACAGTTTGCCGCTCTGGAGTTCCT	7905.73	7905.53	
15	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCT	7906.73	7906.65	
16	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	7567.61	7567.35	
17	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCTG	8261.85	8261.67	
18	CCGCTGCCCAATGTGGAGTTCCTGT	8245.85	8245.68	
19	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	7906.73	7906.70	
20	CCGCTGCCCAATCTGGAGTTCCT	7520.61	7520.60	
21	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	8221.84	8221.48	30
22	TTGCCGCTGCCACTGGAGTTCCT	7866.72	7866.77	
23	TTGCCGCTGCCACTGGAGTTCCTGT	8551.95	8552.23	
24	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCCT	7245.51	7245.48	
25	GTTTGCCGCTGC	3912.36	3912.16	
26	CCTGGAGTTCCT	3896.36	3896.12	
27	TGGAGTTCCT	3266.14	3265.99	
28	CAGTTTGCCGCTGCCC	5196.81	5196.30	40
29	TCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	8510.93	8511.8	
30	AGACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTT	8513.95	8513.72	
31	TTCTTCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	9826.39	9826.15	
32	CAGACCTCCTGCCACGCCATCCTGGAGTTC	9814.41	9813.82	
33	GACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTTC	8489.95	8490.01	

【 0 1 2 0 】

【表 6 - 2】

34	TCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	8520.95	8520.97	10
35	GACCTCCTGCCGCCATCCTGGAGTTC	8505.95	8506.48	
36	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	8495.94	8495.43	
37	TTCCCCAGTTGCACATCCTGGAGTTC	8519.95	8520.35	
38	CCTCCTGCCACCGCATCCTGGAGTTC	8465.94	8466.23	
39	ACCTCCTGCCACCCATCCTGGAGTTC	8449.94	8449.88	
40	TTTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGTTC	8485.93	8486.01	
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGTTC	8529.96	8529.54	
42	TTCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	9156.16	9156.62	
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTTCCT	7535.61	7535.92	
44	TTCTTCCCCAGTTGCCCTGGAGTTCC	8486.93	8486.27	20
45	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTCCT	9141.16	9141.18	
46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGTTC	8489.95	8489.65	
47	TGCAGACCTCCTGCCTCCTGGAGTTC	8520.95	8520.58	
48	CTGTTTGACAGACCCATCCTGGAGTTC	8559.96	8560.66	
49	TTTGCAGACCTCCTGGAGTTCCTGTA	8574.96	8574.85	
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTGGAGTTC	9854.42	9854.07	
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGCCGCTGCCAAT	9750.39	9750.67	
52	TCCTGTAGAATACCATCCTGGAGTTC	8567.97	8567.11	
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTTTT	8486.93	8486.39	30
54	ACCTCCTGCCACCGCTCTTCCCCAGTTGCA	9725.38	9725.57	
55	TGGCATCTGTTTTTCATCCTGGAGTTC	8580.95	8580.81	
56	TTATTTCTTCCCCAGTTCTGTGAAGA	8508.94	8508.7	
57	GCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTCC	8504.95	8504.88	
58	GGCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	8544.96	8544.72	
59	TTTCTGTCTGACAGCTCCTGCCACCGCAGA	9844.41	9844.1	
60	TCCTGCCACCGCAGAGAGGATTGCTGAATT	9957.45	9957.8	
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCTGTTTTT	9850.4	9850.45	
62	TCCTGCCACCGCAGATTTTCTGTAGAATA	9867.42	9867.85	40
63	GCCATCCTGGAGTTC	4905.71	4905.02	
64	TTCTTCCCCAGTTGC	4831.68	4831.14	
65	CAGACCTCCTGCCAC	4819.7	4819.64	
66	TCCTGGAGTTCCT	4226.47	4226.03	
67	GTTTGCCGCTGCC	4227.47	4227.48	
68	CTCCTGCCACCGCGCCGCTGCCAAT	8435.93	8436.58	

