

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-506703

(P2012-506703A)

(43) 公表日 平成24年3月22日 (2012.3.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A G	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 7 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 6
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 104 頁)		

(21) 出願番号 特願2011-533392 (P2011-533392)
 (86) (22) 出願日 平成21年10月23日 (2009.10.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年5月19日 (2011.5.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/061960
 (87) 国際公開番号 W02010/048586
 (87) 国際公開日 平成22年4月29日 (2010.4.29)
 (31) 優先権主張番号 61/108,416
 (32) 優先日 平成20年10月24日 (2008.10.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501237039
 エイブイアイ バイオファーマ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 オレゴン 97333,
 コーバリス, エス. ダブリュー. リサーチ ウェイ 4575, スイート 200
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DMDのための複数のエキソンスキッピング組成物

(57) 【要約】

エキソンスキッピングを誘導するためにヒトジストロフィン遺伝子における選択された標的部位に結合することが可能であるアンチセンス分子、および筋ジストロフィーを治療するためのそのアンチセンス分子の使用方法が提供される。本発明の実施形態は、一般的に、エキソンスキッピングを誘導するために、選択された標的に結合可能であるアンチセンス化合物、およびエキソンスキッピングを誘導するためのそのアンチセンス化合物の使用方法に関する。特定の実施形態において、単一のまたは複数のエキソンスキッピングを誘導するために本発明の2つ以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドを一緒に合わせる事が可能である。

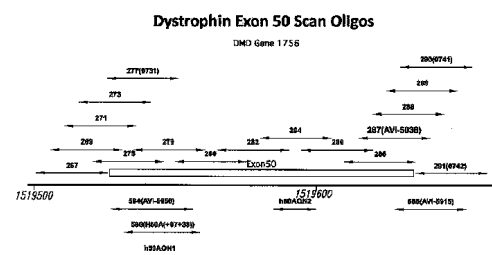


FIG. 3A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトジストロフィンのプレプロセスされた mRNA のプロセッシングにおいてエキソン 4 4 のスキップを生じる際に使用するための組成物であって、該組成物は、

1 つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの 5' 環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている 20 ～ 35 個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物を含み、該化合物は、配列番号 1 ～ 20 からなる群より選択される配列を含み、かつ該ジストロフィン遺伝子エキソン 4 4 における相補 mRNA 配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、該化合物と mRNA の間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも 45℃ の T_m を有する、組成物。

10

【請求項 2】

前記化合物が配列番号 8、11、および 12 からなる群より選択される配列を含有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記化合物が、配列番号 570 ～ 578 からなる群より選択される配列を有するアルギニンリッチペプチドに結合体化されている、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

ヒトジストロフィンのプレプロセスされた mRNA のプロセッシングにおいてエキソン 4 5 のスキッピングを生じる際に使用するための組成物であって、該組成物は、

20

1 つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの 5' 環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている 20 ～ 35 個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物を含み、該化合物は、配列番号 21 ～ 76 および 612 ～ 624 からなる群より選択される配列を含み、かつ該ジストロフィン遺伝子エキソン 4 5 における相補 mRNA 配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、該化合物と mRNA の間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも 45℃ の T_m を有する、組成物。

【請求項 5】

前記化合物が配列番号 27、29、34、および 39 からなる群より選択される配列を含有する、請求項 4 に記載の組成物。

30

【請求項 6】

前記化合物が配列番号 29 および 34 からなる群より選択される配列を含有する、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記化合物が、配列番号 570 ～ 578 からなる群より選択される配列を有するアルギニンリッチペプチドに結合体化されている、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 8】

ヒトジストロフィンのプレプロセスされた mRNA のプロセッシングにおいてエキソン 4 6 のスキッピングを生じる際に使用するための組成物であって、該組成物は、

40

1 つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの 5' 環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている 20 ～ 35 個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物を含み、該化合物は、配列番号 77 ～ 125 からなる群より選択される配列を含み、かつ該ジストロフィン遺伝子エキソン 4 6 における相補 mRNA 配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、該化合物と mRNA の間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも 45℃ の T_m を有する、組成物。

【請求項 9】

前記化合物が配列番号 77 ～ 105 からなる群より選択される配列を含有する、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

50

前記化合物が配列番号 82、84～87、90、96、98、99、および 101 からなる群より選択される配列を含有する、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記化合物が、配列番号 570～578 からなる群より選択される配列を有するアルギニンリッチペプチドに結合体化されている、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 12】

ヒトジストロフィンのプレプロセスされた mRNA のプロセッシングにおいてエキソン 47 のスキッピングを生じる際に使用するための組成物であって、該組成物は、

1 つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの 5' 環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている 20～35 個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物を含み、該化合物は、配列番号 126～169 からなる群より選択される配列を含み、かつ該ジストロフィン遺伝子エキソン 47 における相補 mRNA 配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、該化合物と mRNA の間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも 45℃ の T_m を有する、組成物。

10

【請求項 13】

前記化合物が配列番号 126～149 からなる群より選択される配列を含有する、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記化合物が配列番号 126、128～130、132、144、および 146～149 からなる群より選択される配列を含有する、請求項 13 に記載の組成物。

20

【請求項 15】

前記化合物が、配列番号 570～578 からなる群より選択される配列を有するアルギニンリッチペプチドに結合体化されている、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 16】

ヒトジストロフィンのプレプロセスされた mRNA のプロセッシングにおいてエキソン 48 のスキッピングを生じる際に使用するための組成物であって、該組成物は、

1 つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの 5' 環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている 20～35 個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物を含み、該化合物は、配列番号 170～224、および 634 からなる群より選択される配列を含み、かつ該ジストロフィン遺伝子エキソン 48 における相補 mRNA 配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、該化合物と mRNA の間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも 45℃ の T_m を有する、組成物。

30

【請求項 17】

前記化合物が配列番号 170～201、および 634 からなる群より選択される配列を含有する、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記化合物が配列番号 176、178、181～183、194、および 198～201 からなる群より選択される配列を含有する、請求項 17 に記載の組成物。

40

【請求項 19】

前記化合物が、配列番号 570～578 からなる群より選択される配列を有するアルギニンリッチペプチドに結合体化されている、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 20】

ヒトジストロフィンのプレプロセスされた mRNA のプロセッシングにおいてエキソン 49 のスキッピングを生じる際に使用するための組成物であって、該組成物は、

1 つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの 5' 環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている 20～35 個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物を含み、該化合物は、配列番号 225～266 からなる群より選択される配列を含み、かつ該ジストロフ

50

ィン遺伝子エキソン４９における相補mRNA配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、該化合物とmRNAの間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも４５℃のTmを有する、組成物。

【請求項２１】

前記化合物が配列番号２２５～２４８からなる群より選択される配列を含有する、請求項２０に記載の組成物。

【請求項２２】

前記化合物が配列番号２２７、２２９、２３４、２３６、２３７、および２４４～２４８からなる群より選択される配列を含有する、請求項２１に記載の組成物。

【請求項２３】

前記化合物が、配列番号５７０～５７８からなる群より選択される配列を有するアルギニンリッチペプチドに結合体化されている、請求項２０に記載の組成物。

【請求項２４】

ヒトジストロフィンのプレプロセスされたmRNAのプロセッシングにおいてエキソン５０のスキッピングを生じる際に使用するための組成物であって、該組成物は、

１つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの５'環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている２０～３５個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物を含み、該化合物は、配列番号２６７～３０８からなる群より選択される配列を含み、かつ該ジストロフィン遺伝子エキソン５０における相補mRNA配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、該化合物とmRNAの間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも４５℃のTmを有する、組成物。

【請求項２５】

前記化合物が配列番号２７７、２８７、２９０、および２９１からなる群より選択される配列を含有する、請求項２４に記載の組成物。

【請求項２６】

前記化合物が配列番号２８７からなる配列を含有する、請求項２５に記載の組成物。

【請求項２７】

前記化合物が、配列番号５７０～５７８からなる群より選択される配列を有するアルギニンリッチペプチドに結合体化されている、請求項２４に記載の組成物。

【請求項２８】

ヒトジストロフィンのプレプロセスされたmRNAのプロセッシングにおいてエキソン５１のスキッピングを生じる際に使用するための組成物であって、該組成物は、

１つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの５'環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている２０～３５個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物を含み、該化合物は、配列番号３０９～３７１からなる群より選択される配列を含み、かつ該ジストロフィン遺伝子エキソン５１における相補mRNA配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、該化合物とmRNAの間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも４５℃のTmを有する、組成物。

【請求項２９】

前記化合物が配列番号３２４、３２６、および３２７からなる群より選択される配列を含有する、請求項２８に記載の組成物。

【請求項３０】

前記化合物が配列番号３２７からなる配列を含有する、請求項２９に記載の組成物。

【請求項３１】

前記化合物が、配列番号５７０～５７８からなる群より選択される配列を有するアルギニンリッチペプチドに結合体化されている、請求項２８に記載の組成物。

【請求項３２】

ヒトジストロフィンのプレプロセスされたmRNAのプロセッシングにおいてエキソン５２

10

20

30

40

50

のスキッピングを生じる際に使用するための組成物であって、該組成物は、

1つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの5'環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている20～35個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物を含み、該化合物は、配列番号372～415からなる群より選択される配列を含み、かつ該ジストロフィン遺伝子エキソン52における相補mRNA配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、該化合物とmRNAの間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも45℃のT_mを有する、組成物。

【請求項33】

前記化合物が配列番号372～397からなる群より選択される配列を含有する、請求項32に記載の組成物。

【請求項34】

前記化合物が配列番号379～382、384、390、および392～395からなる群より選択される配列を含有する、請求項33に記載の組成物。

【請求項35】

前記化合物が、配列番号570～578からなる群より選択される配列を有するアルギニンリッチペプチドに結合体化されている、請求項32に記載の組成物。

【請求項36】

ヒトジストロフィンのプレプロセスされたmRNAのプロセッシングにおいてエキソン53のスキッピングを生じる際に使用するための組成物であって、該組成物は、

1つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの5'環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている20～35個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物を含み、該化合物は、配列番号416～475および625～633からなる群より選択される配列を含み、かつ該ジストロフィン遺伝子エキソン53における相補mRNA配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、該化合物とmRNAの間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも45℃のT_mを有する、組成物。

【請求項37】

前記化合物が配列番号428、429、および431からなる群より選択される配列を含有する、請求項36に記載の組成物。

【請求項38】

前記化合物が配列番号429からなる配列を含有する、請求項37に記載の組成物。

【請求項39】

前記化合物が、配列番号570～578からなる群より選択される配列を有するアルギニンリッチペプチドに結合体化されている、請求項36に記載の組成物。

【請求項40】

ヒトジストロフィンのプレプロセスされたmRNAのプロセッシングにおいてエキソン54のスキッピングを生じる際に使用するための組成物であって、該組成物は、

1つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの5'環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている20～35個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物を含み、該化合物は、配列番号476～519からなる群より選択される配列を含み、かつ該ジストロフィン遺伝子エキソン54における相補mRNA配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、該化合物とmRNAの間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも45℃のT_mを有する、組成物。

【請求項41】

前記化合物が配列番号476～499からなる群より選択される配列を含有する、請求項40に記載の組成物。

【請求項42】

前記化合物が配列番号479～482、484、489、および491～493からなる

10

20

30

40

50

群より選択される配列を含有する、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記化合物が、配列番号 5 7 0 ～ 5 7 8 からなる群より選択される配列を有するアルギニンリッチペプチドに結合体化されている、請求項 4 0 に記載の組成物。

【請求項 4 4】

ヒトジストロフィン遺伝子のプレプロセスされた mRNA 転写物のプロセッシングにおいてエキソン 5 5 のスキッピングを生じる際に使用するための組成物であって、該組成物は、

1 つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの 5' 環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている 2 0 ～ 3 5 個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物を含み、該化合物は、配列番号 5 2 0 ～ 5 6 9、および 6 3 5 からなる群より選択される配列を含み、かつ該ジストロフィン遺伝子エキソン 5 5 における相補 mRNA 配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、該化合物と mRNA の間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも 4 5 °C の T_m を有する、組成物。

10

【請求項 4 5】

前記化合物が配列番号 5 2 0 ～ 5 4 6、および 6 3 5 からなる群より選択される配列を含有する、請求項 4 4 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

前記化合物が配列番号 5 2 4 ～ 5 2 8、5 3 7、5 3 9、5 4 0、5 4 2、および 5 4 4 からなる群より選択される配列を含有する、請求項 4 5 に記載の組成物。

20

【請求項 4 7】

前記化合物が、配列番号 5 7 0 ～ 5 7 8 からなる群より選択される配列を有するアルギニンリッチペプチドに結合体化されている、請求項 4 4 に記載の組成物。

【請求項 4 8】

被験体における筋ジストロフィーを治療する方法であって、該方法は、1 つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの 5' 環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている 2 0 ～ 3 5 個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物の有効量を該被験体に投与する工程を包含し、該化合物は、配列番号 1 ～ 5 6 9、および 6 1 2 ～ 6 3 5 からなる群より選択される配列を含み、かつジストロフィン遺伝子エキソンにおける相補 mRNA 配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、該化合物と mRNA の間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも 4 5 °C の T_m を有し、該エキソンがエキソン 4 4 ～ 5 5 からなる群より選択される、方法。

30

【請求項 4 9】

前記筋ジストロフィーがデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記筋ジストロフィーがベッカー型筋ジストロフィー (BMD) である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記配列が配列番号 1 ～ 2 0 からなる群より選択され、前記エキソンがエキソン 4 4 である、請求項 4 8 に記載の方法。

40

【請求項 5 2】

前記配列が配列番号 2 1 ～ 7 6 および 6 1 2 ～ 6 2 4 からなる群より選択され、前記エキソンがエキソン 4 5 である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記配列が配列番号 7 7 ～ 1 2 5 からなる群より選択され、前記エキソンがエキソン 4 6 である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記配列が配列番号 1 2 6 ～ 1 6 9 からなる群より選択され、前記エキソンがエキソン 4

50

7である、請求項48に記載の方法。

【請求項55】

前記配列が配列番号170～224および634からなる群より選択され、前記エキソンがエキソン48である、請求項48に記載の方法。

【請求項56】

前記配列が配列番号225～266からなる群より選択され、前記エキソンがエキソン49である、請求項48に記載の方法。

【請求項57】

前記配列が配列番号267～308からなる群より選択され、前記エキソンがエキソン50である、請求項48に記載の方法。

10

【請求項58】

前記配列が配列番号309～371からなる群より選択され、前記エキソンがエキソン51である、請求項48に記載の方法。

【請求項59】

前記配列が配列番号372～415からなる群より選択され、前記エキソンがエキソン52である、請求項48に記載の方法。

【請求項60】

前記配列が配列番号416～475および625～633からなる群より選択され、前記エキソンがエキソン53である、請求項48に記載の方法。

【請求項61】

前記配列が配列番号476～519からなる群より選択され、前記エキソンがエキソン54である、請求項48に記載の方法。

20

【請求項62】

前記配列が配列番号520～569および635からなる群より選択され、前記エキソンがエキソン55である、請求項48に記載の方法。

【請求項63】

前記配列が配列番号287を含む、請求項48に記載の方法。

【請求項64】

前記化合物がアルギニンリッチペプチドに結合体化されている、請求項48に記載の方法。

30

【請求項65】

前記アルギニンリッチペプチドが配列番号570～578からなる群より選択される配列を含む、請求項64に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、米国特許法第119条(e)項の、2008年10月24日出願の米国仮特許出願第61/108,416号における利益を主張し、この仮特許出願は、本明細書中でその全体が参考として援用される。

40

【0002】

配列表に関する言及

本願と関連する配列表は、紙コピーの代わりにテキスト形式で提供され、これは、それによって参照により本明細書に援用される。配列表を含むテキストの名称は120178__410PC__SEQUENCE__LISTING.txtである。テキストファイルは156KBであり、2009年10月23日に作成され、そしてEFS-Webを経由して電子的に提出されている。

【0003】

発明の分野

本発明は、ヒトジストロフィン遺伝子におけるエキソンのスキップを容易にするために

50

適切な新規なアンチセンス化合物および組成物に関する。本発明は、本発明の方法における使用のために適合されたアンチセンス組成物を使用してエキソンスキッピングを誘導するための方法もまた提供する。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

アンチセンス技術は、種々の異なるレベルで（転写、スプライシング、安定性、翻訳のレベルで）遺伝子発現に影響を与えるために一連の化学を使用して開発されてきた。その研究の多くは、広範な指標における異常なまたは疾患関連の遺伝子を修正するかまたは補償するためのアンチセンス化合物の使用に焦点を当てている。アンチセンス分子は、特異性をもって遺伝子発現を阻害することが可能であり、このために、遺伝子発現の調節因子としてのオリゴヌクレオチドに関連する多くの研究の労力は、標的となる遺伝子の発現またはシス作用性エレメントの機能の阻害に焦点を当ててきた。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には、あるウイルスRNA標的の場合において、センス鎖（例えば、mRNA）またはマイナス鎖のいずれかのRNAを指向している。特定の遺伝子ダウンレギュレーションの所望の効果を達成するために、オリゴヌクレオチドは、一般的に、標的とされたmRNAの崩壊を促進するか、mRNAの翻訳をブロックするか、またはシス作用性RNAエレメントの機能をブロックするかのいずれかであり、それによって、標的タンパク質のデノボ合成またはウイルスRNAの複製のいずれかを効果的に妨害する。

【0005】

しかし、このような技術は、目的がネイティブタンパク質の産生をアップレギュレートすること、またはナンセンス変異もしくはフレームシフト変異などの翻訳の未成熟終了を誘導する変異を補償することである場合には有用ではない。これらの場合においては、欠損遺伝子転写物は標的とされた分解または立体阻害に供されるべきではなく、従って、アンチセンスオリゴヌクレオチド化学は、標的mRNA崩壊を促進するべきではなく、または翻訳をブロックするべきではない。

【0006】

種々の遺伝的疾患において、1つの遺伝子の最終的な発現に対する変異の効果は、スプライシングプロセスの間に標的とされたエキソンのスキップのプロセスを通して調節できる。スプライシングプロセスは、プレmRNAにおける隣接するエキソン-イントロン接合部を密接に接近させ、一緒にスプライシングされるエキソン間のそれらの引き続く再形成を伴って、イントロンの末端でホスホジエステル結合の切断を実施する、複雑な多成分機構によって方向付けられている。この複雑かつ高度に正確なプロセスは、比較的短い半保存性RNAセグメントであるプレmRNA中の配列モチーフによって媒介され、そこに種々の核スプライシング因子が結合し、次いで、これらの因子は、スプライシング反応に関与する。スプライシング機構がプレmRNAプロセッシングに関与するモチーフを読み取りまたは認識するやり方を変更することによって、ディファレンシャルにスプライシングされたmRNA分子を作製することが可能である。ヒト遺伝子の大部分が正常な遺伝子発現の間に選択的にスプライシングされるが、関与する機構は同定されていないことが今や認識されている。

【0007】

正常に機能しているタンパク質がその中の変異のために未成熟で終結される場合において、アンチセンス技術を通してある機能的タンパク質産生を回復させるための手段は、スプライシングプロセスの間の介入を通して可能であることが示されており、そして疾患を引き起こす変異と関連するエキソンがある遺伝子から特異的に除去できるならば、ネイティブタンパク質の同様の生物学的特性を有するか、またはエキソンと関連する変異によって引き起こされた疾患を改善するために十分な生物学的活性を有する短縮型タンパク質産物が、時折、産生可能であることが示されている（Sierakowska, Sambadeら、1996；Wilton, Lloydら、1999；van Deutekom, Bremmer-Boutら、2001；Lu, Mannら、2003；Aartsm

10

20

30

40

50

a-Rus, Jansonら、2004)。Koleら（特許文献1；特許文献2；特許文献3；および特許文献4）は、標的とされているプレmRNAの崩壊を促進しない修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドアナログを使用して異常なスプライシングと闘う方法を開示している。Bennettら（米国特許第6,210,892号）は、標的RNAのRNAse H媒介切断を誘導しないアンチセンスオリゴヌクレオチドアナログもまた使用する、野生型細胞mRNAプロセシングのアンチセンス調節を記載している。