【 0 1 2 1 】

【表 6 - 3】

69	ATTCAGGCTTCCCTTCCCCAGTTGCA	8479.93	8479.03
70	TGGAGTTCC	2936.03	2936.07
71	TGGAGTTC	2620.92	2620.97
72	CAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	6906.39	6906.44
73	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCCT	7260.51	7260.67
74	GTTTGCCGCTGCCTGGAGTTCC	7252.5	7252.48
75	AACAGTTTGCCCTGGAGTTCC	7229.51	7229.07
76	CAGTTTGCCGCTGGAGTTC	6591.28	6591.07
77	CAGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	7236.5	7236.76
78	AGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	6921.39	6921.06
79	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	6930.4	6930.42
80	TGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCC	7851.72	7852.1
81	CTGCCACCGCAGCCGCTGCCCAATGC	8484.96	8484.68
82	CCTGGAGTTCC	3566.25	3566.51
83	CAGTTTGCCG	3251.14	3251.19
84	ACAGTTTGCCG	3590.26	3590.04

【 0 1 2 2 】

[試験例1]

In vitroアッセイ

RD細胞（ヒト横紋筋肉腫細胞株） 3.5×10^5 個に対して、表1のアンチセンスオリゴマー1～10 μ MをAmaxa Cell Line Nucleofector Kit Lを用いてNucleofector II（Lonza）により導入した。プログラムはT-030を用いた。

導入後、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）2mL中、37℃、5% CO₂条件下で三晩培養した。

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 RLT（キアゲン社製）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、QIAshredder ホモジナイザー（キアゲン社製）に回収した。15,000 rpmで2分間遠心し、ホモジネートを作製した。RNeasy Mini Kit（キアゲン社製）に添付のプロトコールに従ってtotal RNAを抽出した。抽出したtotal RNAの濃度はNanoDrop ND-1000（エル・エム・エス社製）を用いて測定した。

【 0 1 2 3 】

抽出したtotal RNA 400 ngに対し、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit（キアゲン社製）を用いてOne-Step RT-PCRを行った。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PTC-100（MJ Research社製）又は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]x 35サイクル：PCR増幅

72℃、10分間：最終伸長反応

【 0 1 2 4 】

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' -GCTCAGGTCGGATTGACATT-3' (配列番号1)

リバースプライマー：5' -GGGCAACTCTTCCACCAGTA -3' (配列番号2)

【 0 1 2 5 】

上記PCRの反応産物1 μL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。

10

エクソン45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45がスキップしなかったバンドのポリヌクレオチド量「B」を測定した。これら「A」及び「B」の測定値に基づき、以下の式に従って、スキッピング効率を求めた。

$$\text{スキッピング効率 (\%)} = A / (A + B) \times 100$$

【 0 1 2 6 】

実験結果結果を図1～5、8、10、11及び16～24に示す。本実験により、本発明のオリゴマーはエクソン45を有効にスキッピングさせることが判明した。

20

【 0 1 2 7 】

[試験例2]

In vitroアッセイ

試験例1と同様の方法で実験を行った。但し、RD細胞 (ヒト横紋筋肉腫細胞株) 3.5×10^5 個に対して、本発明オリゴマー単独 (PMO NO.11又はPMO NO.9)、それぞれを構成している2本の個々のユニットオリゴマー、又はその混合物を各3 μMの濃度でAmaxa Cell Line Nucleofector Kit Lを用いてNucleofector II (Lonza) により導入した。プログラムはT-030を用いた。導入した配列の組み合わせは以下の通りである。

【 0 1 2 8 】

【表 7】

導入配列の組み合わせ

配列組み合わせ	導入濃度 (μ M)
PMO NO. 11 (PMO No. 27とPMO No. 28の連結)	3 μ M
PMO NO. 27	3 μ M
PMO NO. 28	3 μ M
PMO NO. 27 及び PMO NO. 28	各3 μ M
PMO NO. 9 (PMO No. 25とPMO No. 26の連結)	3 μ M
PMO NO. 25	3 μ M
PMO NO. 26	3 μ M
PMO NO. 25 及び PMO NO. 26	各3 μ M
PMO NO. 72 (PMO NO. 82とPMO NO. 83の連結)	3 μ M
PMO NO. 82	3 μ M
PMO NO. 83	3 μ M
PMO NO. 82 及び PMO NO. 83	各3 μ M

10

20

【 0 1 2 9 】

実験結果

結果を図6、25に示す。本実験により、エクソン45内の異なる部位を標的とする2本のアンチセンスオリゴマーを連結したPMO NO.11 (配列番号10)、PMO NO.9 (配列番号8)、又はPMO NO.72 (配列番号79) の本発明のオリゴマーは、それを構成する個々のアンチセンスオリゴマー (PMO NO.27 (配列番号36)、PMO NO.28 (配列番号37)、PMO NO.25 (配列番号34)、PMO NO.26 (配列番号35)、PMO NO.82 (配列番号144)、又はPMO NO.83 (配列番号145)) 又はその混合物 (PMO NO.27 及び PMO NO.28、PMO NO.25 及び PMO NO.26、又はPMO NO.82及びPMO NO.83) と比較して、高い効率でエクソン45をスキッピングさせることが判明した。

30

【 0 1 3 0 】

〔試験例 3〕

In vitroアッセイ 配列番号89～141、11及び12に記載の 2' - O - メトキシ - ホスホロチオエート体 (2' - OMe - S - RNA) のアンチセンスオリゴマーを用いて実験を行った。アッセイに用いた各種アンチセンスオリゴマーは日本バイオサービス社より購入した。各種アンチセンスオリゴマーの配列を以下に示す。

40

【 0 1 3 1 】

【表 8 - 1】

配列名	塩基配列	配列番号
H45_1-15_48-62	UCCCCAGUUGCAUUCGCCAUCCUGGAGUUC	89
H45_1-15_56-70	UUAUUUCUCCCCAGGCCAUCCUGGAGUUC	90
H45_1-15_131-145	CCUCCUGCCACCGCAGCCAUCCUGGAGUUC	91
H45_-2-13_131-145	CCUCCUGCCACCGCACAUCUGGAGUCCU	92
H45_-2-13_135-149	CAGACCUCUGGCCACCAUCUGGAGUCCU	93
H45_-2-13_48-62	UCCCCAGUUGCAUCCAUCUGGAGUCCU	94
H45_-2-13_52-66	UUCUCCCCAGUUGCAUCUGGAGUCCU	95
H45_-2-13_56-70	UUAUUUCUCCCCAGCAUCUGGAGUCCU	96
H45_-2-13_18-32	GUUUGCCGCUGCCACAUCUGGAGUCCU	97
H45_-2-13_139-153	UUUGCAGACCUCUGCAUCUGGAGUCCU	98
H45_1-17_135-147	GACCUCUGGCCACAUGCCAUCUGGAGUUC	99
H45_1-17_52-64	CUUCCCCAGUUGCAUGCCAUCUGGAGUUC	100
H45_1-15_139-153	UUUGCAGACCUCUGGCCAUCCUGGAGUUC	101
H45_-2-13_99-113	UUUUCUGUAGAAUACAUCUGGAGUCCU	102
H45_53-67_132-146	ACCUCUGGCCACCGCUUUCUCCCCAGUUG	103
H45_16-30_99-113	UUUUCUGUAGAAUUAUGCCGCUGCCCAAU	104
H45_1-15_153-167	CUGUCUGACAGCUGUGCCAUCUGGAGUUC	105
H45_1-15_67-81	GGAUUGCUGAAUUAUGCCAUCUGGAGUUC	106
H45_1-15_99-113	UUUUCUGUAGAAUAGCCAUCUGGAGUUC	107
H45_1-13_46-58	CAGUUGCAUUAACAUCUGGAGUUC	108
H45_1-13_54-66	UUCUCCCCAGUUCAUCUGGAGUUC	109
H45_1-13_62-74	UGAAUUAUUUCUUAUCUGGAGUUC	110
H45_6-18_46-58	CAGUUGCAUUCAAAUGCCAUCUGG	111
H45_6-18_54-66	UUCUCCCCAGUUAAGCCAUCUGG	112
H45_6-18_62-74	UGAAUUAUUUCUUAAGCCAUCUGG	113
H45_1-13_121-133	GCAGAUUCAGGCUCAUCUGGAGUUC	114
H45_1-13_129-141	CUGCCACCGCAGACAUCUGGAGUUC	115
H45_1-13_137-149	CAGACCUCUGCCCAUCUGGAGUUC	116
H45_6-18_121-133	GCAGAUUCAGGCUAAUGCCAUCUGG	117
H45_6-18_129-141	CUGCCACCGCAGAAAUGCCAUCUGG	118
H45_6-18_137-149	CAGACCUCUGCCAAUGCCAUCUGG	142
H45_16-28_116-128	UUCAGGCUUCCAGCCGCUGCCCAAU	119
H45_16-28_124-136	ACCGCAGAUUCAGGCCGCUGCCCAAU	120