【0008】

標的とされたエキソンスキッピングのプロセスは、多くのエキソンおよびイントロンが存在するか、エキソンの遺伝子構成が冗長であるか、またはタンパク質が1種以上の特定のエキソンなしで機能することが可能である、長い遺伝子中で特に有用であるようである。種々の遺伝子中の変異によって引き起こされる短縮と関連する遺伝性疾患の治療のための遺伝子プロセシングを再方向付けするための試みは、以下のいずれかであるアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用に焦点を当てている：（1）スプライシングプロセスに関与するエレメントと完全にまたは部分的に重複する；または（2）エレメントにおいて起こる特定のスプライシング反応を正常に媒介するスプライシング因子の結合および機能を破壊するためにそのエレメントに十分に近接した位置でプレmRNAに結合する。

【0009】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、タンパク質ジストロフィンの発現の欠損によって引き起こされる。このタンパク質をコードする遺伝子は、200万ヌクレオチドを超えるDNAに広がる79個のエキソンを含む。エキソンの読み枠を変更するか、または終止コドンを導入するか、または読み枠のエキソン（単数または複数）もしくは1つ以上のエキソンの複製からの全体の除去によって特徴付けられるいかなるエキソンの変異も、機能的ジストロフィンの産生を破壊し、DMDを生じる潜在能力を有する。

【0010】

より重篤度が軽い型の筋ジストロフィーである、ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）は、変異、典型的には、1つ以上のエキソンの欠失が、全体のジストロフィン転写物に沿った正確な読み枠を生じ、その結果、mRNAのタンパク質への翻訳が未成熟で終結しない場合に生じることが見い出されている。変異したジストロフィンプレmRNAのプロセシングにおける上流および下流のエキソンの結合が遺伝子の正確な読み枠を維持する場合、結果は、ベッカー表現型を生じる何らかの活性を保持している、短い内部欠失を有するタンパク質をコードするmRNAである。

【0011】

ジストロフィントタンパク質の読み枠を変化させないエキソン（単数または複数）の欠失はBMD表現型を生じるのに対して、フレームシフトを引き起こすエキソン欠失はDMDを生じる（Monaco, Bertelsonら、1988）。一般的に、読み枠を変化させ、従って、適切なタンパク質翻訳を中断する点変異およびエキソン欠失を含むジストロフィン変異は、DMDを生じる。あるBMDおよびDMD患者は複数のエキソンを網羅するエキソン欠失を有することもまた注記されるべきである。

【0012】

アンチセンス分子はデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の治療におけるツールを提供するかもしれないが、アンチセンス分子を使用してエキソンスキッピングを誘導するための試みは混合した成功を有していた。ジストロフィンのプレmRNAからのジストロフィンエキソン19のスキップの成功は、Erringtonら（Errington, Mannら、2003）によって記載されるように、エキソンの定義に含まれるエキソンの範囲内での隣接するスプライス部位またはモチーフにおいて方向付けられている種々のアンチセンス分子を使用して達成された。

【0013】

mdxマウスモデルにおける特異的かつ再現性のあるエキソンスキッピングの最初の例は、Wiltonら（Wilton, Lloydら、1999）によって報告された。ドナースプライシング部位にアンチセンス分子を方向付けることによって、エキソン23ス

10

20

30

40

50

キップは、培養細胞の処理の6時間以内にジストロフィンmRNAにおいて誘導された。Wiltonらはまた、より長いアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、マウスジストロフィンのpre-mRNAのアクセプター領域を標的とすることを記載している。イントロン23ドナースプライシング部位において指向される最初のアンチセンスオリゴヌクレオチドが初代培養筋芽細胞においてエキソンスキッピングを誘導したのに対して、この化合物は、より高レベルのジストロフィンを発現する不死化細胞培養においてははるかにより効率的ではないことが見い出された。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

10

【特許文献1】米国特許第5,627,274号明細書

【特許文献2】米国特許第5,916,808号明細書

【特許文献3】米国特許第5,976,879号明細書

【特許文献4】米国特許第5,665,593号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

これらの試みにも関わらず、複数のジストロフィンエキソンに標的化されるアンチセンスオリゴマーの改善、および筋肉送達組成物の改善、およびDMDの治療適用のための方法についての必要性が残っている。

20

【課題を解決するための手段】

【0016】

発明の要旨

本発明の実施形態は、一般的に、エキソンスキッピングを誘導するために、選択された標的に結合可能であるアンチセンス化合物、およびエキソンスキッピングを誘導するためのそのアンチセンス化合物の使用方法に関する。特定の実施形態において、単一のまたは複数のエキソンスキッピングを誘導するために本発明の2つ以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドと一緒に合わせることが可能である。

【0017】

特定の実施形態において、2つ以上のアンチセンスオリゴヌクレオチド分子と一緒に共有結合することによって、単一のまたは複数のエキソンのエキソンスキッピングを改善することが可能である（例えば、Aartsma-Rus, Jansonら、2004を参照のこと）。

30

【0018】

特定の実施形態において、本発明のアンチセンス化合物は、ヒトジストロフィン遺伝子におけるエキソンスキッピングを誘導し、それによって、筋肉細胞が機能的ジストロフィンタンパク質を生成することを可能にする。

【0019】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド化合物（本明細書ではオリゴマーともまた呼ばれる）は、典型的には：（i）モルホリノサブユニットおよび1つのサブユニットのモルホリノ窒素を隣接するサブユニットの5'環外炭素に結合するリンを含有するサブユニット間連結を含み、（ii）10～40個の間、好ましくは20～35個の間のヌクレオチド塩基を含有し、（iii）ジストロフィンのpre-mRNA中の標的配列の少なくとも12個の連続する塩基にハイブリダイズしかつエキソンスキッピングを誘導するために有効な塩基配列を含む。

40

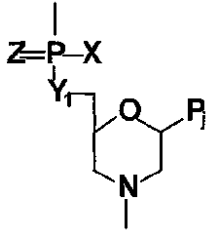
【0020】

特定の実施形態において、本明細書のアンチセンス化合物は、以下の構造（I）に従って、1つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの5'環外炭素に結合するリンを含有するサブユニット間連結を含んでもよい：

【0021】

50

【化 1】



(I)

ここで：

Y_1 は $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、または $-CH_2-$ であり；

Z は O または S であり；

P_j は、塩基特異的水素結合によって、ポリヌクレオチド中の塩基に結合するために有効であるプリンまたはピリミジン塩基対形成部分であり；そして

X は、フルオロ、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたチオアルコキシ、アミノ、任意に置換されたアルキルアミノ、または任意に置換されたヘテロシクリルである。

【0022】

特定の実施形態において、電荷を有さない上記のサブユニット間連結は、生理学的 pH において正電荷を有する連結が分散されてもよく、ここで、正電荷を有する連結の総数は、2 から連結の総数の半分を超えない数までの間である。例えば、正電荷を有する連結は、X が任意に置換された 1-ピペラジニルである上記の構造を有してもよい。他の実施形態において、正に荷電した連結は、1-ピペラジニルが、任意に置換されたアルキルグアニジニル部分で 4 位において置換されている、X が置換 1-ピペラジニルである上記の構造を有してもよい。

【0023】

投与されたアンチセンス化合物が、プレプロセスされた (preprocessed) ヒトジストロフィンのスプライシング部位を標的とするために有効である場合、これは、プレプロセスされたメッセンジャー RNA (mRNA) ヒトジストロフィン転写物において少なくとも 12 個の連続する塩基を含む標的領域に相補的な塩基配列を有してもよい。例示的なアンチセンス配列は m 配列番号 1～569 および 612～633 によって同定される配列が含まれる。

【0024】

特定の実施形態において、本発明のアンチセンス配列は以下の中に含まれる：

(a) ヒトジストロフィンのプレプロセスされた mRNA のプロセッシングにおけるエクソン 44 のスキップを生じる際に使用するための、配列番号 1～20、好ましくは配列番号 4、8、11、および 12、ならびにより好ましくは、配列番号 12 によって同定される配列のいずれか；

(b) ヒトジストロフィンのプレプロセスされた mRNA のプロセッシングにおけるエクソン 45 のスキップを生じる際に使用するための、配列番号 21～76 および 612～624、好ましくは配列番号 27、29、34、および 39、ならびにより好ましくは、配列番号 34 によって同定される配列のいずれか；

(c) ヒトジストロフィンのプレプロセスされた mRNA のプロセッシングにおけるエクソン 46 のスキップを生じる際に使用するための、配列番号 77～125、好ましくは配列番号 21～53、ならびにより好ましくは、配列番号 82、84～87、90、96、98、および 101 によって同定される配列のいずれか；

(d) ヒトジストロフィンのプレプロセスされた mRNA のプロセッシングにおけるエクソン 47 のスキップを生じる際に使用するための、配列番号 126～169、好ましくは配列番号 126～149、ならびにより好ましくは、配列番号 126、128～130、132、144、および 146～149 によって同定される配列のいずれか；

(e) ヒトジストロフィンのプレプロセスされたmRNAのプロセッシングにおけるエクソン48のスキップを生じる際に使用するための、配列番号170～224および634、好ましくは配列番号170～201および634、ならびにより好ましくは、配列番号176、178、181～183、194、および198～201によって同定される配列のいずれか；

(f) ヒトジストロフィンのプレプロセスされたmRNAのプロセッシングにおけるエクソン49のスキップを生じる際に使用するための、配列番号225～266、好ましくは配列番号225～248、ならびにより好ましくは、配列番号227、229、234、236、237、および244～248によって同定される配列のいずれか；

(g) ヒトジストロフィンのプレプロセスされたmRNAのプロセッシングにおけるエクソン50のスキップを生じる際に使用するための、配列番号267～308、好ましくは配列番号277、287、および290、ならびにより好ましくは、配列番号287によって同定される配列のいずれか；

(h) ヒトジストロフィンのプレプロセスされたmRNAのプロセッシングにおけるエクソン51のスキップを生じる際に使用するための、配列番号309～371、好ましくは配列番号324、326、および327、ならびにより好ましくは、配列番号327によって同定される配列のいずれか；

(i) ヒトジストロフィンのプレプロセスされたmRNAのプロセッシングにおけるエクソン52のスキップを生じる際に使用するための、配列番号372～415、好ましくは配列番号372～397、ならびにより好ましくは、配列番号379～382、384、390、および392～395によって同定される配列のいずれか；

(j) ヒトジストロフィンのプレプロセスされたmRNAのプロセッシングにおけるエクソン53のスキップを生じる際に使用するための、配列番号416～475および625～633、好ましくは配列番号428、429、および431、ならびにより好ましくは、配列番号429によって同定される配列のいずれか；

(k) ヒトジストロフィンのプレプロセスされたmRNAのプロセッシングにおけるエクソン54のスキップを生じる際に使用するための、配列番号476～519、好ましくは配列番号476～499、ならびにより好ましくは、配列番号479～482、484、489、および491～493によって同定される配列のいずれか；

(l) ヒトジストロフィンのプレプロセスされたmRNAのプロセッシングにおけるエクソン55のスキップを生じる際に使用するための、配列番号520～569および635、好ましくは配列番号520～546および635、ならびにより好ましくは、配列番号524～528、537、539、540、542、および544によって同定される配列のいずれか。

【0025】

特定の実施形態において、この化合物は、細胞への化合物の取り込みを促進するために有効なアルギニンリッチポリペプチドに結合体化されてもよい。例示的なペプチドは、本明細書に記載されるものの中でも、配列番号570～578によって同定されるものが含まれる。

【0026】

1つの例示的な実施形態において、アルギニンリッチペプチドは、そのN末端またはC末端において、アンチセンス化合物の3'末端または5'末端に共有結合される。また、1つの例示的な実施形態において、アンチセンス化合物は、モルホリノサブユニット、および1つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの5'環外炭素に結合するリンを含有するサブユニット間結合から構成される。

【0027】

一般的に、ペプチド-オリゴマー結合体は、選択された哺乳動物組織のために選択的であるホーミングペプチドをさらに含んでもよく、すなわち、同じ組織は細胞透過性ペプチドによって標的とされる。この結合体は、細胞透過性ペプチド-ホーミングペプチド-アンチセンスオリゴマーの型であってもよく、または、より好ましくは、ホーミングペプチ

10

20

30

40

50

ドー細胞透過性ペプチドーアンチセンスオリゴマーの型であってもよい。例えば、上記のようなデュシェンヌ型筋ジストロフィーを治療するために使用するためのペプチド結合体化合物は、細胞透過性ペプチドに結合体化された、配列番号579として同定される配列を有するペプチドなどの、筋肉組織のために選択的であるホーミングペプチドをさらに含むことができる。この型の例示的な結合体には、本明細書でC P O 6 0 6 2 - M S P - P M O（細胞透過性ペプチドーホーミングペプチドーアンチセンスオリゴマー）およびM S P - C P O 6 0 6 2 - P M O（ホーミングペプチドー細胞透過性ペプチドーアンチセンスオリゴマー）として表されるものが含まれる（配列番号580-583を参照のこと）。

【0028】

ある実施形態において、ペプチドは、リンカー部分を介してオリゴマーに結合体化される。特定の実施形態において、リンカー部分は、任意に置換されたピペラジニル部分を含んでもよい。他の実施形態において、リンカー部分は、 β アラニンおよび／または6-アミノヘキサン酸サブユニットをさらに含んでもよい。さらに他の実施形態において、ペプチドは、リンカー部分なしでオリゴマーに直接的に結合体化される。

【0029】

オリゴマーへのペプチドの結合体化は、ペプチドとオリゴマーの間、またはリンカー部分とオリゴマーの間で共有結合を形成するために適切である任意の部分においてであってもよい。例えば、ある実施形態において、ペプチドの結合体化はオリゴマーの3'末端においてであってもよい。他の実施形態において、オリゴマーへのペプチドの結合体化はオリゴマーの5'末端においてであってもよい。さらに他の実施形態において、ペプチドはサブユニット間連結のいずれかを通してオリゴマーに結合体化されてもよい。

【0030】

ある実施形態において、ペプチドはオリゴマーの5'末端においてオリゴマーに結合体化される。リン含有するサブユニット間連結を含む実施形態において、ペプチドは、末端連結基のリンへの共有結合を介して、オリゴマーに結合体化されてもよい。この様式での結合体化は、上記のリンカー部分を伴っても、または伴わなくてもよい。

【0031】

さらに他の実施形態において、ペプチドは、オリゴマーの3'末端においてオリゴマーに結合体化されてもよい。あるさらなる実施形態において、ペプチドは、オリゴマーの3'末端モルホリノ基の窒素原子に結合体化されてもよい。この点において、ペプチドは、直接的に、または上記のリンカー部分を介してのいずれかでオリゴマーに結合体化されてもよい。

【0032】

ある実施形態において、オリゴマーは、水性媒体中のオリゴマーの溶解度を増強する部分に結合体化されてもよい。ある実施形態において、水性媒体中のオリゴマーの溶解度を増強する部分はポリエチレングリコールである。なおさらなる実施形態において、水性媒体中のオリゴマーの溶解度を増強する部分はトリエチレングリコールである。例えば、ある実施形態において、水性媒体中の溶解度を増強する部分は、オリゴマーの5'末端においてオリゴマーに結合体化されてもよい。水性媒体中のオリゴマーの溶解度を増強する部分のオリゴマーへの結合体化は、直接的または上記のリンカー部分を通してのいずれかであってもよい。

【0033】

本発明の特定の実施形態は、患者への送達のために適切な型で少なくともアンチセンス分子を含む、遺伝的障害の予防的または治療的処置において補助するように選択および／または適合されたアンチセンス分子を提供する。

【0034】

本発明の特定の実施形態は、特定のタンパク質をコードする遺伝子中の変異が存在し、その変異の影響がエキソンスキッピングによって無効にできる遺伝性疾患に罹患している患者を治療するための方法を提供し、この方法は、（a）本明細書に記載される方法に従ってアンチセンス分子を選択する工程；および（b）そのような治療が必要である患者に

10

20

30

40

50

その分子を投与する工程を包含する。本発明はまた、遺伝的疾患の治療のための医薬の製造のための、本発明の精製かつ単離されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用もまた含む。

【0035】

特定の実施形態は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーによって特徴付けられる状態などの筋ジストロフィーを治療する方法を提供し、この方法は、治療が必要な患者における特定の遺伝子の損傷に関連する、本明細書に記載されるような適切に設計されたアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効量を、その患者に投与する工程を包含する。さらに、特定の実施形態は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを含む筋ジストロフィーを予防するか、または少なくとも最小化するために患者を予防的に治療するための方法を提供し、この方法は、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはこれらの生物学的分子の1種以上を含む薬学的組成物の有効量を患者に投与する工程を包含する。

10

【0036】

特定の実施形態は、1つのサブユニットのモルホリノ窒素を、隣接するサブユニットの5'環外炭素に結合する、リンを含有するサブユニット間連結によって連結されている20~35個のモルホリノサブユニットを含有する実質的に電荷を有さないアンチセンス化合物の有効量を被験体に投与する工程を包含する、被験体における筋ジストロフィーを治療する方法に関し、この化合物は、配列番号1~569および612~635からなる群より選択される配列を含み、かつジストロフィン遺伝子エキソンにおける相補mRNA配列とヘテロ二重鎖構造物を形成することが可能であって、上記化合物とmRNAの間でのヘテロ二重鎖構造物が少なくとも45℃のT_mを有し、ここで、このエキソンはエキソン44~55からなる群より選択される。

20

【0037】

特定の実施形態において、筋ジストロフィーはデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)である。特定の実施形態において、筋ジストロフィーはベッカー型筋ジストロフィー(BMD)である。

【0038】

特定の実施形態において、配列は配列番号1~20からなる群より選択され、エキソンはエキソン44である。特定の実施形態において、配列は配列番号21~76および612~624からなる群より選択され、エキソンはエキソン45である。

30

【0039】

特定の実施形態において、配列は配列番号77~125からなる群より選択され、エキソンはエキソン46である。特定の実施形態において、配列は配列番号126~169からなる群より選択され、エキソンはエキソン47である。

【0040】

特定の実施形態において、配列は配列番号170~224および634からなる群より選択され、エキソンはエキソン48である。特定の実施形態において、配列は配列番号225~266からなる群より選択され、エキソンはエキソン49である。

【0041】

特定の実施形態において、配列は配列番号267~308からなる群より選択され、エキソンはエキソン50である。特定の実施形態において、配列は配列番号309~371からなる群より選択され、エキソンはエキソン51である。

40

【0042】

特定の実施形態において、配列は配列番号372~415からなる群より選択され、エキソンはエキソン52である。特定の実施形態において、配列は配列番号416~475および625~633からなる群より選択され、エキソンはエキソン53である。特定の実施形態において、配列は配列番号476~519からなる群より選択され、エキソンはエキソン54である。特定の実施形態において、配列は配列番号520~569および635からなる群より選択され、エキソンはエキソン55である。特定の実施形態において、配列は配列番号287を含むかまたはそれから本質的になる。

50

【0043】

特定の実施形態は、遺伝的疾患を治療するためのキットを提供し、このキットは、適切な容器にパッケージされた少なくとも1種の本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、およびその使用のための指示書を含む。

【0044】

これらのおよび他の目的および特徴は、本発明の以下の詳細な説明が図面と共に読まれるときにより完全に理解される。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1A】図1Aは、ホスホロジアミデート連結を有する例示的なモルホリノオリゴマー構造を示す。

【図1B】図1Bは、本発明の実施形態に従う、アルギニンリッチペプチドおよびアンチセンスオリゴマーの結合体を示す。

【図1C】図1Cは、骨格連結が1つ以上の正電荷を有する基を含む、図1Bにおけるような結合体を示す。

【図1D】図1D～Gは、DからGまで指定された例示的なモルホリノオリゴヌクレオチドの反復サブユニットセグメントを示す。

【図1E】図1D～Gは、DからGまで指定された例示的なモルホリノオリゴヌクレオチドの反復サブユニットセグメントを示す。

【図1F】図1D～Gは、DからGまで指定された例示的なモルホリノオリゴヌクレオチドの反復サブユニットセグメントを示す。

【図1G】図1D～Gは、DからGまで指定された例示的なモルホリノオリゴヌクレオチドの反復サブユニットセグメントを示す。

【図2A】図2Aは、ヒトジストロフィンエキソン51のスキップを誘導するように設計されたアンチセンスオリゴマーエキソン51の相対的位置および結果を示す。

【図2B】図2B～Cは、エキソン51スキップを誘導する際に有効である配列（AVI-5658；配列番号588およびh51AON1；配列番号594）と比較した、エキソン51スキャンから選択された3つの最良のオリゴマー（配列番号324、326、および327）の、培養したヒト横紋筋肉腫（RD）細胞およびヒト初代骨格筋細胞中での相対活性を示す。