10

20

30

40

【 0 1 3 2 】

【表 8 - 2】

H45_16-28_132-144	CUCCUGCCACCGCGCCGUGCCCAAU	121
H45_26-38_116-128	UUCAGGCUUCCCAACAACAGUUUGCC	122
H45_26-38_124-136	ACCGCAGAUUCAGACAACAGUUUGCC	123
H45_26-38_132-144	CUCCUGCCACCGCACAACAGUUUGCC	124
H45_51-63_110-122	CUUCCCAAUUUUUUUCCCGAGUUGCA	125
H45_51-63_117-129	AUUCAGGCUUCCCUUCCCGAGUUGCA	126
H45_51-63_124-136	ACCGCAGAUUCAGAUUCCCGAGUUGCA	127
H45_60-72_110-122	CUUCCCAAUUUUUAAUUAUUUCUCC	128
H45_60-72_117-129	AUUCAGGCUUCCCAAUUAUUUCUCC	129
H45_60-72_124-136	ACCGCAGAUUCAGAAUUAUUUCUCC	130
H45_68-80_110-122	CUUCCCAAUUUUUGAUUGCUGAAUUA	131
H45_68-80_117-129	AUUCAGGCUUCCCGAUUGCUGAAUUA	132
H45_68-80_124-136	ACCGCAGAUUCAGGAUUGCUGAAUUA	133
H45_-10-5_52-66	UUCUCCCCAGUUGCAGUCCUGUAAGAUA	134
H45_-10-5_135-149	CAGACCUCUGCCACAGUCCUGUAAGAUA	135
H45_69-83_95-109	CCUGUAGAAUACUGGGAGGAUUGCUGAAUU	136
H45_16-30_84-98	CUGGCAUCUGUUUUUUGCCGUGCCCAAU	137
H45_16-30_53-67	UUUCUCCCCAGUUGUUGCCGUGCCCAAU	138
H45_1-15_84-98	CUGGCAUCUGUUUUUGCCAUCUGGAGUUC	139
H45_84-98_132-146	ACCUCUGGCCACCGCCUGGCAUCUGUUUUU	140
H45_53-67_99-113	UUUUCUGUAGAAUUAUUUCUCCCCAGUUG	141
H45_1-15_52-66	UUCUCCCCAGUUGCGCCAUCUGGAGUUC	11
H45_1-15_135-149	CAGACCUCUGCCACGCCAUCUGGAGUUC	12

【 0 1 3 3 】

24穴プレートにRD細胞（ヒト横紋筋肉腫細胞株） 5×10^4 個を播種し、10%ウシ胎児血清（FCS）（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）0.5mL中、37℃、5% CO₂条件下で一晩培養した。上記のエクソン45スキッピング用の各種アンチセンスオリゴマー（日本バイオサービス社製）（1μM又は300 nM）とLipofectamine2000（インビトロジェン社製）の複合体を作成し、0.45mLで培地交換したRD細胞に、1ウェルあたり50μLを添加し、終濃度100nM又は30nMとした。

添加後、一晩培養した。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 RLT（キアゲン社製）を350μL細胞に添加し、数分間室温に放置して細胞を溶解させ、QIAshredder ホモジナイザー（キアゲン社製）に回収した。15,000 rpmで2分間遠心し、ホモジネートを作製した。RNeasy Mini Kit（キアゲン社製）に添付のプロトコールに従ってtotal RNAを抽出した。抽出したtotal RNAの濃度はNanoDrop ND-1000（エル・エム・エス社製）を用いて測定した。

【 0 1 3 4 】

抽出したtotal RNA 400 ngに対し、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit（キアゲン社製）を用いてOne-Step RT-PCRを行った。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PTC-100 (MJ Research社製) 又は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]x 35サイクル：PCR増幅
 72 、10分間：最終伸長反応

【0135】

10

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' -GCTCAGGTCGGATTGACATT-3' (配列番号1)
 リバースプライマー：5' -GGGCAACTCTCCACCAGTA -3' (配列番号2)

【0136】

上記PCRの反応産物1 μLをBioanalyzer (アジレント社製)、及びMultiNA(島津製作所社製)を用いて解析した。

エクソン45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45がスキップしなかったバンドのポリヌクレオチド量「B」を測定した。これら「A」及び「B」の測定値に基づき、以下の式に従って、スキッピング効率を求めた。

20

$$\text{スキッピング効率}(\%) = A / (A + B) \times 100$$

【0137】

実験結果

結果を図7、12～15に示す。本実験により、本発明のアンチセンスオリゴマーは有効にエクソン45をスキッピングさせることが判明した。

【0138】

[試験例4]

30

In vitroアッセイ

試験例1と同様の方法で実験を行った。但し、RD細胞(ヒト横紋筋肉腫細胞株) 3.5×10^5 個に対して、本発明オリゴマー単独(PMO NO.2、PMO NO.31又はPMO NO.32)、それぞれを構成している2本の個々のユニットオリゴマーを各3 μM又は10 μMの濃度でAmaxa Cell Line Nucleofector Kit Lを用いてNucleofector II (Lonza) により導入した。プログラムはT-030を用いた。導入した配列の組み合わせは以下の通りである。

【0139】

【表 9】

配列	導入濃度
PMO No. 2 (PMO No. 66とPMO No. 67の連結)	3 μ M または10 μ M
PMO No. 66	3 μ M または10 μ M
PMO No. 67	3 μ M または10 μ M
PMO No. 31 (PMO No. 63とPMO No. 64の連結)	3 μ M または10 μ M
PMO No. 63	3 μ M または10 μ M
PMO No. 64	3 μ M または10 μ M
PMO No. 32 (PMO No. 63とPMO No. 65の連結)	3 μ M または10 μ M
PMO No. 65	3 μ M または10 μ M

10

【 0 1 4 0 】

20

実験結果

結果を図 9 に示す。本実験により、エクソン45内の異なる部位を標的とする2本のアンチセンス核酸を連結したPMO No.2 (配列番号7)、PMO No.31 (配列番号11) 又は PMO No.32 (配列番号12) の本発明のオリゴマーは、それを構成する個々のアンチセンス核酸 (PMO No.66、PMO No.63、PMO No.64、又はPMO No.65) と比較して、高い効率でエクソン45をスキッピングさせることが判明した。

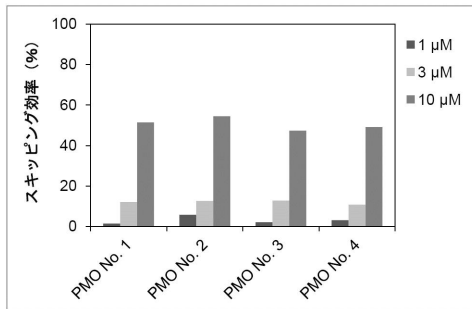
【産業上の利用可能性】

【 0 1 4 1 】

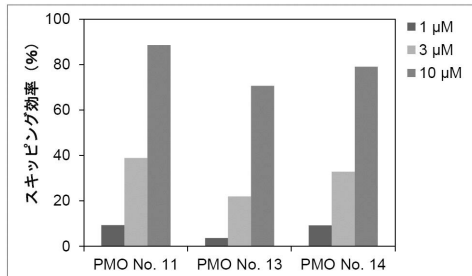
試験例に示す実験結果から、短いオリゴマーを連結した本発明のオリゴマーは、RD細胞においてエクソン45のスキッピングを引き起こすことが示された。従って、本発明のオリゴマーは、DMDの治療において非常に有用である。