【図2C】図2B～Cは、エキソン51スキップを誘導する際に有効である配列（AVI-5658；配列番号588およびh51AON1；配列番号594）と比較した、エキソン51スキャンから選択された3つの最良のオリゴマー（配列番号324、326、および327）の、培養したヒト横紋筋肉腫（RD）細胞およびヒト初代骨格筋細胞中での相対活性を示す。

【図2D】図2Dは、特定の配列と比較した、3種の選択したオリゴマーのエキソン51の中での相対的位置を示す。

【図3A】図3Aは、エキソン50スキップを誘導する他の配列と比較した、ヒトジストロフィンエキソン50のスキップを誘導するように設計されたアンチセンスオリゴマーエキソン50スキャンの相対的位置および結果を示す。

【図3B】図3Bは、他の配列（配列番号584および585）と比較した、エキソン50スキャンから選択されたアンチセンス配列（配列番号277、287、290、および291）の相対的位置および結果を示す。

【図4A】図4Aは、ヒトジストロフィンエキソン53のスキップを誘導するように設計されたアンチセンスオリゴマーエキソン53スキャンの相対的位置および結果を示す。

【図4B】図4Bは、エキソン53スキャンにおいて最も活性であるように選択されたオリゴマーに対してエキソンスキッピング活性を比較するために使用された特定の配列の相対的位置を示す。

【図4C】図4C～Fは、エキソン53スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号422、428、429、および431）を使用した、図4Gに

10

20

30

40

50

において要約される用量－範囲研究の結果を示す。

【図 4 D】図 4 C～F は、エキソン 5 3 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 4 2 2、4 2 8、4 2 9、および 4 3 1）を使用した、図 4 G において要約される用量－範囲研究の結果を示す。

【図 4 E】図 4 C～F は、エキソン 5 3 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 4 2 2、4 2 8、4 2 9、および 4 3 1）を使用した、図 4 G において要約される用量－範囲研究の結果を示す。

【図 4 F】図 4 C～F は、エキソン 5 3 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 4 2 2、4 2 8、4 2 9、および 4 3 1）を使用した、図 4 G において要約される用量－範囲研究の結果を示す。

【図 4 G】図 4 C～F は、エキソン 5 3 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 4 2 2、4 2 8、4 2 9、および 4 3 1）を使用した、図 4 G において要約される用量－範囲研究の結果を示す。

【図 4 H】図 4 H および 4 I は、RD 細胞とヒト初代骨格筋細胞の両方の中で最も活性なエキソン 5 3 スキップオリゴマー（配列番号 4 2 9）の活性と比較した、特定の配列（配列番号 6 0 8～6 1 1）の相対活性を示す。

【図 4 I】図 4 H および 4 I は、RD 細胞とヒト初代骨格筋細胞の両方の中で最も活性なエキソン 5 3 スキップオリゴマー（配列番号 4 2 9）の活性と比較した、特定の配列（配列番号 6 0 8～6 1 1）の相対活性を示す。

【図 5 A】図 5 A は、ヒトジストロフィンエキソン 4 4 のスキップを誘導するように設計されたアンチセンスオリゴマーエキソン 4 4 スキャンの相対的位置および結果を示す。

【図 5 B】図 5 B は、エキソン 4 4 スキャンにおいて最も活性であるように選択されたオリゴマーに対してエキソンスキッピング活性を比較するために使用された特定の配列のエキソン 4 4 中での相対的位置を示す。

【図 5 C】図 5 C～G は、エキソン 4 4 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 4、8、1 1、1 2、および 1 3）を使用した、図 5 H において要約される用量－範囲研究の結果を示す。

【図 5 D】図 5 C～G は、エキソン 4 4 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 4、8、1 1、1 2、および 1 3）を使用した、図 5 H において要約される用量－範囲研究の結果を示す。

【図 5 E】図 5 C～G は、エキソン 4 4 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 4、8、1 1、1 2、および 1 3）を使用した、図 5 H において要約される用量－範囲研究の結果を示す。

【図 5 F】図 5 C～G は、エキソン 4 4 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 4、8、1 1、1 2、および 1 3）を使用した、図 5 H において要約される用量－範囲研究の結果を示す。

【図 5 G】図 5 C～G は、エキソン 4 4 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 4、8、1 1、1 2、および 1 3）を使用した、図 5 H において要約される用量－範囲研究の結果を示す。

【図 5 H】図 5 C～G は、エキソン 4 4 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 4、8、1 1、1 2、および 1 3）を使用した、図 5 H において要約される用量－範囲研究の結果を示す。

【図 5 I】図 5 I および 5 J は、RD 細胞とヒト初代骨格筋細胞の両方の中で最も活性なエキソン 5 3 スキップオリゴマー（配列番号 1 2）の活性と比較した、特定の配列（配列番号 6 0 0～6 0 3）の相対活性を示す。

【図 5 J】図 5 I および 5 J は、RD 細胞とヒト初代骨格筋細胞の両方の中で最も活性なエキソン 5 3 スキップオリゴマー（配列番号 1 2）の活性と比較した、特定の配列（配列番号 6 0 0～6 0 3）の相対活性を示す。

【図 6 A】図 6 A は、ヒトジストロフィンエキソン 4 5 のスキップを誘導するように設計されたアンチセンスオリゴマーエキソン 4 5 スキャンの相対的位置および結果を示す。

10

20

30

40

50

【図 6 B】図 6 B は、エキソン 4 5 スキャンにおいて最も活性であるように選択されたオリゴマーに対してエキソンスキッピング活性を比較するために使用された特定の配列のエキソン 4 5 中での相対的位置を示す。

【図 6 C】図 6 C ~ F は、エキソン 4 5 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 2 7、2 9、3 4、および 3 9）を使用した、図 6 H において要約される用量－範囲研究の結果を示す。図 6 G は、陰性対照として比較的不活性なオリゴマー（配列番号 4 9）を使用する。

【図 6 D】図 6 C ~ F は、エキソン 4 5 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 2 7、2 9、3 4、および 3 9）を使用した、図 6 H において要約される用量－範囲研究の結果を示す。図 6 G は、陰性対照として比較的不活性なオリゴマー（配列番号 4 9）を使用する。

【図 6 E】図 6 C ~ F は、エキソン 4 5 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 2 7、2 9、3 4、および 3 9）を使用した、図 6 H において要約される用量－範囲研究の結果を示す。図 6 G は、陰性対照として比較的不活性なオリゴマー（配列番号 4 9）を使用する。

【図 6 F】図 6 C ~ F は、エキソン 4 5 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 2 7、2 9、3 4、および 3 9）を使用した、図 6 H において要約される用量－範囲研究の結果を示す。図 6 G は、陰性対照として比較的不活性なオリゴマー（配列番号 4 9）を使用する。

【図 6 G】図 6 C ~ F は、エキソン 4 5 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 2 7、2 9、3 4、および 3 9）を使用した、図 6 H において要約される用量－範囲研究の結果を示す。図 6 G は、陰性対照として比較的不活性なオリゴマー（配列番号 4 9）を使用する。

【図 6 H】図 6 C ~ F は、エキソン 4 5 スキャンにおいて最も有効であるとして選択されたオリゴマー（配列番号 2 7、2 9、3 4、および 3 9）を使用した、図 6 H において要約される用量－範囲研究の結果を示す。図 6 G は、陰性対照として比較的不活性なオリゴマー（配列番号 4 9）を使用する。

【図 6 I】図 6 I および 6 J は、RD 細胞とヒト初代骨格筋細胞の両方の中で最も活性なエキソン 5 3 スキップオリゴマー（配列番号 3 4）の活性と比較した、特定の配列（配列番号 6 0 4 ~ 6 0 7）の相対活性を示す。

【図 6 J】図 6 I および 6 J は、RD 細胞とヒト初代骨格筋細胞の両方の中で最も活性なエキソン 5 3 スキップオリゴマー（配列番号 3 4）の活性と比較した、特定の配列（配列番号 6 0 4 ~ 6 0 7）の相対活性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0046】

本発明の実施形態は、一般的に、ジストロフィン遺伝子におけるエキソンスキッピングを誘導するように具体的に設計されている、アンチセンス化合物の改善およびその使用方法に関する。ジストロフィン、筋肉の機能において致命的な役割を果たしており、種々の筋肉関連疾患がこの遺伝子の変異型によって特徴付けられている。従って、特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンチセンス化合物の改善は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）およびベッカー型筋ジストロフィー（BMD）において見いだされる変異ジストロフィン遺伝子などの変異型のヒトジストロフィン遺伝子においてエキソンスキッピングを誘導する。

【0047】

変異によって引き起こされる異常な mRNA スプライシング事象に起因して、これらの変異型ヒトジストロフィン遺伝子は、欠損ジストロフィタンパク質を発現するか、または測定可能なジストロフィンを全く発現しないかのいずれかであり、これは、種々の型の筋ジストロフィーに導く状態である。この状態を治療するために、本発明のアンチセンス化合物は、典型的には、変異型ヒトジストロフィン遺伝子のプレプロセスされた RNA の選択された領域にハイブリダイズし、さもなくば異常にスプライシングされるジストロフ

10

20

30

40

50

インmRNAにおいてエキソンスキッピングおよびディファレンシャルスプライシングを誘導し、それによって、筋肉細胞が機能的なジストロフィンタンパク質をコードするmRNA転写物を産生することを可能にする。特定の実施形態において、得られるジストロフィンタンパク質は、必ずしも「野生型」のジストロフィンではないが、むしろ短縮型であり、なお機能的または半機能的な型のジストロフィンである。

【0048】

筋肉細胞における機能的ジストロフィンタンパク質のレベルを増加させることによって、これらおよび関連する実施形態は、異常なmRNAスプライシングに起因する欠損ジストロフィンタンパク質の発現によって特徴付けられる筋ジストロフィー、とりわけ、DMDおよびBMDなどの筋ジストロフィーの型の予防および治療において有用であり得る。本明細書に記載される特定のオリゴマーは、使用の際に他のオリゴマーを超えた、ジストロフィン-エキソン-特異的標的化の改善をさらに提供し、それによって、関連する型の筋ジストロフィーを治療する代替方法を超えた、顕著かつ実用的な利点を提供する。

【0049】

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって共通して理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様のまたは等価な任意の方法および材料が、本発明の実施または試験において使用できるが、好ましい方法および材料が記載されている。本発明の目的のために、次の用語が以下で定義される。

【0050】

定義

冠詞「1つの（「a」および「an」）」は冠詞の文法的な目的の1つまたは1つより多く（すなわち、少なくとも1つ）をいうために本明細書で使用される。例として、「1つのエレメント」は、1つのエレメントまたは1つより多くのエレメントを意味する。

【0051】

「約」は、言及される量（quantity）、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量（amount）、重量、または長さに対して、30、25、20、25、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1%まで多く変化する、量（quantity）、レベル、値、数、頻度、パーセンテージ、寸法、サイズ、量（amount）、重量、または長さを意味する。

【0052】

「コード配列」は、遺伝子のポリペプチド産物のコードに寄与する任意の核酸配列を意味する。対照的に、「非コード配列」という用語は、遺伝子のポリペプチド産物のコードに寄与しない任意の核酸配列をいう。

【0053】

本明細書を通して、文脈が反対を必要としない限り、「含む（comprise）」、「含む（comprises）」および「含むこと（comprising）」という言葉は、言及される工程もしくは構成要素、または工程もしくは構成要素の群を含むことを意味するが、任意の他の工程もしくは構成要素、または工程もしくは構成要素の群を排除しないと理解される。

【0054】

「からなる」は、「からなる」の語句の前に来るものは何でも含み、これに限定されることが意味される。従って、「からなる」という語句は、列挙された構成要素が必要とされるかまたは必須であること、および他の構成要素が存在しなくてもよいことを示す。「から本質的になる」は、この語句の前に列挙される任意の構成要素を含むことが意味され、列挙される構成要素のために本開示において特定される活性または作用を妨害しないか、またはそれに寄与しない他の構成要素に限定される。従って、「から本質的になる」という語句は、列挙された構成要素が必要とされるかまたは必須であることを示すが、他の構成要素は任意であり、これらが列挙された構成要素の活性または作用に物質的に影響を与えるか否かに依存して、存在してもよい、または存在しなくてもよい。

【0055】

「相補」および「相補性」という用語は、塩基対形成規則によって関連付けられるポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）をいう。例えば、「A-G-T」という配列は、「T-C-A」という配列に相補的である。相補性は、「部分的」であってもよく、この場合、核酸塩基のいくつかのみが塩基対形成規則に従って一致する。または、核酸間の「完全な」または「全体の」相補性が存在してもよい。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強さに対する有意な効果を有する。完全な相補性がしばしば所望されるが、ある実施形態は、標的RNAに関して、1つ以上、しかし、好ましくは、6、5、4、3、2、または1個のミスマッチを含むことができる。オリゴマー中の任意の位置におけるバリエーションが含まれる。特定の実施形態において、オリゴマーの末端近くの配列のバリエーションは、一般的に、内部におけるバリエーションが好ましく、そして存在する場合、典型的には、5'および/または3'末端の約6、5、4、3、2、または1個のヌクレオチドの中である。

10

【0056】

「細胞透過性ペプチド」または「CPP」という用語は交換可能に使用され、カチオン性細胞透過性ペプチドをいい、輸送ペプチド、キャリアペプチド、またはペプチド伝達ドメインとも呼ばれる。本明細書に示されるようなこれらのペプチドは、その間のすべての整数を含む、所定の細胞培養集団の細胞の30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の中の細胞透過を誘導する可能性を有し、全身投与の際に、インビボで複数の組織の中で高分子移行を可能にする。

20

【0057】

「アンチセンスオリゴマー」または「アンチセンス化合物」という用語は交換可能に使用され、環状サブユニットの配列をいい、各々が塩基対形成部分を有し、Watson-Crick塩基対形成によって核酸（典型的にはRNA）中の標的配列に、塩基対形成部分がハイブリダイズすることを可能にするサブユニット間連結によって連結され、標的配列中で、核酸：オリゴマーヘテロ二重鎖を形成する。環状サブユニットは、リボースまたは別のペントース糖、または、好ましい実施形態において、モルホリノ基に基づく（以下のモルホリノオリゴマーの説明を参照のこと）。

【0058】

このようなアンチセンスオリゴマーは、mRNAの翻訳をブロックもしくは阻害するように、または天然のpre-mRNAスプライシングプロセッシングを阻害するように設計でき、これがハイブリダイズする標的配列を「指向する」かまたはそれを「標的とする」と言われてもよい。特定の実施形態において、標的配列は、mRNAのAUG開始コドン、プレプロセスされたmRNAの3'もしくは5'スプライシング部位、または分岐点を含む領域を含む。標的配列は、エキソン内であってもよく、またイントロン内であってもよい。スプライシング部位のための標的配列は、プレプロセスされたmRNAにおける通常のスプライシングアクセプター接合部の下流のその5'末端の1〜約25塩基対を有するmRNA配列を含んでもよい。スプライシングのための好ましい標的配列は、スプライシング部位を含むプレプロセスされたmRNAの任意の領域であり、エキソンコード配列中に完全に含まれるか、またはスプライシングアクセプターもしくはドナー部位にまたがる。オリゴマーは、より一般的には、タンパク質、ウイルス、または細菌などの生物学的に関連する標的を「標的とする」と言われ、このとき、これは、上記の様式で標的の核酸に対して標的化される。配列番号1〜569および612〜635の1つ以上を含み、これらから本質的になり、またはこれらからなるアンチセンスオリゴマーが含まれる。これらのアンチセンスオリゴマーの改変体もまた含まれ、これらの改変体には、配列番号1〜569および612〜635のいずれか1つに対して、80%、85%、90%、95%、97%、98%、もしくは99%（その間のすべての整数を含む）の配列同一性もしくは配列相同性を有する改変体オリゴマー、および/または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個のヌクレオチドがこれらの配列とは異なっている改変体、好ましくは、1つ以上の選択されたヒトジストロフィンエキソンのエキソンスキッピングを誘導す

30

40

50

る改変体が含まれる。配列番号 584～611 および 634～635 の任意の 1 つ以上 (on or more) のオリゴマーもまた含まれ、これは、本明細書に記載されるように、適切な数の電荷を有する連結、例えば、10 個の電荷を有さない連結毎に約 4～5 個などの、2～5 個の電荷を有さない連結毎に約 1 個までを含み、および／またはこれもまた本明細書に記載されるように、これに結合された Arg リッチペプチドを含む。

【0059】

「モルホリノオリゴマー」または「PMO」(ホスホルアミデートまたはホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー)とは、モルホリノサブユニット構造から構成されるオリゴヌクレオチドアナログをいい、ここでは、(i)構造は、1～3 原子長、好ましくは、2 原子長、および好ましくは、電荷を有さないかまたはカチオン性であり、隣接するサブユニットの 5' 環外炭素に 1 サブユニットのモルホリノ窒素を結合する、リンを含有する連結によって一緒に連結されており、そして (ii) 各モルホリノ環は、塩基特異的水素結合によって、ポリヌクレオチド中の塩基に結合するために有効であるプリンまたはピリミジン塩基対形成部分を有する。例えば、好ましいホスホロジアミデート連結型を示す、図 1A における構造を参照のこと。バリエーションは、これらが結合または活性に干渉しない限り、この連結に対して作製できる。例えば、リンに結合された酸素は硫黄で置換されてもよい(チオホスホロジアミデート)。5' 酸素は、アミノまたは低級アルキル置換アミノで置換されてもよい。リンに結合したペンダント窒素は、(任意に置換された)低級アルキルで、非置換、一置換、または二置換であってもよい。以下のカチオン性連結の議論もまた参照のこと。モルホリノオリゴマーの合成、構造、および結合特性は、米国特許第 5,698,685 号、同第 5,217,866 号、同第 5,142,047 号、同第 5,034,506 号、同第 5,166,315 号、同第 5,521,063 号、および同第 5,506,337 号、ならびに PCT 出願第 PCT/US07/11435 号(カチオン性連結)において詳述され、これらのすべては参照により本明細書に援用される。

【0060】

プリンまたはピリミジン塩基対形成部分には、典型的には、例えば、以下の塩基もまた含まれる：アデニン、シトシン、グアニン、ウラシル、チミン、またはイノシンである。ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、プソイドウラシル、2,4,6-トリメチルシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン(例えば、5-メチルシチジン)、5-アルキルウリジン(例えば、リボチミジン)、5-ハロウリジン(例えば、5-ブロモウリジン)、または 6-アザピリミジンもしくは 6-アルキルピリミジン(例えば、6-メチルウリジン)、プロピン、クエソシン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、ワイプトシン、ワイプトキソシン、4-アセチルチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、5'-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、β-D-ガラクトシルクエオシン、1-メチルアデノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、3-メチルシチジン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メチルカルボニルメチルウリジン(5-methylcarbonylnethyluridine)、5-メチルオキシウリジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、β-D-マンノシルクエオシン、ウリジン-5-オキシ酢酸、2-チオシチジン、スレオニン誘導体およびその他(Burginら、1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, 前出)。この点に関して、「修飾塩基」は、上記に例証したようなアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)、およびウラシル(U)以外のヌクレオチド塩基を意味し；このような塩基は、アンチセンス分子中の任意の位置において使用できる。当業者は、オリゴマーの使用に依存して、T および U が交換可能であることを理解している。例えば、より RNA 様である 2'-O-メチルアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの他のア

ンチセンスケミストリーを用いて、T塩基はUとして示されてもよい（例えば、配列番号の表を参照のこと）。

【0061】

「アミノ酸サブユニット」または「アミノ酸残基」とは、 α アミノ酸残基（例えば、 $-\text{CO}-\text{CHR}-\text{NH}-$ ）または β —もしくは他のアミノ酸残基（例えば、 $-\text{CO}-\left(\text{CH}_2\right)_n\text{CHR}-\text{NH}-$ ）をいうことができ、ここで、Rは側鎖であり（これは水素を含んでもよい）、nは1～6であり、好ましくは、1～4である。

【0062】

「天然に存在するアミノ酸」とは、天然に見い出されるタンパク質中に存在するアミノ酸、例えば、タンパク質生合成の間に利用される20種の（L）アミノ酸、ならびに4—ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、デスモシン、イソデスモシン、ホモシステイン、シトルリン、およびオルニチンなどのその他のアミノ酸をいう。「非天然アミノ酸」という用語は、天然に見い出されるタンパク質中に存在しないアミノ酸をいい、例には、ベータアラニン（ β -Ala；またはB）、6—アミノヘキサン酸（Ahx）、および6—アミノペンタン酸が含まれる。「非天然アミノ酸」のさらなる例には、非限定的に、（D）—アミノ酸、ノルロイシン、ノルバリン、p—フルオロフェニルアラニン、エチオニンなどが含まれ、これらは、当業者には公知である。

【0063】

「有効量」または「治療有効量」とは、単回用量として、または一連の用量の一部としてのいずれかで、哺乳動物被験体に投与された、アンチセンスオリゴマーなどの治療化合物の量をいい、これは、被験体における所望の生理学的応答または治療効果を生じるために有効である。所望の生理学的応答の1つの例には、アンチセンスオリゴマーまたは対照オリゴマーがない場合と比較して、主として、欠損ジストロフィンタンパク質を含むか、またはジストロフィンを含まない筋肉組織または細胞中での、比較的機能的なまたは生物学的に活性型のジストロフィンタンパク質の発現の増加が含まれる。所望の治療効果の例には、非限定的に、とりわけ、筋ジストロフィーの徴候または病理の改善、筋ジストロフィーの徴候または病理の進行の減少、および筋ジストロフィーの徴候または病理の発症の遅延が含まれる。このような徴候の例には、疲労、精神遅滞、筋衰弱、運動技能の困難（例えば、走行、片足跳び、跳躍）、頻繁な落下、および歩行困難が含まれる。筋ジストロフィーの病理は、例えば、筋繊維の損傷および膜漏出によって特徴付けることができる。アンチセンスオリゴマーについては、この効果は、典型的には、例えば、エキソンスキッピングを誘導するために、選択された標的配列（例えば、ジストロフィン）のスプライシングプロセスを変化させることによって、典型的にはもたらされる。

【0064】

「エキソン」とは、タンパク質をコードする核酸の規定されたセクション、またはプレプロセスされた（もしくは前駆体）RNAのいずれかの部分がスプライシングによって除去された後で、成熟型のRNA分子の中で表される核酸配列をいう。成熟RNA分子は、メッセンジャーRNA（mRNA）または非コードRNAの機能型、例えば、rRNAもしくはtRNAであり得る。ヒトジストロフィン遺伝子は約75エキソンを有する。

【0065】

「イントロン」とは、（遺伝子中の）タンパク質に翻訳されない核酸領域をいう。イントロンは、前駆体mRNA（プレmRNA）に転写される非コードセクションであり、続いて、成熟RNAの形成の間、スプライシングによって除去される。

【0066】

「エキソンスキッピング」とは、全体のエキソンまたはその一部が所定のプレプロセスされたRNAから取り除かれ、それによって、タンパク質に翻訳される成熟mRNAなどの成熟RNA中に存在することから除外されるプロセスを一般的にいう。従って、さもなくばスキップされたエキソンによってコードされるタンパク質の部分は、発現型のタンパク質中には存在せず、典型的には、変化した、しかしなお機能的である、タンパク質の型を作製する。特定の実施形態において、スキップされるエキソンは、ヒトジストロフィン

遺伝子からの異常なエキソンであり、これは、さもなくば異常なスプライシングを引き起こす、その配列中に変異または他の変化を含む可能性がある。特定の実施形態において、スキップされるエキソンは、ジストロフィン遺伝子のエキソン1～75の任意の1つ以上であるが、ヒトジストロフィン遺伝子のエキソン44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、および／または55の任意の1つ以上が好ましい。

【0067】

「ジストロフィン」は、棒状の細胞質タンパク質であり、このタンパク質複合体の必要不可欠な部分が、筋繊維の細胞骨格を、細胞膜を通して周囲の細胞外マトリックスに接続する。ジストロフィンは複数の機能ドメインを含む。例えば、ジストロフィンは、約アミノ酸14～240にアクチン結合ドメイン、および約アミノ酸253～3040に中心棒状ドメインを含む。この大きな中心ドメインは、約109アミノ酸の24スペクトリン様三重らせんエレメントによって形成され、これは、 α アクチニンおよびスペクトリンとの相同性を有する。反復は、典型的には、4つのプロリンリッチ非反復セグメントによって中断され、これはまたヒンジ領域とも呼ばれる。反復15および16は、ジストロフィンのタンパク質分解性切断のための主要な部位を提供するらしい18アミノ酸のストレッチによって分離されている。多くの反復間での配列同一性は10～25%の範囲である。1つの反復は、3つの α ヘリックス：1、2、および3を含む。 α ヘリックス1および3は、各々が7個のヘリクスターンによって形成され、これはおそらく、疎水性界面を通してコイルドコイルとして相互作用する。 α ヘリックス2は、グリシンまたはプロリン残基によって分離される4個または3個のヘリクスターンのセグメントによって形成される。各反復は2つのエキソンによってコードされ、典型的には、 α ヘリックス2の最初の部分におけるアミノ酸47と48の間のイントロンによって中断される。他のイントロンは、この反復中の異なる位置において見い出され、通常はヘリックス3にわたって分散される。ジストロフィンはまた、約アミノ酸3080～3360においてシステインリッチドメインを含み、これは、システインリッチセグメント（すなわち、280アミノ酸中の15システイン）を含み、これは粘菌（*Dictyostelium discoideum*） α アクチニンのC末端ドメインとの相同性を示す。カルボキシ末端ドメインは、アミノ酸約3361～3685にある。

【0068】

ジストロフィンのアミノ末端はFアクチンに結合し、カルボキシ末端は筋細胞膜においてジストロフィン関連タンパク質複合体（DAPC）に結合する。DAPCはジストログリカン、サルコグリカン、インテグリン、およびカベオリンを含み、これらの成分のいずれかにおける変異は、常染色体遺伝性筋ジストロフィーを引き起こす。DAPCは、ジストロフィンが存在しない場合に不安定になり、このことは、メンバーのタンパク質の減少レベルを生じ、そして次には、進行性の繊維損傷および膜の漏出に導く。デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）およびベッカー型筋ジストロフィー（BMD）などの種々の型の筋ジストロフィーにおいて、筋肉細胞は、不正確なスプライシングに導く遺伝子配列の変異に主として起因して、変化しかつ機能的に欠損した型のジストロフィンを産生するか、またはジストロフィンを全く産生しない。欠損型のジストロフィンタンパク質の優勢な発現、またはジストロフィンもしくはジストロフィン様タンパク質の完全な欠如は、上記のように、筋肉変性の急速な進行に導く。この点に関して、「欠損型」ジストロフィンタンパク質は、当該分野において公知であるように、DMDもしくはBMDを有する特定の被験体において産生されるジストロフィンの型によって、または検出可能なジストロフィンの非存在によって特徴付けられるかもしれない。

【0069】

表Aは、種々のジストロフィンドメイン、これらのドメインを包含するアミノ酸残基、およびこれらをコードするエキソンの実例を提供する。

【表 A - 1】

表A

ドメイン	サブドメイン	残基番号	エキソン
アクチン結合 ドメイン		14-240	2-8
中心棒状ドメイン		253-3040	8-61
	ヒンジ 1	253-327	(8)-9
	反復 1	337-447	10-11
	反復 2	448-556	12-14
	反復 3	557-667	14-16
	ヒンジ 2	668-717	17
	反復 4	718-828	(17)-20
	反復 5	829-934	20-21
	反復 6	935-1045	22-23
	反復 7	1046-1154	(23)-(26)
	反復 8	1155-1263	26-27

【 0 0 7 0 】

10

20

【表 A - 2】

	反復 9	1264-1367	28-(30)
	反復 10	1368-1463	30-32
	反復 11	1464-1568	32-(34)
	反復 12	1569-1676	34-35
	反復 13	1677-1778	36-37
	反復 14	1779-1874	38-(40)
	反復 15	1875-1973	40-41
	中断	1974-1991	42
	反復 16	1992-2101	42-43
	反復 17	2102-2208	44-45
	反復 18	2209-2318	46-48
	反復 19	2319-2423	48-50
	ヒンジ 3	2424-2470	50-51
	反復 20	2471-2577	51-53
	反復 21	2578-2686	53-(55)
	反復 22	2687-2802	55-(57)
	反復 23	2803-2931	57-59
	反復 24	2932-3040	59-(61)
	ヒンジ 4	3041-3112	61-64
システインリッチ ドメイン		3080-3360	63-69
	ジストログリカン結合部位	3080-3408	63-70
	WWドメイン	3056-3092	62-63
	EFハンド 1	3130-3157	65
	EFハンド 2	3178-3206	65-66
	ZZドメイン	3307-3354	68-69
カルボキシ末端 ドメイン		3361-3685	70-79
	α 1-シントロフィン結合部位	3444-3494	73-74
	β 1-シントロフィン結合部位	3495-3535	74-75
	(Leu)6-ヘプタッド反復	3558-3593	75

【0071】

本明細書で使用される場合、「機能」および「機能的」という用語および同様の用語は、生物学的、酵素的、または治療的機能をいう。

【0072】

「機能的」ジストロフィンタンパク質とは、典型的には、DMDまたはBMDを有する

10

20

30

40

50

被験体に存在する変化したまたは「欠損」型のジストロフィントタンパク質と比較して、他の点では筋ジストロフィーに特徴的である筋肉組織の進行性の分解を減少するために十分な生物学的活性を有するジストロフィントタンパク質を一般的にいう。特定の実施形態において、機能的ジストロフィントタンパク質は、当該分野における日常的な技術に従って測定されるような、野生型ジストロフィンのインビトロまたはインビボの生物学的活性の約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%（間のすべての整数を含む）を有してもよい。1つの例として、インビトロでの筋肉培養におけるジストロフィン関連活性は、筋管サイズ、筋原線維組織（組織崩壊）、収縮能、およびアセチルコリン受容体の自発的クラスター化に従って測定できる（例えば、Brownら、Journal of Cell Science、112：209-216、1999を参照のこと）。動物モデルもまた、疾患の病原を研究するための価値ある資源であり、ジストロフィン関連活性を試験するための手段を提供する。DMD研究のために最も広範に使用されている動物モデルのうちの2つは、mdxマウスおよびゴールデンレトリバー筋ジストロフィー（GRMD）ドッグであり、これらの両方がジストロフィンネガティブである（例えば、CollinsおよびMorgan、Int J Exp Pathol 84：165-172、2003を参照のこと）。これらおよび他の動物モデルは、種々のジストロフィントタンパク質の機能的活性を測定するために使用できる。本発明の特定のエキソンスキッピングアンチセンス化合物によって産生される型などの短縮型のジストロフィンが含まれる。

【0073】

「遺伝子」は、染色体上の特定の遺伝子座を占める遺伝の単位を意味し、転写および／もしくは翻訳の調節配列、ならびに／またはコード領域および／もしくは非翻訳配列（すなわち、イントロン、5'および3'非翻訳配列）からなる。

【0074】

「単離された」は、そのネイティブな状態において通常付随する成分を実質的にまたは本質的に含まない物質を意味する。例えば、「単離されたポリヌクレオチド」は、本明細書で使用される場合、その天然に存在する状態でそれに隣接する配列から精製されまたは取り出されているポリヌクレオチド、例えば、DNAフラグメントに通常隣接する配列から取り出されたDNAフラグメントをいってもよい。

【0075】

「増強する」もしくは「増強すること」または「増加する」もしくは「増加すること」または「刺激する」もしくは「刺激すること」とは、アンチセンス化合物がない場合、または対照化合物のいずれかによって引き起こされる応答と比較して、細胞または被験体において、より高い生理学的応答（すなわち、下流効果）を、生じるかまたは引き起こす、1種以上のアンチセンス化合物または組成物の能力を一般的にいう。測定可能な生理学的応答には、機能型のジストロフィントタンパク質の発現の増加、または筋肉組織におけるジストロフィン関連の生物学的活性の増加、とりわけ、当該分野における理解および本明細書の記載から明らかである応答が含まれてもよい。約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の筋肉機能の増加または改善を含む、筋肉機能の増加もまた測定できる。約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の筋繊維におけるジストロフィン発現の増加を含む、機能的ジストロフィンを発現する筋繊維のパーセンテージもまた測定できる。例えば、約40%の筋肉機能の改善は、繊維の25~30%がジストロフィンを発現する場合に起こり得ることが示されてきた（例えば、DeLlorussoら、Proc Natl Acad Sci USA 99：12979-12984、2002を参照のこと）。「増加

した」または「増強された」量は、典型的には、「統計学的に有意な」量であり、アンチセンス化合物がない場合（薬剤の非存在）または対照化合物によって産生される量の1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50倍またはそれ以上（例えば、500、1000倍）（間および1より大きいすべての整数および小数点を含む、例えば、1.5、1.6、1.7、1.8など）である増加を含んでもよい。

【0076】

「減少する」または「阻害する」という用語は、一般的に、診断分野における日常的な技術に従って測定されるような、本明細書に記載される疾患または状態の徴候などの、関連する生理学的または細胞の応答を「低減する」、本発明の1種以上のアンチセンス化合物の能力に関連し得る。関連する生理学的または細胞の応答（インビボまたはインビトロ）は当業者には明白であり、筋ジストロフィーの徴候もしくは病理の減少、または欠損型のジストロフィンの発現の減少を含んでもよい。応答の「減少」は、アンチセンス化合物がない場合、または対照組成物によって産生される応答と比較して、統計学的に有意であってもよく、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の減少を含んでもよく、これには間のすべての整数が含まれる。

【0077】

「相同性」とは、同一であるかまたは保存性置換を構成するアミノ酸のパーセンテージの数をいう。相同性は、GAP (Deverauxら、1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395)などの配列比較プログラムを使用して決定されてもよい。このようにして、本明細書に引用されるものと類似のまたは実質的に異なる長さの配列が、整列へのギャップの挿入によって比較でき、このようなギャップは、例えば、GAPによって使用される比較アルゴリズムによって決定される。

【0078】

「配列同一性」または、例えば、「に50%同一である配列」を含むことの列挙は、本明細書で使用される場合、比較のウィンドウにわたって、ヌクレオチド対ヌクレオチドベースか、またはアミノ酸対アミノ酸ベースで、配列が同一である程度をいう。従って、「配列同一性のパーセンテージ」は、比較のウィンドウにわたって、2つの最適に整列された配列を比較することにより計算されてもよく、同一の核酸塩基（例えば、A、T、C、G、I）または同一のアミノ酸残基（例えば、Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys、およびMet）が両方の配列中に存在し、一致する位置の数を生じる位置の数を決定すること、比較のウィンドウにおける位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）によって一致した位置の数を除算すること、および結果に100を乗算して配列同一性のパーセンテージを生じることによって計算されてもよい。

【0079】

2つ以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの間の配列の関連性を説明するために使用される用語には、「参照配列」「比較ウィンドウ」「配列同一性」「配列同一性のパーセンテージ」および「実質的同一性」が含まれる。「参照配列」は、ヌクレオチドおよびアミノ酸残基の長さの、両端を含む、少なくとも8または10個であるが、頻繁には15~18個、しばしば少なくとも25個のモノマー単位である。2つのポリヌクレオチドは、各々が（1）2つのポリヌクレオチド間で類似している配列（すなわち、完全なポリヌクレオチド配列の一部のみ）、および（2）2つのポリヌクレオチド間で不一致の配列を含んでもよく、2つ（またはそれ以上）のポリヌクレオチドの間の配列比較が、典型的には、「比較ウィンドウ」にわたって2つのポリヌクレオチドの配列を比較することによって実施されて、配列類似性の局所的領域を同定および比較する。「比較ウィンドウ」と

は、少なくとも6個、通常は約50～約100個、より通常には約100～約150個の連続する位置の概念的なセグメントをいい、ここでは、2つの配列が最適に整列された後で、1つの配列が同じ数の連続する位置の参照配列と比較される。比較ウィンドウは、2つの配列の最適な整列のために、参照配列（これは付加または欠失を含まない）と比較した場合に、約20%以下の付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含んでもよい。比較ウィンドウを整列させるための配列の最適な整列は、コンピュータ化されたアルゴリズムの手段（the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USAにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）によって、または検査および選択された種々の方法のいずれかによって生成された最良の整列（すなわち、比較ウィンドウにわたって最高の相同性パーセンテージを生じる）によって実施されてもよい。参照はまた、例えば、Altschulら、1997, Nucl. Acids Res. 25:3389によって開示されるような、BLASTファミリーのプログラムに対してなされてもよい。配列分析の詳細な議論は、Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15のUnit 19.3において見い出すことができる。

【0080】

個体（例えば、ヒトなどの哺乳動物）または細胞の「治療」または「治療すること」は、個体または細胞の天然の経過を変化させる試みにおいて使用される任意の型の介入を含んでもよい。治療には、薬学的組成物の投与が含まれるがこれに限定されず、予防的に、または病理的な事象の開始もしくは病因との接触に引き続いてのいずれかで実施されてもよい。治療は、特定の型の筋ジストロフィーにおけるような、ジストロフィンタンパク質と関連する疾患または状態の徴候または病理に対する任意の望ましい効果を含んでもよく、そして、例えば、治療される疾患または状態の1つ以上の測定可能なマーカーにおける最小限の変化または改善を含んでもよい。「予防的」処置もまた含まれ、これは、治療される疾患または状態の進行の速度を減少すること、その疾患または状態の発症を遅延させること、またはその発症の重篤度を減少することを指向できる。「治療」または「予防」は、疾患もしくは状態、またはそれに関連する徴候の完全な根絶、治癒、または妨害を必ずしも示すものではない。

【0081】

従って、その必要がある患者に、任意に、薬学的製剤または剤形の一部として、本発明の1種以上のアンチセンスオリゴマー（例えば、配列番号1～569および612～635、およびその改変体）を投与することによって、DMDおよびBMDなどの筋ジストロフィーを治療する方法が含まれる。1種以上のアンチセンスオリゴマーを投与することによって被験体においてエキソンスキッピングを誘導する方法もまた含まれ、ここでは、エキソンは、ジストロフィン遺伝子からのエキソン44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、および／または55の1つであり、好ましくはヒトジストロフィン遺伝子である。「被験体」には、本明細書で使用される場合、本発明のアンチセンス化合物で治療できる、徴候を示しているかまたは徴候を示すリスクがある任意の動物、例えば、DMDもしくはBMD、またはこれらの状態に関連する徴候のいずれか（例えば、筋繊維の損失）を有するかまたは有するリスクがある被験体が含まれる。適切な被験体（患者）には、実験用動物（マウス、ラット、ウサギ、またはモルモットなど）、家畜、および家庭内の動物またはペット（ネコまたはイヌなど）が含まれる。非ヒト霊長類および、好ましくは、ヒト患者が含まれる。

【0082】

本発明のオリゴマー性、ジストロフィン標的化配列を発現可能であるベクター送達系、例えば、本明細書に記載されるような、配列番号1～569および612～635、またはその改変体の任意の1つ以上を含むポリヌクレオチド配列を発現するベクターもまた含

まれる。「ベクター」または「核酸構築物」は、例えば、プラスミド、バクテリオファージ、酵母、またはウイルスに由来し、ポリヌクレオチドがそこに挿入またはクローニングできるポリヌクレオチド分子、好ましくはDNA分子を意味する。ベクターは、好ましくは、1つ以上の独特な制限部位を含み、標的細胞もしくは組織または前駆細胞もしくはその組織を含む規定された宿主細胞中での自律的複製が可能であり得、あるいはクローニングされた配列が再生可能であるように、規定された宿主細胞のゲノムと統合可能であり得る。従って、ベクターは、自律的に複製可能なベクター、すなわち、染色体外の実体として存在するベクターであり得、その複製は、染色体の複製とは独立しており、例えば、線状または閉環状プラスミド、染色体外エレメント、ミニ染色体、または人工染色体である。ベクターは自己複製を確実にするための任意の手段を含むことができる。または、ベクターは、宿主細胞に導入されるときに、ゲノムに組み込まれ、それが組み込まれた染色体と一緒に複製されるものであり得る。

10

【0083】

ベクターまたは核酸構築物系は、単一のベクターまたはプラスミド、2つ以上のベクターまたはプラスミドを含むことができ、これらは、一緒に、宿主細胞のゲノムに導入される全DNA、またはトランスポゾンを含む。ベクターの選択は、典型的には、ベクターが導入される宿主細胞とのベクターの適合可能性に依存する。今の場合においては、ベクターまたは核酸構築物は、好ましくは、筋肉細胞などの哺乳動物細胞中で作動可能に機能的であるものである。ベクターはまた、抗生物質もしくは薬物耐性遺伝子、またはレポーター遺伝子（すなわち、グリーン蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ）などの選択マーカーも含むことができ、これらは、適切な形質転換体またはトランスフェクト体の選択または同定のために使用できる。例示的な送達系には、ウイルスベクター系（すなわち、ウイルス媒介性形質導入）を含んでもよく、これには、当該分野に公知であるものの中でも、レトロウイルス（例えば、レンチウイルス）ベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、およびヘルペスウイルスベクターが含まれるがこれらに限定されない。

20

【0084】

「作動可能に連結される」という用語は、本明細書で使用される場合、プロモーターの調節的制御下にオリゴマーをコードする配列を配置し、次いで、オリゴマーの転写を制御することを意味する。

30

【0085】

野生型遺伝子または遺伝子産物は、集団中で最も頻繁に観察され、従って、任意にその遺伝子の「正常」または「野生型」の型と称される。

【0086】

「アルキル」または「アルキレン」は、両方とも、1～18個の炭素を含む飽和の直鎖または分枝鎖の炭化水素基をいう。例には、非限定的に、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、およびn-ヘキシルが含まれる。「低級アルキル」という用語は、本明細書で規定されるようなアルキル基をいい、1～8個の間の炭素を含む。

【0087】

「アルケニル」とは、2～18個の炭素を含有し、少なくとも1つの炭素から炭素の間の二重結合を含む、不飽和の直鎖または分枝鎖の炭化水素基をいう。例には、非限定的に、エテニル、プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、イソブテニル、tert-ブテニル、n-ペンテニル、およびn-ヘキセニルが含まれる。「低級アルケニル」という用語は、本明細書で規定されるようなアルケニル基をいい、2～8個の間の炭素を含む。

40

【0088】

「アルキニル」とは、2～18個の炭素を含有し、少なくとも1つの炭素から炭素の間の三重結合を含む、不飽和の直鎖または分枝鎖の炭化水素基をいう。例には、非限定的に、エチニル、プロピニル、イソプロピニル、ブチニル、イソブチニル、tert-ブチニル、ペンチニル、およびヘキシニルが含まれる。「低級アルキニル」という用語は、

50

本明細書で規定されるようなアルキニル基をいい、2～8個の間の炭素を含む。

【0089】

「シクロアルキル」とは、モノーまたはポリー環状アルキル基をいう。例には、非限定的に、シクロブチル、シクロペンチル (cycopentyl)、シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが含まれる。

【0090】

「アリール」とは、1つ以上の閉環を有する5～18個の炭素を含む環状芳香族炭化水素部分をいう。例には、非限定的に、フェニル、ベンジル、ナフチル、アントラセニル、フェナントラセニル、およびビフェニルが含まれる。

【0091】

「アラルキル」とは、化学式 $R^a R^b$ の基をいい、ここで、 R^a が上記に規定されるようなアルキレン鎖であり、 R^b が上記に規定されるような1つ以上のアリール基であり、例えば、ベンジル、ジフェニルメチルなどである。

【0092】

「チオアルコキシ」とは、化学式 $-S R^c$ の基をいい、ここで、 R^c は、上記に規定されるようなアルキル基である。「低級チオアルコキシ」という用語は、本明細書に規定されるような、1～8個の間の炭素を含むアルコキシ基をいう。

【0093】

「アルコキシ」とは、化学式 $-O R^d$ の基をいい、ここで、 R^d は本明細書に規定されるようなアルキル基である。「低級アルキル」という用語は、本明細書に規定されるような、1～8個の間の炭素を含むアルコキシ基をいう。アルコキシ基の例には、非限定的に、メトキシおよびエトキシが含まれる。

【0094】

「アルコキシアルキル」とは、アルコキシ基で置換されたアルキル基をいう。

【0095】

「カルボニル」とは、 $-C(=O)-$ 基をいう。

【0096】

「グアニジニル」とは、 $H_2N(C=NH_2)-NH-$ 基をいう。

【0097】

「アミジニル」とは、 $H_2N(C=NH_2)CH-$ 基をいう。

【0098】

「アミノ」とは、 $-NH_2$ 基をいう。

【0099】

「アルキルアミノ」とは、化学式 $-NHR^d$ または $-NR^dR^d$ の基をいい、ここで、各 R^d は、独立して、本明細書に規定されるようなアルキル基である。「低級アルキルアミノ」という用語は、本明細書に記載されるような、1～8個の間の炭素を含むアルキルアミノ基をいう。

【0100】

「複素環」とは、5～7員単環式、または7～10員二環式の、飽和、不飽和、または芳香族のいずれかであり、かつ窒素、酸素、および硫黄から独立して選択される1～4個のヘテロ原子を含む複素環を意味し、ここで、窒素および硫黄ヘテロ原子は任意に酸化されてもよく、そして窒素ヘテロ原子は、任意に四級化されてもよく、上記のヘテロ環のいずれかがベンゼン環に縮合されている二環式環を含む。複素環は任意のヘテロ原子または炭素原子を介して結合されてもよい。複素環には以下に定義されるようなヘテロアリールが含まれる。従って、以下に列挙されるヘテロアリールに加えて、複素環には、モルホリニル、ピロリジノニル、ピロリジニル、ペペリジニル (piperidiny l)、ペペリジニル (piperizyny l)、ヒダントイニル、バレロラクタミル、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロチオフエニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオピラニルなどもまた含まれる。

10

20

30

40

50

【0101】

「ヘテロアリアル」とは、5～10員であり、窒素、酸素、および硫黄から選択される少なくとも1つのヘテロ原子を有し、かつ少なくとも1つの炭素原子を含有し、単環系と二環系の両方を含む、芳香族複素環を意味する。代表的なヘテロアリアルは、ピリジル、フリル、ベンゾフラニル、チオフエニル、ベンゾチオフエニル、キノリニル、ピロリル、インドリル、オキサゾリル、ベンズオキサゾリル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、チアゾリル、ベンゾチアゾリル、イソキサゾリル、ピラゾリル、イソチアゾリル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、シノリニル、フタラジニル、およびキナゾリニルである。

【0102】

「任意に置換されたアルキル」、「任意に置換されたアルケニル」、「任意に置換されたアルコキシ」、「任意に置換されたチオアルコキシ」、「任意に置換されたアルキルアミノ」、「任意に置換された低級アルキル」、「任意に置換された低級アルケニル」、「任意に置換された低級アルコキシ」、「任意に置換された低級チオアルコキシ」、「任意に置換された低級アルキルアミノ」、および「任意に置換されたヘテロシクリル」とは、置換されたときに、少なくとも1つの水素原子が置換基に置き換えられていることを意味する。オキソ置換基(=O)の場合においては、2つの水素原子が置き換えられる。この点に関して、置換基には、重水素、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換された複素環、任意に置換されたシクロアルキル、オキソ、ハロゲン、 $-CN$ 、 $-OR_x$ 、 NR_xR_y 、 $NR_xC(=O)R_y$ 、 $NR_xSO_2R_y$ 、 $-NR_xC(=O)NR_xR_y$ 、 $C(=O)R_x$ 、 $C(=O)OR_x$ 、 $C(=O)NR_xR_y$ 、 $-S OmR_x$ 、および $-S OmNR_xR_y$ が含まれ、ここで、 m は0、1、または2であり、 R_x および R_y は同じかまたは異なり、独立して、水素、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換された複素環、任意に置換されたシクロアルキル、または任意に置換されたシクロアルキルであり、上記の任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルケニル、任意に置換されたアルキニル、任意に置換されたアリール、任意に置換された複素環、任意に置換されたシクロアルキル、および任意に置換されたシクロアルキル置換基の各々は、オキソ、ハロゲン、 $-CN$ 、 $-OR_x$ 、 NR_xR_y 、 $NR_xC(=O)R_y$ 、 $NR_xSO_2R_y$ 、 $-NR_xC(=O)NR_xR_y$ 、 $C(=O)R_x$ 、 $C(=O)OR_x$ 、 $C(=O)NR_xR_y$ 、 $-S OmR_x$ 、および $-S OmNR_xR_y$ の1つ以上でさらに置換されてもよい。

【0103】

アンチセンスオリゴヌクレオチドの構築

リンを含有する骨格連結を有するモルホリノオリゴヌクレオチドの例は図1A～1Cに図示されている。とりわけ好ましいものは、図1Cに示されるような、ホスホロジアミデート連結モルホリノオリゴヌクレオチドであり、これは、本発明の1つの局面に従うと、その骨格連結の好ましくは10%～50%で正に荷電した基を含むように修飾されている。アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、電荷を有さない骨格連結を有するモルホリノオリゴヌクレオチドおよびそれらの調製は、例えば、SummertonおよびWeller 1997において、ならびに共有に係る米国特許第5,698,685号、同第5,217,866号、同第5,142,047号、同第5,034,506号、同第5,166,315号、同第5,185,444号、同第5,521,063号、および同第5,506,337号において詳述され、これらのすべては参照により本発明に明確に援用される。

【0104】

モルホリノベースのサブユニットの重要な特性には以下が含まれる：1) 安定な、電荷を有さない、または正電荷を有する骨格連結による、オリゴマー型で連結される能力；2) 形成されたポリマーが、比較的短いオリゴヌクレオチド(例えば、10～15塩基)において約45℃より高い T_m で、標的RNAを含む相補塩基標的核酸とハイブリダイズで

きるように、ヌクレオチド塩基（例えば、アデニン、シトシン、グアニン、チミジン、ウラシル、およびイノシン）を支持する能力；3）オリゴヌクレオチドが哺乳動物細胞に能動的または受動的に輸送される能力；ならびに4）アンチセンスオリゴヌクレオチド：RNAヘテロ二重鎖が、RNAseおよびRNAseH分解にそれぞれ抵抗する能力。

【0105】

特許請求された対象のアンチセンスオリゴヌクレオチドについての例示的な骨格構造には、各々が電荷を有さないかまたは正電荷を有する、リンを含有するサブユニット連結によって連結されている、図1D～Gに示されるモルホリノサブユニット型が含まれる。図1Dは、5個の原子の反復単位の骨格を形成する、リンを含有する連結を示し、ここで、モルホリノ環は、1原子ホスホアミド連結によって連結されている。図1Eは、6原子反復単位骨格を生じる連結を示す。この構造において、5'モルホリノ炭素をリン基に連結する原子Yは硫黄、窒素、炭素、または好ましくは、酸素であってもよい。リンからのX部分ペンドントは、フッ素、アルキルもしくは置換アルキル、アルコキシもしくは置換アルコキシ、チオアルコキシもしくは置換チオアルコキシ、または非置換、一置換、もしくは二置換窒素であってもよく、モルホリンまたはピペリジンなどの環状構造を含む。アルキル、アルコキシ、およびチオアルコキシには、好ましくは、1～6個の炭素原子が含まれる。Z部分は硫黄または酸素であり、好ましくは酸素である。

【0106】

図1Fおよび1Gに示される連結は、7原子単位長骨格と称する。構造1Fにおいて、X部分は構造1Eと同様であり、Y部分はメチレン、硫黄、または好ましくは酸素であってもよい。構造1Gにおいて、XおよびY部分は構造1Eと同様である。特に好ましいモルホリノオリゴヌクレオチドには、図1Eに示される型のモルホリノサブユニット構造から構成されるものが含まれ、ここで、 $X = NH_2$ 、 $N(CH_3)_2$ 、任意に置換された1-ピペラジニル、または他の電荷を有する基、 $Y = O$ 、および $Z = O$ である。

【0107】

上述のように、電荷を有さないかまたは実質的に電荷を有さないオリゴヌクレオチドは、本発明の態様に従って、例えば、2～5個の電荷を有さない連結あたり約1個までの電荷を有する連結、例えば、10個の電荷を有さない連結あたり約4～5個の連結を含むように修飾されてもよい。アンチセンス活性の最適な改善は、骨格連結の約25%がカチオン性である場合に見られ得、これには約20%～約30%が含まれる。約35%、40%、45%、50%、55%、60%（間のすべての整数を含む）またはそれ以上の骨格連結がカチオン性であるオリゴマーもまた含まれる。増強はまた、小さな数、例えば、5%または10～20%のカチオン性連結でもまた見られる。

【0108】

オリゴヌクレオチドアナログにおける実質的に電荷を有さないリンを含有する骨格は、典型的には、サブユニット連結の大部分、例えば、その連結の50%～100%、典型的には少なくとも60%～100%または75%または80%が、生理学的pHにおいて電荷を有さず、単一のリン原子を含むものである。

【0109】

本発明を支持して実施されるさらなる実験は、加えられたカチオン性骨格の電荷に伴って見られる増強が、ある場合において、例えば、10個の最も中心の連結において局在化されたこれらの荷電した連結の少なくとも70%を有する、8個のカチオン性骨格連結を有する20マーオリゴヌクレオチドにおいて、アンチセンスオリゴヌクレオチドの「中心領域」骨格連結に密接した正味の電荷を分配することによってさらに増強され得ることを示す。

【0110】

アンチセンス化合物は、段階的固相合成によって、電荷を有さない連結およびカチオン性骨格連結の混合物を有するオリゴヌクレオチドの合成に関して、上記および下記に引用される参考文献に詳述される方法を利用して調製できる。ある場合において、アンチセンス化合物にさらなる化学的部分を加えること、例えば、薬物動態を増強すること、または

化合物の捕捉もしくは検出を容易にすることが所望されてもよい。このような部分は、標準的な合成方法に従って、典型的には、オリゴマーの末端に共有結合されてもよい。例えば、ポリエチレングリコール部分または他の親水性ポリマー、例えば、10～100個のモノマーサブユニットを有するものの付加が、溶解度を増強するために有用であり得る。1つ以上の電荷を有する基、例えば、有機酸などのアニオン性荷電基は、細胞の取り込みを増強し得る。フロオレセインまたは放射性基などのレポーター部分が、検出の目的のために結合されてもよい。または、オリゴマーに結合されたレポーター標識は、標識された抗体またはスト렙トアビジンを結合可能な、抗原またはビオチンなどのリガンドであってもよい。アンチセンス化合物の結合または修飾のための部分を選択する際に、望ましくない副作用を伴わずに、生体適合性であるかまたは被験体によって耐えられる可能性が高い、化学化合物の基を選択することが当然一般的に望ましい。

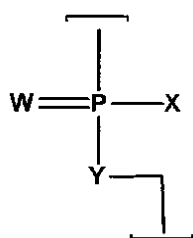
10

【0111】

上述のように、アンチセンス化合物は、上記の型の電荷を有さない連結が分散している選択された数のカチオン性連結を含むように構築できる。電荷を有さないものおよびカチオン性の両方のサブユニット間連結は、好ましくは、リンを含有する連結であり、構造(I I)：

【0112】

【化2】



(II)

20

を含み、

ここで：

Wは-S-または-O-、好ましくは、-O-であり、

X=-NR¹R²または-OR⁶、

Y=-O-または-NR⁷、および

オリゴマー中の各上記連結は以下から選択され：

(a) 電荷を有さない連結(a)、ここで、R¹、R²、R⁶、およびR⁷の各々は、水素および低級アルキルから独立して選択され；

(b1) カチオン性連結(b1)、ここで、X=-NR¹R²でありかつY=-O-であり、-NR¹R²は任意に置換されたピペラジニル部分を表し、その結果、R¹R²=-CHRCHRN(R³)(R⁴)CHRCHR-であり、ここで：

各Rは独立してHまたは-CH₃であり、

R⁴はH、-CH₃、または電子対であり；および

R³は、H、任意に置換された低級アルキル、-C(=NH)NH₂、-Z-L-NHC(=NH)NH₂、および[-C(=O)CHR'NH]_mHであり、ここで、Zは-C(=O)-または直接結合であり、Lは、18原子長まで、好ましくは12原子長まで、およびより好ましくは8原子長までの任意のリンカーであり、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、任意に置換されたアルキルアミノから選択される結合を有し、R'は天然に存在するアミノ酸またはその1個もしくは2個の炭素ホモログの側鎖であり、mは1～6であり、好ましくは1～4であり；

40

(b2) カチオン性連結(b2)、ここで、X=-NR¹R²およびY=-O-、R¹=Hまたは-CH₃、およびR²=LNR³R⁴R⁵であり、ここで、L、R³、およびR⁴は上記に定義された通りであり、R⁵は、H、任意に置換された低級アルキル、または任意に置換された低級(アルコキシ)アルキルであり；ならびに

50

(b 3) カチオン性連結 (b 3)、ここで、 $Y = -NR^7$ および $X = -OR^6$ 、および $R^7 = -LNR^3R^4R^5$ であり、ここで、L、 R^3 、 R^4 、および R^5 は上記に定義された通りであり、 R^6 は、H または任意に置換された低級アルキルであり；ならびに

少なくとも 1 つの上記連結はカチオン性連結 (b 1)、(b 2)、および (b 3) から選択される。

【0113】

好ましくは、このオリゴマーは、(a) 型（すなわち、電荷を有さない連結）の少なくとも 2 つの連続する連結を含む。さらなる実施形態において、オリゴマー中の少なくとも 5 % の連結がカチオン性連結（すなわち、(b 1) 型、(b 2) 型、または (b 3) 型）である；例えば、10 % ~ 60 %、好ましくは、20 ~ 50 % の連結がカチオン性連結である。

10

【0114】

1 つの実施形態において、少なくとも 1 つの連結は (b 1) 型であり、ここで、好ましくは、各 R は H であり、 R^4 は、H、 $-CH_3$ 、または電子対であり、 R^3 は、H、任意に置換された低級アルキル、 $-C(=NH)NH_2$ 、および $-C(=O)-L-NHC(=NH)NH_2$ である。 R^3 の後者の 2 つの実施形態は、ピペラジン環、またはリンカー基 L へのペンダントのいずれかに、それぞれ直接的に結合されるグアニジノ部分を提供する。合成の容易さのために、 R^3 における変数 Z は、好ましくは、示されるように $-C(=O)-$ である。

【0115】

20

リンカー基 L は、上述のように、任意に置換されたアルキル、任意に置換されたアルコキシ、および任意に置換されたアルキルアミノから選択されるその骨格中の結合を含み、ここで、L における末端原子（例えば、カルボニルまたは窒素に隣接するもの）は炭素原子である。分枝連結が可能であるが、リンカーは、好ましくは、非分枝である。1 つの実施形態において、リンカーは直鎖状アルキルリンカーである。このようなリンカーは構造 $-(CH_2)_n-$ を有してもよく、ここで、n は 1 ~ 12、好ましくは 2 ~ 8、より好ましくは 2 ~ 6 である。

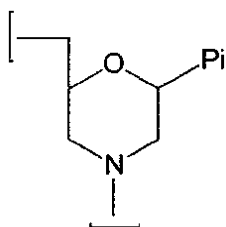
【0116】

モルホリノサブユニットは以下の構造 (III) を有し：

【0117】

30

【化 3】



(III)

ここで、Pi は塩基対形成部分であり、上記に示された連結は (III) の窒素原子を隣接するサブユニットの 5' 炭素に接続する。塩基対形成部分 Pi は、同じかまたは異なってもよく、一般的には、標的核酸に結合する配列を提供するように設計される。

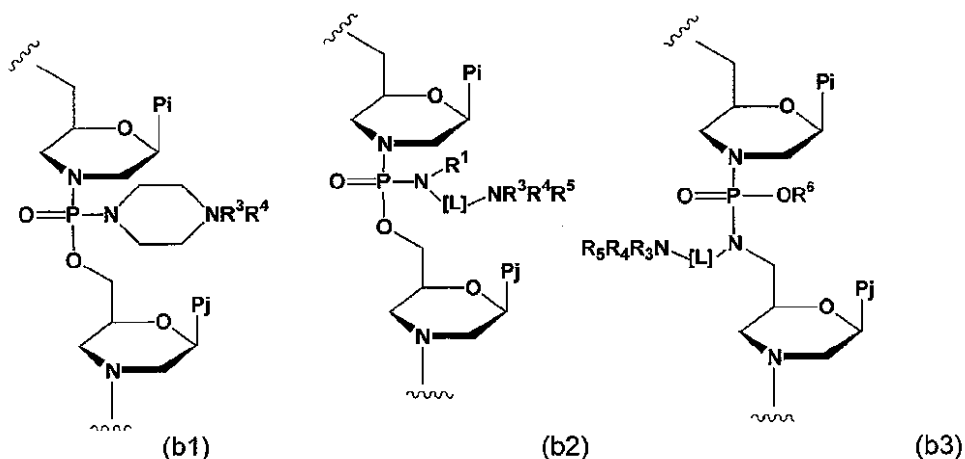
40

【0118】

モルホリノサブユニット (III) を連結するための上記の連結型 (b 1)、(b 2)、および (b 3) の実施形態の使用は、以下のように図式的に例証されてもよい：

【0119】

【化 4】



10

好ましくは、オリゴマー中のすべてのカチオン性連結は同じ型である；すなわち、すべて (b1) 型、すべて (b2) 型、またはすべて (b3) 型である。

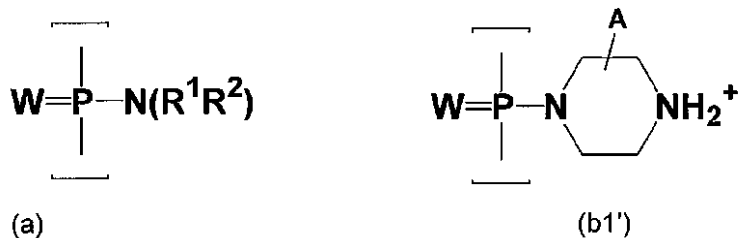
【0120】

さらなる実施形態において、カチオン性連結は、以下に示される連結 (b1') および (b1'') から選択され、ここで、(b1') は本明細書では「Pip」連結と呼ばれ、(b1'') は本明細書では「GuX」連結と呼ばれる。

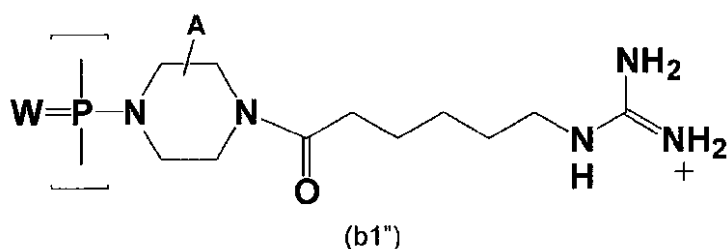
20

【0121】

【化 5】



30



上記の構造において、WはSまたはOであり、そして好ましくはOであり；R¹およびR²の各々は、独立して、水素および任意に置換された低級アルキルから選択され、そして好ましくはメチルであり；ならびにAは、(b1')および(b1'')中の1つ以上の炭素原子上の水素または非干渉置換基（すなわち、その意図される標的にオリゴマーが結合する能力に有害な影響を与えない置換基）を表す。好ましくは、ピペラジン環中の環炭素は置換されていない；しかし、ピペラジン環の環炭素は、メチルまたはフッ素などの非干渉置換基を含んでもよい。好ましくは、最大で1個または2個の炭素原子がそのように置換されている。

40

【0122】

さらなる実施形態において、少なくとも10%の連結が(b1')型または(b1'')型であり；例えば、10%~60%、好ましくは20%~50%の連結が(b1')型または(b1'')型であってもよい。

【0123】

50

他の実施形態において、オリゴマーは、上記の (b 1') 型の連結を含まない。または、オリゴマーは、(b 1) 型の連結を含まず、ここで、各 R は H であり、R³ は H または -CH₃ であり、そして R⁴ は H、-CH₃、または電子対である。

【0124】

モルホリノサブユニットは、以下にさらに記載されるように、非リンベースのサブユニット間連結によってもまた連結されてもよく、ここで、少なくとも 1 つの連結が、上記のようなペンダントカチオン性基で修飾される。

【0125】

非修飾状態では電荷を有さないが、ペンダントアミン置換基を有することもできる、他のオリゴヌクレオチドアナログ連結が使用できる。例えば、モルホリノ環上の 5' 窒素原子は、スルファミド連結またはウレア連結中で利用でき（ここで、リンは炭素または硫黄でそれぞれ置き換えられる）、上記の構造 (b 3) 中の 5' 窒素原子に類似の様式で修飾される。

【0126】

任意の数のカチオン性連結を有するオリゴマーが提供され、これには、完全にカチオン性連結されたオリゴマーが含まれる。しかし、好ましくは、オリゴマーは、例えば、10%~80%、部分的に電荷を有する。好ましい実施形態において、約 10~60%、および好ましくは 20%~50% の連結がカチオン性である。

【0127】

1 つの実施形態において、カチオン性連結は、骨格に沿って分散している。部分的に電荷を有するオリゴマーは、好ましくは、少なくとも 2 つの連続する電荷を有さない連結を含み；すなわち、オリゴマーは、その全体の長さに沿って、厳密に互い違いのパターンを有するわけではない。

【0128】

カチオン性連結のブロックおよび電荷を有さない連結のブロックを有するオリゴマーもまた考慮され；例えば、電荷を有さない連結の中心ブロックは、カチオン性連結のブロックによって隣接されてもよく、その逆もあり得る。1 つの実施形態において、オリゴマーは、およそ等しい長さの 5'、3' および中心領域を有し、中心領域におけるカチオン性連結のパーセンテージは、約 50% より大きく、好ましくは約 70% より大きい。

【0129】

アンチセンス適用における使用のためのオリゴマーは、一般的には、約 10~約 40 サブユニットの長さの範囲であり、より好ましくは約 10~30 サブユニット、典型的には 15~25 塩基、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または 40 塩基を有するものが含まれる。特定の実施形態において、アンチセンス化合物のための有用な長さである 19~20 サブユニットを有する本発明のオリゴマーは、理想的には、2~10 個、例えば、4 個~8 個のカチオン性連結、および残りの電荷を有さない連結を有してもよい。14~15 サブユニットを有するオリゴマーは、理想的には、2~7 個、例えば、3~5 個のカチオン性連結、および残りの電荷を有さない連結を有してもよい。

【0130】

各モルホリノ環構造は、治療される細胞または被験体において、選択されたアンチセンス標的にハイブリダイズするように典型的に設計されている、塩基対形成部分の配列を形成するように、塩基対形成部分を支持する。塩基対形成部分は、ネイティブ DNA または RNA において見い出されるプリンもしくはピリミジン（例えば、A、G、C、T、または U）、またはヒポキサンチン（ヌクレオシドイノシンの塩基成分）もしくは 5-メチルシトシンなどのアナログであってもよい。

【0131】

ペプチドトランスポーター

本発明のアンチセンス化合物は、細胞への化合物の輸送を増強するために有効なアルギ

10

20

30

40

50

ニンリッチペプチド輸送部分に結合体化されたオリゴヌクレオチド部分を含んでもよい。輸送部分は、好ましくは、例えば、図1 Bおよび1 Cに示されるように、オリゴマーの末端に結合されている。このペプチド輸送部分は、好ましくは、X' サブユニット、Y' サブユニット、およびZ' サブユニットから選択される6～16個のサブユニットを含み、ここで：

(a) 各X' サブユニットは、独立して、リジン、アルギニン、またはアルギニンアナログを表し、上記アナログは、構造 $R^1 N = C(NH_2) R^2$ の側鎖を含むカチオン性αアミノ酸であり、ここで、 R^1 はHまたはRであり； R^2 は、R、 $-NH_2$ 、 $-NHR$ 、または $-NR_2$ であり、ここで、Rは任意に置換された低級アルキルまたは任意に置換された低級アルケニルであり； R^1 および R^2 は一緒に結合されて環を形成してもよく；そして側鎖は R^1 または R^2 を介して上記アミノ酸に連結され；

(b) 各Y' サブユニットは、独立して、中性アミノ酸 $-C(=O) - (CH_2)_n - NH-$ を表し、ここで、nは2～7であり、各Rは独立して、Hまたはメチルであり；ならびに

(c) 各Z' サブユニットは、独立して、中性アルキル側鎖を有するαアミノ酸を表し；

ここで、ペプチドは、 $(X' Y' X')_p$ 、 $(X' Y')_m$ 、および/または $(X' Z' Z')_p$ の少なくとも1つによって表される配列を含み、ここで、pは2～5であり、mは2～8である。特定の実施形態は、 $(X' Y' X')_p$ 、 $(X' Y')_m$ 、および/または $(X' Z' Z')_p$ から独立して選択される種々の組み合わせを含み、これには、例えば、配列 $(X' Y' X') (X' Z' Z') (X' Y' X') (X' Z' Z')$ (配列番号637) を有するペプチドが含まれる。

【0132】

選択された実施形態において、各X' について、側鎖部分は、アミノ酸サブユニットアルギニン(Ar g)におけるのと同様に、グアニジルである。特定の実施形態において、各Y' は、独立して、 $-C(=O) - (CH_2)_n - CHR - NH-$ であり、ここで、nは2～7であり、RはHである。例えば、nが5でありかつRがHである場合、Y' は6-アミノヘキサン酸サブユニットであり、本明細書ではAhxと省略され；nが2でありかつRがHである場合、Y' はβアラニンサブユニットであり、本明細書ではBと省略される。特定の実施形態は、異なる中性アミノ酸の組み合わせを有するキャリアペプチドに関し、これには、例えば、βアラニンおよび6-アミノヘキサン酸の両方を含む、配列 $RahxRRBRRAh xRRBRRAh xB-$ (配列番号578) を含むペプチドが含まれる。

【0133】

この型の好ましいペプチドには、単一のY' サブユニットを交互に含むアルギニン二量体を含むものが含まれ、ここで、Y' は、好ましくは、AhxまたはBまたはその両方である。例には、式 $(RY'R)_p$ および/または式 $(RRY')_p$ を有するペプチドが含まれ、ここで、pは1～2～5であり、ここでY' は好ましくはAhxである。1つの実施形態において、Y' は6-アミノヘキサン酸サブユニットであり、Rはアルギニンであり、pは4である。特定の実施形態は、少なくとも2つの $(RY'R)_p$ および $(RRY')_p$ の種々の線状の組み合わせを含み、これには、例えば、配列 $(RY'R) (RRY') (RY'R) (RRY')$ (配列番号638) または $(RRY') (RY'R) (RRY') (RY'R)$ (配列番号639) を有する例示的なペプチドが含まれる。他の組み合わせが意図される。さらなる例示的な実施形態において、各Z' はフェニルアラニンであり、mは3または4である。

【0134】

結合体化ペプチドは、好ましくは、リンカー $Ah x - B$ を介してオリゴマーの末端に連結され、ここで、例えば、図1 Bおよび1 Cに示されるように、Ahxは、6-アミノヘキサン酸サブユニットであり、Bはβアラニンサブユニットである。

【0135】

10

20

30

40

50

選択された実施形態において、各X'について、側鎖部分は、独立して、グアニジル ($\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{NH}-$)、アミジニル ($\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{CH}-$)、2-アミノジヒドロピリミジル、2-アミノテトラヒドロピリミジル、2-アミノピリジニル、および2-アミノピリミドニルからなる群より選択され、好ましくは、グアニジルおよびアミジニルから選択される。1つの実施形態において、側鎖部分は、アミノ酸サブユニットアルギニン (Arg) におけるのと同様に、グアニジルである。

【0136】

特定の実施形態において、Y'サブユニットは、X'サブユニットがY'サブユニット間に介入しないか、または単独でX'サブユニット間に分散しないという点で、連続してもよい。特定の実施形態において、連結サブユニットは、Y'サブユニット間にあってもよい。1つの実施形態において、Y'サブユニットは、トランスポーターの末端にあり；他の実施形態において、これらはX'サブユニットによって隣接されている。さらに好ましい実施形態において、各Y'は、 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CHR}-\text{NH}-$ であり、ここで、nは2~7であり、RはHである。例えば、nが5であり、RがHである場合、Y'は6-アミノヘキサン酸サブユニットであり、本明細書ではAhxと省略される。この基の選択される実施形態において、各X'は、アルギニンサブユニット中と同様に、グアニジル側鎖部分を含む。この型の好ましいペプチドには、単一のY'サブユニットと交互になっているアルギニン二量体を含むものが含まれ、ここで、Y'は好ましくはAhxである。例には、式 $(\text{RY}'\text{R})_4$ または式 $(\text{RRY}')_4$ を有するペプチドが含まれ、ここで、Y'は、好ましくはAhxである。後者の場合において、核酸アナログは、例えば、図1Bおよび1Cに示されるように、好ましくは、C末端において、末端Y'サブユニットに好ましく連結される。好ましいリンカーは、構造AhxBのものであり、ここで、Ahxは6-アミノヘキサン酸サブユニットであり、Bはβアラニンサブユニットである。

【0137】

上記のような輸送部分は、結合された輸送オリゴマーの非存在におけるオリゴマーの取り込みと比較して、および疎水性サブユニットY'を欠く結合された輸送部分による取り込みと比較して、結合されたオリゴマーの細胞侵入を大きく増強することが示されている。このような増強された取り込みは、疎水性サブユニットY'を欠く結合された輸送部分による薬剤の取り込みと比較した、哺乳動物細胞への化合物の取り込みにおいて、好ましくは、少なくとも2倍の増加によって、および好ましくは、4倍の増加によって証明される。取り込みは、非結合体化合物と比較して、好ましくは、少なくとも20倍、より好ましくは、40倍増強される。

【0138】

輸送部分のさらなる利点は、おそらく、正電荷を有する輸送部分と負電荷を有する核酸の間の静電相互作用による、アンチセンス化合物とその標的核酸配列の間の二重鎖を安定する、その予測される能力である。トランスポーター中の電荷を有するサブユニットの数は、上述のように14未満であり、好ましくは、8から11の間であり、なぜなら、多すぎる数の電荷を有するサブユニットは、配列特異性の減少に導く可能性があるからである。

【0139】

アルギニンリッチペプチドトランスポーター（すなわち、細胞透過性ペプチド）の使用は、本発明の実施において特に有用である。特定のペプチドトランスポーターは、筋肉細胞を含む初代細胞へのアンチセンス化合物の送達の際に高度に有効であることが示されてきた (Marshall, Odaら、2007; Jearawiriyapaisarn, Moultonら、2008; Wu, Moultonら、2008)。さらに、ペネトラチン (Penetratin) およびTatペプチドなどの他のペプチドトランスポーターと比較して、本明細書に記載されるペプチドトランスポーターは、アンチセンスPMOに結合体化されたときに、いくつかの遺伝子転写物のスプライシングを変化させる能力の増強を実証する (Marshall, Odaら、2007)。とりわけ好ましいものは

、表3において以下に列挙されているP007、CP06062、およびCP04057輸送ペプチドである（それぞれ、配列番号573、578、および577）。

【0140】

リンカー（BまたはAhxB）を含む例示的なペプチドトランスポーターは、以下の表Bで以下に与えられる。好ましい配列は、CP06062（配列番号578）、P007（配列番号573）、およびCP04057（配列番号577）と称するものである。

【表B】

表B. PMOの細胞内送達のための例示的なペプチドトランスポーター

ペプチド	配列(N末端からC末端)	配列番号
rTAT	RRRQRRKKRC	570
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFFC	571
(RAhx) ₄ B	RAhxRAhxRAhxRAhxB	572
(RAhxR) ₄ AhxB; (P007)	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	573
(AhxRR) ₄ AhxB	AhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	574
(RAhx) ₆ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	575
(RAhx) ₈ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhx B	576
(RAhxR) ₅ AhxB (CP05057)	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhx B	577
(RAhxRRBR) ₂ AhxB; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	578
MSP	ASSLNIA	579

【0141】

製剤

特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるような、アンチセンスオリゴマーの治療的送達のために適切な製剤または組成物を提供する。従って、特定の実施形態において、本発明は、1種以上の薬学的に受容可能なキャリア（添加物）および／または希釈剤とともに製剤化された、1種以上の本明細書に記載されたオリゴマーの治療有効量を含む、薬学的に受容可能な組成物を提供する。本発明のオリゴマーが単独で投与されることは不可能であるが、薬学的製剤（組成物）としてこの化合物を投与することが好ましい。

【0142】

核酸分子の送達のための方法は、例えば、Akhtarら、1992, Trends Cell Bio., 2:139; および Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, Akhtar編; Sullivanら、PCT WO 94/02595に記載されている。これらおよび他のプロトコルは、本発明の単離されたオリゴマーを含む、実施的に任意の核酸分子の送達のために利用できる。

【0143】

以下に詳述されるように、本発明の薬学的組成物は、固体型または液体型での投与のために特別に製剤化されてもよく、これには、以下のために適合されたものが含まれる：（

1) 経口投与、例えば、飲薬（水性または非水性溶液または懸濁液）、錠剤、例えば、口腔、舌下、および全身性吸収のために標的化されたもの、ポーラス、散剤、顆粒剤、舌への適用のためのペースト；(2) 例えば、滅菌溶液もしくは懸濁液、または持続放出製剤としての、例えば、皮下、筋肉内、静脈内、または硬膜外注射による非経口投与；(3) 例えば、皮膚に適用されるクリーム、軟膏、または制御放出パッチまたはスプレーとしての、局所的適用；(4) 例えば、ペッサリー、クリーム、またはフォームとしての、腔内または直腸内；(5) 舌下；(6) 眼；(7) 経皮；あるいは(8) 鼻。

【0144】

「薬学的に受容可能な」という語句は、信頼できる医学的判断の範囲内にあり、過度の毒性、炎症、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を伴うことなく、ヒトおよび動物の組織と接触する使用のために適切であり、合理的な損益比の釣り合っている、化合物、物質、組成物、および／または剤形をいうために本明細書で利用される。

10

【0145】

「薬学的に受容可能なキャリア」という語句は、本明細書で使用される場合、身体の一つの器官、またはその部分から、身体別の器官、またはその部分まで、対象の化合物を運搬または輸送する際に含まれる、薬学的に受容可能な物質、組成物、またはビヒクル、例えば、液体もしくは固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、製造助剤（例えば、潤滑剤、タルク、ステアリン酸マグネシウム、カルシウム、もしくは亜鉛、またはステアリン酸（stearic acid））、または溶媒カプセル化剤を意味する。各キャリアは、製剤の他の成分と適合性があり、患者に有害でないという意味において、「受容可能」でなければならない。

20

【0146】

薬学的に受容可能なキャリアとして働くことができる物質のいくつかの例には、非限定的に以下が含まれる：(1) ラクトース、グルコース、およびスクロースなどの糖；(2) コーンスターチおよびポテトスターチなどのデンプン；(3) カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロースなどのセルロースおよびその誘導体；(4) 粉末化トラガカント；(5) 麦芽；(6) ゼラチン；(7) タルク；(8) ココアバターおよび坐剤ワックスなどの賦形剤；(9) ピーナッツ油、綿実油、ペニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、およびダイズ油などの油；(10) プロピレングリコールなどのグリコール；(11) グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどのポリオール；(12) オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル；(13) 寒天；(14) 水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；(15) アルギン酸；(16) 発熱物質を含まない水；(17) 等張生理食塩水；(18) Ringer 液；(19) エチルアルコール；(20) pH 緩衝化溶液；(21) ポリエステル、ポリカーボネート、および／もしくはポリ無水物；ならびに(22) 薬学的製剤中で利用される他の非毒性適合性物質。

30

【0147】

本発明のアンチセンスオリゴマーとの製剤のために適切な薬剤のさらなる非限定的な例には以下が含まれる：PEG 結合体化核酸、リン脂質結合体化核酸、親油性部分を含有する核酸、ホスホロチオエート、種々の組織への薬物の侵入を増強できる P-糖タンパク質阻害剤（Pluronic P85 など）；生分解性ポリマー、例えば、移植後の持続放出送達のためのポリ（DL-ラクチド-コグリコリド）ミクロスフェア（Emerich, DFら、1999, Cell Transplant, 8, 47-58）Alkermes, Inc. Cambridge；および負荷されたナノ粒子、例えば、血液脳関門を横切って薬物を送達でき、神経細胞の取り込み機構を変化できる、ポリブチルシアノアクリレートから作られたもの（Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999）。

40

【0148】

本発明はまた、ポリ（エチレングリコール）脂質を含む表面修飾リボソーム（PEG-修飾された、分枝または非分枝またはその組み合わせの、または長循環リボソームまたは

50

ステルスリポソーム)を含む組成物の使用を特徴とする。本発明のオリゴマーはまた、種々の分子量の共有結合されたPEG分子を含むことができる。これらの製剤は、標的組織における薬物の蓄積を増加させるための方法を提供する。このクラスの薬物キャリアは、単核食細胞系(MPSまたはRES)によるオプソニン作用および除去に抵抗性であり、それによって、より長い血液循環時間およびカプセル化された薬物の組織曝露の増強を可能にする(Lasicら、Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwataら、Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011)。このようなりポソームは、おそらく、新血管形成された標的組織における血管外遊出および捕捉によって、腫瘍中に選択的に蓄積されることが示されてきた(Lasicら、Science 1995, 267, 1275-1276; Okuら、1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90)。長く循環するリポソームは、特に、MPSの組織において蓄積することが知られている従来のカチオン性リポソームと比較して、DNAおよびRNAの薬物動態学および薬力学を増強する(Liuら、J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choiら、PCT国際公開番号WO 96/10391; Ansellら、PCT国際公開番号WO 96/10390; Hollandら、PCT国際公開番号WO 96/10392)。長く循環するリポソームはまた、肝臓および脾臓などの代謝的に攻撃的なMPS組織において蓄積を回避するそれらの能力に基づき、カチオン性リポソームと比較して、より高い程度まで、薬物をヌクレアーゼ分解から防御する可能性が高い。

【0149】

さらなる実施形態において、本発明は、米国特許第6,692,911号、同第7,163,695号、および同第7,070,807号に記載されるように、送達のために調製されたオリゴマー組成物を含む。この点に関して、1つの実施形態において、本発明は、米国特許第7,163,695号、同第7,070,807号、および同第6,692,911号に記載されるようなりジンおよびヒスチジン(HK)のコポリマーを含む組成物中の本発明のオリゴマーを、単独でまたはPEG(例えば、分枝または非分枝PEGまたは両方の混合物)と組み合わせ、PEGおよび標的化部分または架橋剤と組み合わせた前述のいずれかと組み合わせ、提供する。特定の実施形態において、本発明は、グルコン酸修飾ポリヒスチジンまたはグルコニル化ポリヒスチジン/トランスフェリンポリリジンを含む組成物中のアンチセンスオリゴマーを提供する。当業者は、HisおよびLysに類似の特性を有するアミノ酸が組成物中で置換されてもよいこともまた認識している。

【0150】

本発明に記載されるオリゴマーの特定の実施形態は、アミノまたはアルキルアミノなどの塩基性官能基を含んでもよく、従って、薬学的に受容可能な酸とともに薬学的に受容可能な塩を形成することが可能である。「薬学的に受容可能な塩」という用語は、この点に関して、比較的非毒性である、本発明の化合物の無機および有機酸付加塩をいう。これらの塩は、投与ビヒクルもしくは剤形製造プロセスでインサイチュで調製でき、またはその遊離塩基型の本発明の精製した化合物を適切な有機酸もしくは無機酸と別々に反応させること、および引き続く精製の間にこのように形成した塩を単離することによって調製できる。代表的な塩には、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、古草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩(naphthylate)、メシル酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、およびラウリルスルホン酸塩などが含まれる(例えば、Bergeら、(1977)「Pharmaceutical Salts」J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照のこと)。

【0151】

対象のオリゴマーの薬学的に受容可能な塩には、例えば、非毒性有機酸または無機酸からの、化合物の従来の非毒性塩または四級アンモニウム塩が含まれる。例えば、このよ

うな従来のな非毒性塩には、塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸などの無機塩から誘導されたもの；およびプロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パルミチン酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、スルファニル酸、２-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンジスルホン酸、シュウ酸、イソチオン酸などの有機酸から調製された塩が含まれる。

【0152】

特定の実施形態において、本発明のオリゴマーは、1つ以上の酸性官能基を含んでもよく、従って、薬学的に受容可能な塩基と薬学的に受容可能な塩を形成することが可能である。これらの例において「薬学的に受容可能な塩」という用語は、本発明の化合物の、比較的非毒性である、無機塩基付加塩および有機塩基付加塩をいう。これらの塩は、同様に、投与ビヒクルもしくは剤形製造プロセスでインサイチュで調製でき、またはその遊離酸型の本発明の精製した化合物を、適切な塩基、例えば、薬学的に受容可能な金属カチオンの水酸化物、炭酸塩、もしくは炭酸水素塩と、アンモニアと、または薬学的に受容可能な有機一級、二級、もしくは三級アミンと別々に反応させることによって調製できる。代表的なアルカリ塩またはアルカリ土類塩には、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、およびアルミニウム塩などが含まれる。塩基付加塩の形成のために有用である代表的な有機アミンには、エチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジンなどが含まれる（例えば、B e r g e ら、前出を参照のこと）。

【0153】

ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウムなどの湿潤剤、乳化剤、および潤滑剤、ならびに着色剤、離型剤、コート剤、甘味料、香料および芳香剤、保存料、ならびに抗酸化剤もまた、組成物中に存在することができる。

【0154】

薬学的に受容可能な抗酸化剤の例には以下が含まれる：（１）水溶性抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；（２）脂溶性抗酸化剤、例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（B H A）、ブチル化ヒドロキシトルエン（B H T）、レシチン、没食子酸プロピル、 α トコフェロールなど；ならびに（３）金属キレート剤、例えば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（E D T A）、ソルビトール、酒石酸、リン酸など。

【0155】

本発明の製剤は、経口、鼻、局所（口腔および舌下を含む）、直腸、膣、および／または非経口投与のために適切なものが含まれる。これらの製剤は、単位剤形で便利に存在してもよく、薬学分野において周知である任意の方法によって調製されてもよい。単一の剤形を生じるためにキャリア材料と合わせることができる活性成分の量は、治療される宿主、投与の特定の様式に依存して変化する。単一の剤形を生じるためにキャリア材料と合わせることができる活性成分の量は、一般的には、治療効果を生じる化合物の量である。一般的には、100パーセントの中から、この量は、約0.1パーセントから約99パーセント、好ましくは、約5パーセントから約70パーセント、最も好ましくは、約10パーセントから約30パーセントの活性成分の範囲である。

【0156】

特定の実施形態において、本発明の製剤は、シクロデキストリン、セルロース、リポソーム、ミセル形成剤、例えば、胆汁酸、およびポリマー性キャリア、例えば、ポリエステルおよびポリ無水物から選択される賦形剤；ならびに本発明のオリゴマーを含む。特定の実施形態において、上述の製剤は、本発明のオリゴマーを経口的に生物学的利用可能にする。

【0157】

これらの製剤および組成物を調製する方法は、本発明のオリゴマーを、キャリアおよび

10

20

30

40

50

任意に、1種以上の付属成分と一緒にする工程を包含する。一般的に、これらの製剤は、本発明の化合物を液体キャリア、または微細に分割された固体キャリア、またはその両方とともに均一かつ密接に一緒にすること、次いで、必要な場合、生成物を成型することによって調製される。

【0158】

経口投与のために適切な本発明の製剤は、カプセル、カシェ剤、丸薬、ロゼンジ（香料ベース、通常、スクロースおよびアカシアまたはトラガカントを使用）、散剤、顆粒剤、または水性もしくは非水性液体中の溶液もしくは懸濁液として、または水中油もしくは油中水の液体エマルジョン、またはエリキシルもしくはシロップとして、または香錠（不活性ベース、例えば、ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシアを使用）、および／またはマウスウォッシュとしてなどの型であってもよく、各々が活性成分として所定量の本発明の化合物を含む。本発明のオリゴマーはまた、ポーラス、舐剤、またはペーストとして投与されてもよい。

【0159】

経口投与のための本発明の固体剤形（カプセル、錠剤、丸薬、糖衣錠、散剤、顆粒剤、トローチなど）において、活性成分は、1種以上の薬学的に受容可能なキャリアと混合されてもよく、このキャリアは、例えば、クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウム、および／または以下のいずれかである：（1）充填剤または増量剤、例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、および／またはケイ酸；（2）結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、および／またはアカシアなど；（3）保湿剤、例えば、グリセロール；（4）崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸、およびカルボン酸ナトリウム；（5）溶液遅延剤、例えば、パラフィン；（6）吸収加速剤、例えば、四級アンモニウム化合物および界面活性剤、例えば、ポロキサマーおよびラウリル硫酸ナトリウム；（7）湿潤剤、例えば、セチルアルコール、モノステアリン酸グリセロール、および非イオン性界面活性剤など；（8）吸着剤、例えば、カオリンおよびベントナイトクレイ；（9）潤滑剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸、およびこれらの混合物；（10）着色剤；ならびに（11）制御放出剤、例えば、クロスボビドンまたはエチルセルロース。カプセル、錠剤、および丸薬の場合において、薬学的組成物は、緩衝剤もまた含んでもよい。同様の型の固体組成物は、ラクトースまたは乳糖、ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどのような賦形剤を使用して、ソフトおよびハード殻のゼラチンカプセル中の充填剤としてもまた利用されてもよい。

【0160】

錠剤は、任意に1種以上の付属成分とともに、圧縮または成型によって製造されてもよい。圧縮錠剤は、結合剤（例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、潤滑剤、不活性希釈剤、保存剤、崩壊剤（例えば、デンプングリコール酸ナトリウムまたは架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）、界面活性剤、または分散剤を使用して調製されてもよい。成型された錠剤は、不活性液体希釈剤を用いて湿らされた粉末化合物の混合物を、適切な機械の中で成型することによって製造されてもよい。

【0161】

本発明の薬学的組成物の錠剤、および他の剤形、例えば、糖衣錠、カプセル、丸薬、および顆粒剤は、腸溶コーティングおよび製薬分野で周知の他のコーティングなどのコーティングおよびシェルを用いて、任意に入手および調製されてもよい。これらはまた、例えば、所望の放出プロファイルを提供するために様々な比率のヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、リポソーム、および／またはミクロスフェアを使用して、その中の活性成分の遅延または制御放出を提供するように製剤化されてもよい。これらは、迅速な放出のために製剤化、例えば、凍結乾燥されてもよい。これらは、例えば、細菌保持フィルターによって、または使用直前に滅菌水もしくは何らかの他の注射可

能な媒体に溶解できる滅菌固体組成物の型で滅菌薬剤を取り込むことによって、滅菌されてもよい。これらの組成物はまた、乳白剤を任意に含んでもよく、胃腸管の特定の部分のみにおいて、または選択的に胃腸管の特定の部分で優先的に、任意に遅延様式で、活性成分を放出する組成物であってもよい。使用され得る包埋組成物の例には、ポリマー性物質およびワックスが含まれる。活性成分はまた、適切な場合、上記の賦形剤の1種以上とともに、マイクロカプセル化型であり得る。

【0162】

本発明の化合物の経口投与のための液体剤形には、薬学的に受容可能なエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、およびエリキシルが含まれる。活性成分に加えて、液体剤形は、例えば、水または他の溶媒などの当該分野において共通して使用される不活性希釈剤、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油類（特に、綿実油、ラッカセイ油、胚芽油（germ oil）、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタンの脂肪酸エステル、およびこれらの混合物などの溶解剤および乳化剤を含んでもよい。

10

【0163】

不活性希釈剤に加えて、経口組成物は、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、甘味料、香料、着色料、芳香剤、ならびに保存剤などのアジュバントもまた含むことができる。

20

【0164】

懸濁液は、活性成分に加えて、例えば、エトキシ化イソステアрилアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶セルロース、アルミニウムメタヒドロキサイド、ベントナイト、寒天、およびトラガカント、およびこれらの混合物としての懸濁剤を含んでもよい。

【0165】

直腸または腔投与のための製剤は坐剤として提示されてもよく、これは、本発明の1種以上の化合物を、例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール、坐剤ワックス、またはサリチル酸を含む適切な非炎症性キャリアまたは賦形剤とともに混合することによって調製されてもよく、かつこれは室温で固体であるが、体温では液体であり、従って、直腸または腔腔で融解して活性化合物を放出する。

30

【0166】

本明細書に提供されるようなオリゴマーの局所的または経皮投与のための製剤または剤形には、散剤、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ジェル、溶液、パッチ、および吸入剤が含まれる。活性オリゴマーは、滅菌条件下で、薬学的に受容可能なキャリアとともに、および必要とされ得る、任意の保存剤、緩衝剤、または噴霧剤とともに混合されてもよい。軟膏、ペースト、およびジェルは、本発明の活性化合物に加えて、賦形剤、例えば、動物性および植物性脂肪、油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルクおよび酸化亜鉛、またはこれらの混合物を含んでもよい。

【0167】

散剤およびスプレーは、本発明のオリゴマーに加えて、賦形剤、例えば、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、およびポリアミド粉末、またはこれら物質の混合物を含むことができる。スプレーは、慣例的な噴霧剤、例えば、クロロフルオロハイドロカーボンおよび揮発性非置換炭化水素、例えば、ブタンおよびプロパンをさらに含むことができる。

40

【0168】

経皮パッチは、本発明のオリゴマーの身体への制御送達を提供するさらなる利点を有する。このような剤形は、適切な媒体中に本発明のオリゴマーを溶解または分散させることによって行うことができる。吸収増強剤もまた、皮膚を横切った薬剤の流入を増加させるために使用することができる。このような流入の速度は、当該分野において公知である

50

方法の中でも、速度制御膜を提供すること、またはポリマーマトリックスもしくはゲル中で薬剤を分散させることのいずれかによって制御できる。

【0169】

非経口投与のために適切な薬学的組成物は、本発明の1種以上のオリゴマーを、1種以上の薬学的に受容可能な滅菌等張水性または非水性溶液、分散液、懸濁液、またはエマルジョン、あるいは、使用直前に滅菌注射用溶液または分散液に再構築されてもよい滅菌粉末と組み合わせて含んでもよく、これらは、糖、アルコール、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、製剤を意図されるレシピエントの血液と等張性にする溶質、または懸濁剤または濃厚剤を含んでもよい。本発明の薬学的組成物において利用されてもよい適切な水性および非水性キャリアの例には、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適切な混合物、植物油、例えば、オリーブ油、および注射可能な有機エステル、例えば、オレイン酸エチルが含まれる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散の場合には必要とされる粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。

10

【0170】

これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントもまた含んでもよい。対象のオリゴマーに対する微生物の作用の予防は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などを含めることによって保証されてもよい。組成物に、糖、塩化ナトリウムなどの等張剤を含めることもまた望ましくあり得る。加えて、注射可能な薬剤型の吸収の延長は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる剤を含めることによってもたらされてもよい。

20

【0171】

ある場合において、薬物の効果を延長させるために、皮下または筋肉内注射からの薬物の吸収を遅延させることが望ましくあり得る。これは、当該分野において公知の方法の中でも、乏しい水溶性を有する結晶性またはアモルファス性材料の液体懸濁液の使用によって達成されてもよい。次いで、薬物の吸収の速度は、その溶解の速度に依存し、次には、結晶サイズおよび結晶型に依存するかもしれない。または、非経口投与された薬物型の吸収の遅延は、油性ビヒクル中で薬物を溶解または懸濁することによって達成される。

30

【0172】

注射用デポー剤は、ポリラクチド-ポリグリコリドなどの生物分解可能なポリマー中で対象のオリゴマーのマイクロカプセル化マトリックスを形成することによって行われてもよい。オリゴマー対ポリマーの比率、および利用される特定のポリマーの性質に依存して、オリゴマー放出の速度は制御できる。他の生物分解可能なポリマーの例には、ポリ（オルトエステル）およびポリ（無水物）が含まれる。デポー注射製剤は、身体組織と適合可能であるリポソームまたはマイクロエマルジョン中に薬物をトラップすることによってまた調製されてもよい。

【0173】

本発明のオリゴマーがヒトおよび動物に医薬品として投与される場合、これらは、それ自体で、または薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせて、例えば、活性成分の0.1～99%（より好ましくは、10～30%）を含む薬学的組成物として、与えられることができる。

40

【0174】

上述のように、本発明の製剤または調製物は、経口的、非経口的、局所的、または直腸的に与えられてもよい。これらは、典型的には、各々の投与経路のために適切な型で与えられる。例えば、これらは、錠剤またはカプセル型で、注射、吸入、洗眼液、軟膏、坐剤など、注射による投与、注入または吸入；ローションまたは軟膏によって局所的に；および坐剤によって直腸的に与えられる。

【0175】

50

「非経口投与」および「非経口的に投与される」という語句は、本明細書で使用される場合、通常は注射による、腸内および局所的投与以外の投与の様式を意味し、非限定的に、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、および胸骨内の注射および注入を含む。

【0176】

「全身投与」、「全身的に投与される」、「末梢投与」、および「末梢的に投与される」という語句は、本明細書で使用される場合、中枢神経系に直接的である以外の、化合物、薬物、または他の物質の投与であって、その結果、これは、患者の系に入り、従って、代謝および他の同様のプロセスに供されることを意味し、これは、例えば、皮下投与である。

10

【0177】

選択される経路に関わらず、適切な水和型で使用されてもよい本発明のオリゴマー、および／または本発明の薬学的組成物は、当業者に公知である従来の方法によって、薬学的に受容可能な剤形に製剤化されてもよい。本発明の薬学的組成物における活性成分の実際の投薬量レベルは、患者に対して受容可能でない毒性を伴うことなく、特定の患者についての所望の治療応答、組成物、および投与の様式を達成するために有効である活性成分の量を得るために変動されてもよい。

【0178】

選択された投薬量レベルは、利用される本発明の特定のオリゴマー、またはそのエステル、塩、またはアミドの活性、投与の経路、投与の時間、利用される特定のオリゴマーの排出または代謝の速度、吸収の速度または程度、治療の期間、利用される特定のオリゴマーと組み合わせて使用される他の薬物、化合物、および／または物質、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、一般的健康、および以前の医学的履歴、および医学分野で周知である同様の要因を含む種々の要因に依存する。

20

【0179】

当該分野において通常の技能を有する医師または獣医は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定および処方できる。例えば、医師または獣医は、所望の効果を達成するために、薬学的組成物中で利用される本発明の化合物の用量を、必要とされるレベルよりも低いレベルで開始し、所望の効果が達成されるまで、投薬量を徐々に増加させることができる。一般的に、本発明の化合物の適切な1日の用量は、治療効果を生じるために有効である最低の用量である化合物の量である。このような有効用量は、一般的には、上記の因子に依存する。一般的には、患者のための本発明の化合物の経口、脳室内、および皮下用量は、示される効果のために使用される場合、約0.0001～約100mg／体重キログラム／日の範囲である。

30

【0180】

所望される場合、活性化合物の有効1日用量は、1日を通して適切な間隔で別々に投与される2回、3回、4回、5回、6回、またはそれ以上のサブ用量として、任意に、単位剤形で投与される。特定の状況において、投薬は、1日あたり1回の投与である。特定の状況において、投薬は、機能的ジストロフィンタンパク質の所望の発現を維持するために、必要に応じて、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日毎、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12週間毎、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月毎あたりに1回以上の投与である。

40

【0181】

核酸分子は、当業者に公知である種々の方法によって細胞に投与でき、これらには、非制限的に、本明細書に記載され、かつ当該分野で公知であるような、リポソーム中のカプセル化、イオン泳動による方法、または、ハイドロゲル、シクロデキストリン、生物分解性ナノカプセル、および生体接着性ミクロスフェアなどの他のビヒクルへの取り込みによる方法が含まれる。特定の実施形態において、マイクロエマルジョン化技術は、親油性（

50

水不溶性)薬学的製剤の生物学的利用能を改善するために利用されてもよい。例には、トリメトリン (Trimetrine) (Dordunoo, S. K. ら、Drug Development and Industrial Pharmacy, 17 (12), 1685-1713, 1991およびREV 5901 (Sheen, P. C. ら、J Pharm Sci 80 (7), 712-714, 1991)が含まれる。他の利点の中でも、マイクロエマルジョン化は、循環系の代わりに、リンパ系への吸収を優先的に指向することによって、生物学的利用能の増強を提供し、それによって、肝臓をバイパスし、肝胆汁性循環における化合物の破壊を防止する。

【0182】

本発明の1つの態様において、製剤は、本明細書に提供されるようなオリゴマーおよび少なくとも1種の両親媒性キャリアから形成されるミセルを含み、ここでは、このミセルは、約100nm未満の平均直径を有する。より好ましい実施形態は、約50nm未満の平均直径を有するミセルを提供し、さらに好ましい実施形態は約30nm未満、またはさらに約20nm未満の平均直径を有するミセルを提供する。

【0183】

すべての適切な両親媒性キャリアが意図されるが、現在好ましいキャリアは、一般的には、一般的に安全であると認められている (Generally-Recognized-as-Safe) (GRAS) 状態であり、溶液が複雑な水相と接触されるより後期段階において (例えば、ヒトの胃腸管で見い出されるもの)、本発明の化合物を可溶化することと、それをマイクロエマルジョン化することの両方ができるものである。通常、これらの要件を満たす両親媒性成分は、2~20のHLB (親水性対親油性バランス) 値を有し、それらの構造はC-6からC-20の範囲の直鎖脂肪族基を含む。例は、ポリエチレングリコール化脂肪グリセリドおよびポリエチレングリコールである。

【0184】

両親媒性キャリアの例には、完全にまたは部分的に水素化された種々の植物油から得られるものなどの、飽和および一不飽和ポリエチレングリコール化脂肪酸グリセリドが含まれる。このような油は、トリ、ジ、およびモノ脂肪酸グリセリドならびに対応する脂肪酸のジ、およびモノポリエチレングリコールエステルから有利になってもよく、特に好ましい脂肪酸組成は、カプリン酸4~10%、カプリン酸3~9%、ラウリン酸40~50%、ミリスチン酸14~24%、パルミチン酸4~14%、およびステアリン酸5~15%を含む。別の有用なクラスの両親媒性キャリアには、飽和または一不飽和脂肪酸 (SPANシリーズ) または対応するエトキシ化アナログ (TWEENシリーズ) を有する、部分的にエステル化されたソルビタンおよび/またはソルビトールが含まれる。

【0185】

市販の両親媒性キャリアは特に有用であり得、これらには以下が含まれる: Gelucireシリーズ、Labrafil、Labrasol、またはLauroglycol (すべてGattefosse Corporation, Saint Priest, Franceにより製造および販売)、PEG-モノオレエート、PEG-ジオレエート、PEG-モノラウレートおよびジオラウレート、レシチン、ポリソルベート80など (米国および世界中の数多くの企業によって製造および販売されている)。

【0186】

特定の実施形態において、送達は、適切な宿主細胞への本発明の組成物の導入のために、リポソーム、ナノカプセル、微粒子、ミクロスフェア、脂質粒子、ベシクルなどの使用によって行われてもよい。特に、本発明の組成物は、送達のために、脂質粒子、リポソーム、ベシクル、ナノスフェア、ナノ粒子などのいずれかにカプセル化されて製剤化されてもよい。このような送達ベシクルの製剤および使用は、公知でありかつ従来の技術を使用して実行できる。

【0187】

本発明における使用のために適切な親水性ポリマーは、容易に水に溶解し、ベシクル形成脂質に共有結合でき、そして毒性効果を伴わずにインビボで耐容性を示す (すなわち

10

20

30

40

50

、生体適合性がある）ものである。適切なポリマーには、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリ乳酸（ポリラクチドとも呼ばれる）、ポリグリコール酸（ポリグリコリドとも呼ばれる）、ポリ乳酸-ポリグリコール酸コポリマー、およびポリビニルアルコールが含まれる。特定の実施形態において、このポリマーは、約100もしくは120ダルトンから約5,000もしくは10,000ダルトンまで、または約300ダルトンから約5,000ダルトンまでの分子量を有する。他の実施形態において、ポリマーは、約100から約5,000ダルトンまでの分子量を有するか、または約300から約5,000ダルトンまでの分子量を有するポリエチレングリコールである。特定の実施形態において、このポリマーは、750ダルトンのポリエチレングリコール（PEG（750））である。ポリマーはまた、その中のモノマーの数によって規定されてもよく；本発明の好ましい実施形態は、少なくとも約3つのモノマーのポリマーを利用し、このようなPEGポリマーは、3つのモノマー（およそ150ダルトン）からなる。

10

【0188】

本発明における使用のために適切であり得る他の親水性ポリマーには、ポリビニルピロリドン、ポリメトキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、およびヒドロキシメチルセルロースまたはヒドロキシエチルセルロースなどの誘導体化セルロースが含まれる。

【0189】

特定の実施形態において、本発明の製剤は、以下からなる群より選択される生体適合性ポリマーを含む：ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、アクリルおよびメタクリルエステルのポリマー、ポリビニルポリマー、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびそのコポリマー、セルロース、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスチレン、乳酸およびグリコール酸のポリマー、ポリ無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリ（ブチック（butic）酸）、ポリ（吉草酸）、ポリ（ラクチド-コーカプロラクトン）、ポリサッカリド、タンパク質、ポリヒアルロン酸、ポリシアノアクリレート、およびこれらのブレンド、混合物、またはコポリマー。

20

【0190】

シクロデキストリンは環状オリゴサッカリドであり、ギリシャ文字 α 、 β 、または γ によってそれぞれ示される、6、7、または8個のグルコース単位からなる。これらのグルコース単位は、 $\alpha-1,4$ -グルコシド結合によって連結されている。糖単位のイス型コンホメーションの結果として、すべての二次ヒドロキシル基（C-2、C-3における）は環の一方の側に位置するのに対して、C-6におけるすべての一次ヒドロキシル基は他の側に配置されている。結果として、外部表面は親水性であり、シクロデキストリンを水溶性にする。対照的に、シクロデキストリンの空洞は疎水性である。なぜなら、これらは、C-3およびC-5の水素原子によって、およびエーテル様酸素によって並べられているからである。これらのマトリックスは、例えば、17 α -エストラジオールなどのステロイド化合物を含む、種々の比較的疎水的な化合物との複合体形成を可能にする（例えば、van Udenら、Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113（1994）を参照のこと）。この複合体形成は、Van der Waals相互作用によって、および水素結合形成によって起こる。シクロデキストリンの化学の一般的総説については、Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822（1994）を参照のこと。

30

40

【0191】

シクロデキストリン誘導体の物理化学的特性は、置換の種類および程度に強く依存する。例えば、これらの水溶性は、不溶性（トリアセチル- β -シクロデキストリン）から147%可溶性（w/v）（G-2- β -シクロデキストリン）までの範囲である。加えて、これらは、多くの有機溶媒中で可溶性である。シクロデキストリンの特性は、それらの溶解性を増加または減少させることによって、種々の製剤成分の溶解度に対する制御を可能にする。

50

【0192】

多数のシクロデキストリンおよびそれらの調製のための方法が記載されてきた。例えば、Parameter (I) ら (米国特許第 3, 453, 259 号) および Gramera ら (米国特許第 3, 459, 731 号) は電気的中性シクロデキストリンを記載している。他の誘導体には、カチオン性特性を有するシクロデキストリン [Parameter (II) 米国特許第 3, 453, 257 号]、不溶性架橋シクロデキストリン (Solms、米国特許第 3, 420, 788 号)、およびアニオン性特性を有するシクロデキストリン [Parameter (III)、米国特許第 3, 426, 011 号] が含まれる。アニオン性特性を有するシクロデキストリンの中では、カルボン酸、亜リン酸、亜ホスフィン酸、ホスホン酸、リン酸、チオホスホン酸、チオスルフィン酸、およびスルホン酸が、親のシクロデキストリンに付加されている [Parameter (III)、前出を参照のこと]。さらに、スルホアルキルエーテルシクロデキストリン誘導体が、Stella ら (米国特許第 5, 134, 127 号) によって記載されてきた。

10

【0193】

リポソームは、水性内部区画を囲む少なくとも 1 つの脂質二重層からなる。リポソームは、膜の型およびサイズによって特徴付けられ得る。小さな単層ベシクル (SUV) は単一の膜を有し、典型的には、直径が 0.02 から 0.05 μm の間の範囲であり；大きな単層ベシクル (LUV) は、典型的には、0.05 μm よりも大きい。オリゴ層の大きなベシクルおよび多層ベシクルは、複数の、通常は同心性の膜の層を有し、典型的には、0.1 μm よりも大きい。いくつかの非同心性膜を有するリポソーム、すなわち、より大きなベシクル内に含まれるいくつかのより小さなベシクルは、多ベシクル性ベシクルと称する。

20

【0194】

本発明の 1 つの態様は、本発明のオリゴマーを含有するリポソームを含む製剤に関し、ここで、リポソーム膜は、輸送能力が増加したりリポソームを提供するように製剤化される。代替的に、または加えて、本発明の化合物は、リポソームのリポソーム二重層に含まれてもよく、またはそこに吸着されてもよい。本発明のオリゴマーは、脂質界面活性剤で凝集されてもよく、リポソームの内部空間に輸送されてもよく；これらの場合、リポソーム膜は、活性薬剤－界面活性剤凝集体の破壊的效果に抵抗するように製剤化される。

【0195】

本発明の 1 つの実施形態に従うと、リポソームの脂質二重層は、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖が脂質二重層の内部表面からリポソームによってカプセル化された内部空間にまで伸び、そして脂質二重層の外部から周囲環境にまで伸びるように、ポリエチレングリコール (PEG) で誘導体化された脂質を含む。

30

【0196】

本発明のリポソーム中に含まれる活性薬剤は可溶化型である。界面活性剤および活性薬剤 (例えば、目的の活性薬剤を含むエマルジョンまたはミセル) の凝集体は、本発明に従うリポソームの内部空間の中に捕捉されてもよい。界面活性剤は、活性薬剤を分散および可溶化するように働き、任意の適切な脂肪族、脂環式、または芳香族界面活性剤から選択されてもよく、これには様々な鎖の長さ (例えば、約 C14 ～ 約 C20) の生体適合性リゾホスファチジルコリン (LPC) が含まれるがこれに限定されない。PEG-脂質などのポリマー誘導体化脂質もまた、ミセル形成のために利用されてもよい。なぜなら、これらがミセル／膜融合を阻害するように働くから、そして界面活性剤分子へのポリマーの添加が界面活性剤の CMC を減少させ、ミセル形成を補助するからである。マイクロモル濃度範囲の CMC を有する界面活性剤が好ましい；より高い CMC の界面活性剤は、本発明のリポソーム中にトラップされたミセルを調製するために利用されてもよい。

40

【0197】

本発明に従うリポソームは、当該分野において公知である種々の技術のいずれかによって調製されてもよい。例えば、米国特許第 4, 235, 871 号；PCT 出願公開 WO 96/14057；New RRC, Liposomes: A practical a

50

pproach, IRL Press, Oxford (1990), 33-104頁; Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993を参照のこと。例えば、本発明のリポソームは、あらかじめ形成されたリポソームに、親水性ポリマーで誘導体化した脂質を分散させることによって、例えば、リポソーム中で所望される誘導体化脂質の最終モルパーセントに対応する脂質濃度で、脂質グラフト結合ポリマーから構成されるミセルに、あらかじめ形成されたリポソームを露出させることによって調製されてもよい。親水性ポリマーを含むリポソームはまた、当該分野において公知であるように、均質化、脂質フィールド水和、または押し出し技術によって形成することができる。

10

【0198】

別の例示的な製剤手順において、活性薬剤は、容易に疎水性分子を溶解する、リゾホスファチジルコリンまたは他の低CMC界面活性剤（ポリマーグラフト結合脂質を含む）中での超音波処理によって最初に分散される。次いで、得られた活性薬剤のミセル懸濁液は、適切なモルパーセントのポリマーグラフト結合脂質またはコレステロールを含む乾燥脂質サンプルを再水和するために使用される。次いで、脂質および活性薬剤懸濁液が、当該分野において公知であるように、押し出し技術を使用してリポソームに形成され、得られたリポソームは、標準的なカラム分離によって非カプセル化溶液から分離される。

【0199】

本発明の1つの態様において、リポソームは、選択されたサイズ範囲において実質的に均一なサイズを有するように調製される。1つの有効なサイズ決定方法は、選択された均一なポアサイズを有する一連のポリカーボネートメンブレンを通してリポソームの水性懸濁液を押し出しする工程を包含し；このメンブレンのポアサイズは、そのメンブレンを通した押し出しによって產生されるリポソームの最大サイズとおおまかに一致する。例えば、米国特許第4,737,323号（1988年4月12日）を参照のこと。特定の実施形態において、DharmaFECT（登録商標）およびLipofectamine（登録商標）などの試薬が、ポリヌクレオチドまたはタンパク質を細胞に導入するために利用されてもよい。

20

【0200】

本発明の製剤の放出特性は、カプセル化材料、カプセル化された薬物の濃度、および放出修飾剤の存在に依存する。例えば、放出は、例えば、胃の中のような低pHにおいてのみ、または腸の中のようなより高いpHにおいてのみ放出するpH感受性コーティングを使用して、pH依存性に操作することができる。腸溶コーティングは、胃を通った通路の後まで放出が起こることを防止するために使用できる。異なる材料中にカプセル化されたシアナミドの複数のコーティングまたはその混合物は、胃の中で初期の放出を得るために使用でき、続いて、腸の中でより後期の放出を得るために使用できる。放出はまた、塩またはポア形成薬剤を含めることによって操作でき、カプセルからの分散により、水の取り込みまたは薬物の放出を増加できる。薬物の溶解度を修飾する賦形剤もまた、放出速度を制御するために使用できる。マトリックスの分解またはマトリックスからの放出を増強する薬剤もまた、組み込んでよい。これらは、薬物に加えることができ、別々の相として加えることができ（すなわち、微粒子として）、または化合物に依存してポリマー相に共溶解できる。多くの場合において、その量は0.1から30パーセント（w/wポリマー）の間であるべきである。分解促進剤の型には、無機塩、例えば、硫酸アンモニウムおよび塩化アンモニウム、有機酸、例えば、クエン酸、安息香酸、およびアスコルビン酸、無機塩基、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛、および水酸化亜鉛、ならびに有機塩基、例えば、硫酸プロタミン、スペルミン、コリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、およびトリエタノールアミン、ならびに界面活性剤、例えば、Tween（登録商標）およびPluronic（登録商標）が含まれる。マトリックスに微細構造を加えるポア形成剤（すなわち、無機塩および糖などの水溶性化合物）は、微粒子として加えられる。その範囲は、典型的には、1から30%（w/wポリマー

30

40

50

）の間である。

【0201】

取り込みはまた、腸における粒子の滞留時間を変化させることによって操作できる。これは、例えば、粘膜接着ポリマーで粒子をコーティングすること、またはカプセル化材料として粘膜接着ポリマーを選択することによって達成できる。例としては、遊離のカルボキシル基を有する多くのポリマー、例えば、キトサン、セルロース、およびとりわけ、ポリアクリレート（本明細書で使用される場合、ポリアクリレートとは、アクリレート基および修飾アクリレート基、例えば、シアノアクリレートおよびメタクリレートを含むポリマーをいう）が含まれる。

【0202】

オリゴマーは、外科的または医学的デバイスもしくは移植物の中に含まれるように製剤化され、またはこれらによって放出されるように適合されてもよい。特定の態様において、移植物は、オリゴマーでコートされるか、または他の方法にてオリゴマーで処理されてもよい。例えば、ハイドロゲルまたは他のポリマー、例えば、生体適合性および／または生物分解性ポリマーが、本発明の組成物で移植片をコートするために使用されてもよい（すなわち、組成物は、ハイドロゲルまたは他のポリマーを使用することによって、医学的デバイスを伴う使用のために適合されてもよい）。薬剤で医学的デバイスをコーティングするためのポリマーおよびコポリマーは当該分野で周知である。移植物の例には、ステント、薬物溶出ステント、縫合糸、プロテーゼ、血管カテーテル、透析カテーテル、血管移植片、人工心臓弁、心臓ペースメーカー、植込み型除細動器、静脈針、骨の設定および形成のためのデバイス、例えば、ピン、スクリュー、プレート、およびその他のデバイス、ならびに創傷治癒のための人工組織マトリックスが含まれるがこれらに限定されない。

【0203】

本明細書に提供される方法に加えて、本発明に従う使用のためのオリゴマーは、他の医薬品からの類推により、ヒトまたは獣医学的な医薬における使用のための任意の便利な方法での投与のために製剤化されてもよい。アンチセンスオリゴマーおよびそれらの対応する製剤は、単独で、または筋ジストロフィーの治療における他の治療戦略と組み合わせる投与されてもよく、その投与戦略とは、例えば、筋芽細胞移植、幹細胞治療、アミノグリコシド抗生物質の投与、プロテオソーム阻害剤、およびアップレギュレーション治療（例えば、ユートロフィンのアップレギュレーション、ジストロフィンの常染色体パラログ）である。

【0204】

本明細書に引用されるすべての刊行物および特許出願は、あたかも各々の刊行物または特許出願が具体的にかつ個別に参照により援用されることが示されるかのように、参照により本明細書に援用される。

【0205】

前述の発明は、理解の明確さの目的のために、例証および実例によっていくぶん詳細に記載されてきたが、特定の変更および改変が添付の特許請求の範囲の技術思想または範囲から逸脱することなく、本発明になされ得ることは、本発明の教示に鑑みて当業者には容易に明白である。以下の実施例は、例示目的のみのために提供され、限定目的ではない。当業者は、本質的に同様の結果を生じるために変更または改変できる種々の決定的ではないパラメーターを容易に認識する。

【0206】

【数 1】

参考文献

Aartsma-Rus, A., A. A. Janson, et al. (2004). "Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense." *Am J Hum Genet* 74(1): 83-92.

Dunckley, M. G., I. C. Eperon, et al. (1997). "Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides." *Nucleosides & Nucleotides* 16(7-9): 1665-1668.

10

【 0 2 0 7 】

【 数 2 】

Dunckley, M. G., M. Manoharan, et al. (1998). "Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides." Hum Mol Genet 7(7): 1083-90.

Errington, S. J., C. J. Mann, et al. (2003). "Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene." J Gene Med 5(6): 518-27.

Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, et al. (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." Mol Ther.

Lu, Q. L., C. J. Mann, et al. (2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse." Nat Med 9(8): 1009-14.

Mann, C. J., K. Honeyman, et al. (2002). "Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy." J Gene Med 4(6): 644-54.

Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing." Journal of Immunological Methods 325(1-2): 114-126.

Matsuo, M., T. Masumura, et al. (1991). "Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe." J Clin Invest 87(6): 2127-31.

Monaco, A. P., C. J. Bertelson, et al. (1988). "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus." Genomics 2(1): 90-5.

Pramono, Z. A., Y. Takeshima, et al. (1996). "Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence." Biochem Biophys Res Commun 226(2): 445-9.

【 0 2 0 8 】

【数 3】

Sazani, P., R. Kole, et al. (2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. PCT WO2007058894, University of North Carolina

Sierakowska, H., M. J. Sambade, et al. (1996). "Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 12840-4.

10

Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **7**(3): 187-95.

Takeshima, Y., H. Nishio, et al. (1995). "Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe." J Clin Invest **95**(2): 515-20.

20

van Deutekom, J. C., M. Bremmer-Bout, et al. (2001). "Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells." Hum Mol Genet **10**(15): 1547-54.

van Deutekom, J. C., A. A. Janson, et al. (2007). "Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051." N Engl J Med **357**(26): 2677-86.

Wilton, S. D., A. M. Fall, et al. (2007). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript." Mol Ther **15**(7): 1288-96.

30

Wilton, S. D., F. Lloyd, et al. (1999). "Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides." Neuromuscul Disord **9**(5): 330-8.

Wu, B., H. M. Moulton, et al. (2008). "Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 14814-9.

40

Yin, H., H. M. Moulton, et al. (2008). "Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function." Hum Mol Genet **17**(24): 3909-18.

【実施例】

【0209】

材料および方法

細胞および組織培養処理条件

5 % D M S O 溶液 (S i g m a) 中に保存された少ない継代数のヒト横紋筋肉腫細胞 (

50

ATCC, CCL-136; RD細胞)は、氷の銀色 (ice silver) がもはや見えなくなるまで、37℃ウォーターバス中で融解した。細胞は、L-グルタミン (HyClone)、10%ウシ胎仔血清、および1%ペニシリン-ストレプトマイシン抗生物質溶液 (CelGro) を補充した24mLの温めたDMEM中、 1.5×10^6 細胞/フラスコで、組織培養処理したT75フラスコ (Nunc) に播種した; 24時間後、培地