30

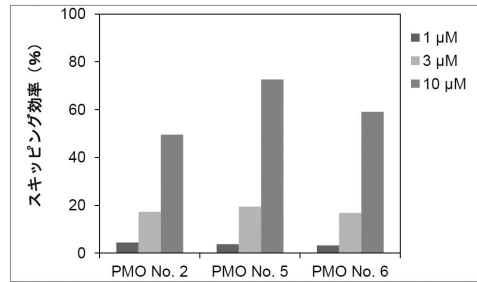
【図 1】



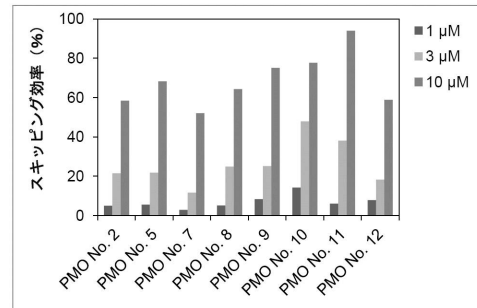
【図 2】



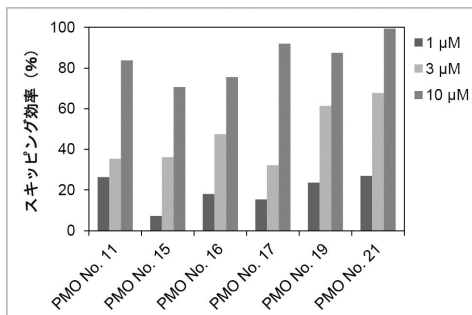
【図 3】



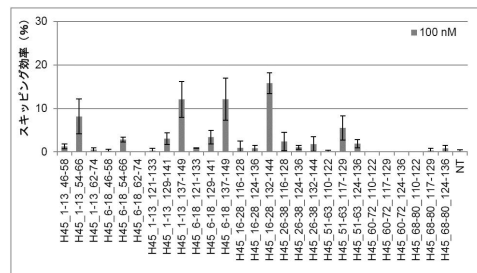
【図 4】



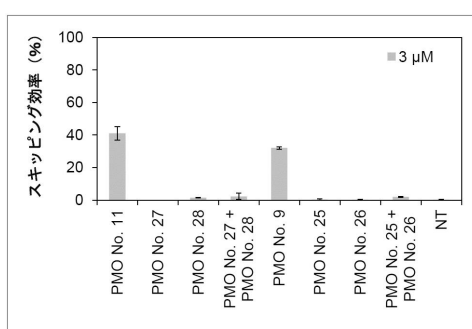
【図 5】



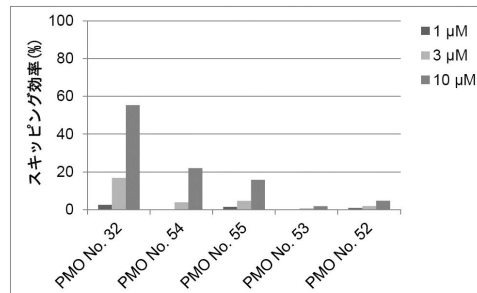
【図 7】



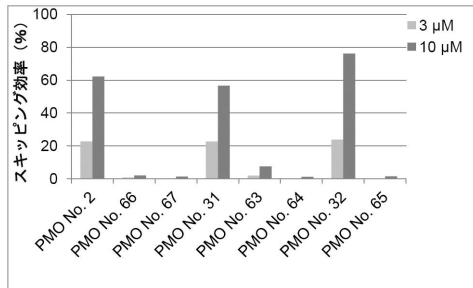
【図 6】



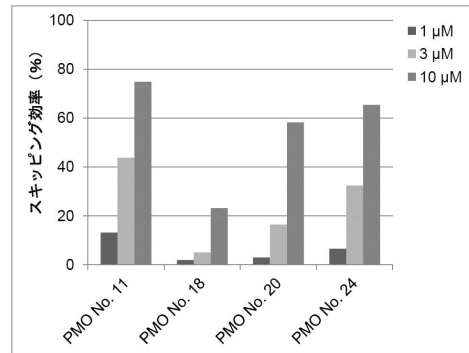
【図 8】



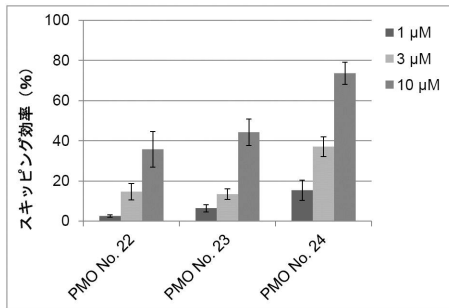
【 図 9 】



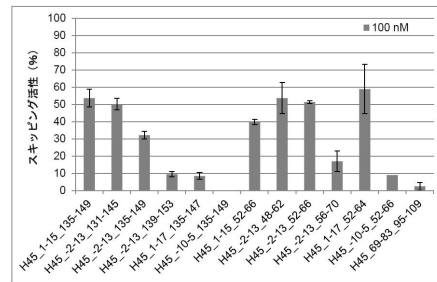
【 図 1 1 】



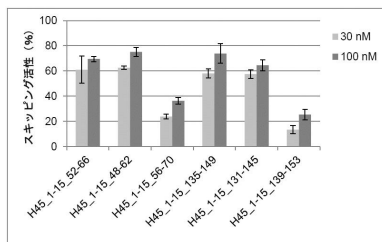
【 図 1 0 】



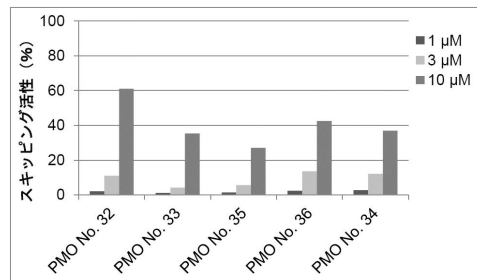
【 図 1 2 】



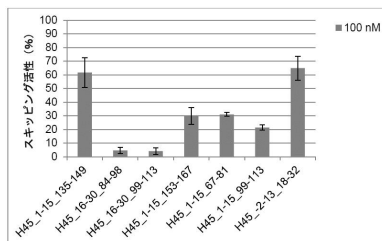
【 圖 1 3 】



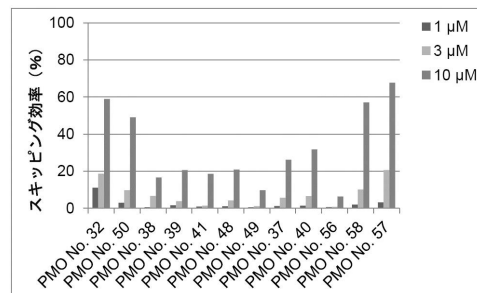
【 図 1 6 】



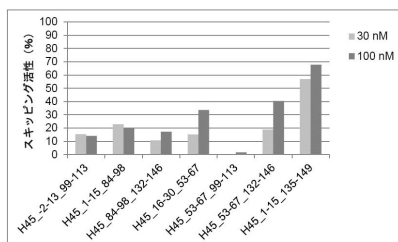
【圖 14】



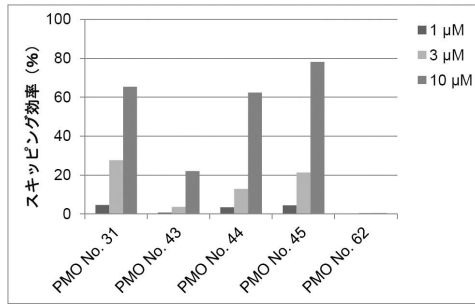
【 図 1 7 】



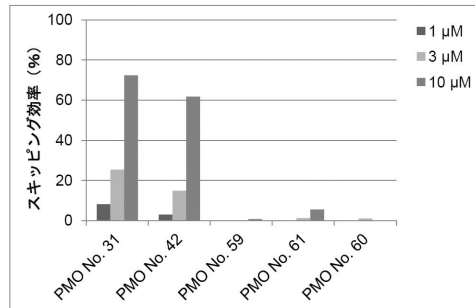
【 図 1 5 】



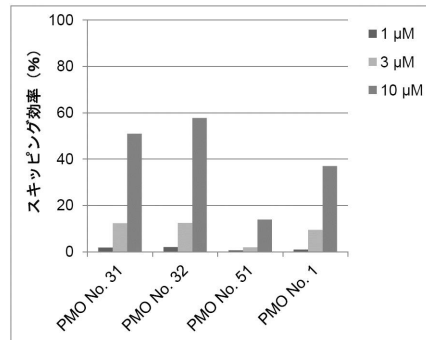
【図 18】



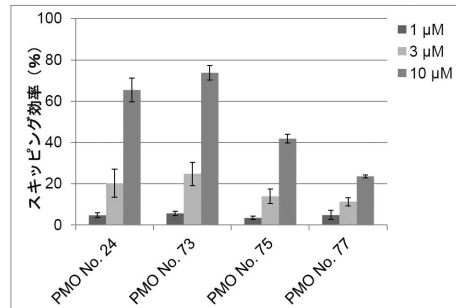
【図 19】



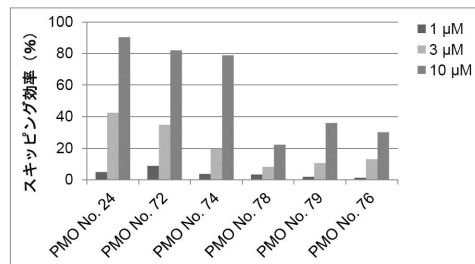
【図 20】



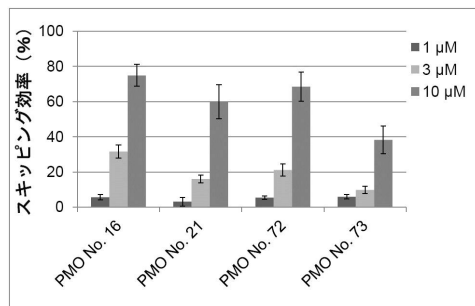
【図 21】



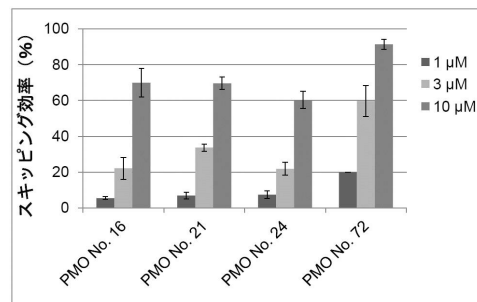
【図 22】



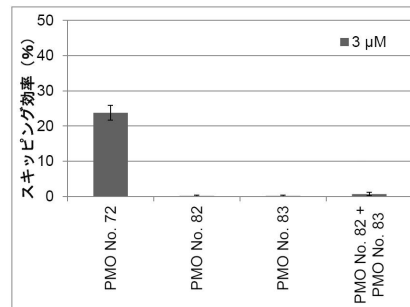
【図 23】



【図 24】



【図 25】



【配列表】

0006384845000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 31/80 (2006.01) A 6 1 K 31/80

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 塩谷 由輝子

茨城県つくば市桜三丁目14-1 日本新薬株式会社内

(72)発明者 戸根 悠一郎

茨城県つくば市桜三丁目14-1 日本新薬株式会社内

(72)発明者 武田 伸一

東京都小平市小川東町4丁目1番1号 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター内

(72)発明者 青木 吉嗣

東京都小平市小川東町4丁目1番1号 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター内

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特表2014-507143(JP,A)

特表2012-506703(JP,A)

特表2012-506697(JP,A)

特表2015-522275(JP,A)

国際公開第2013/100190(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 1/00-15/90

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed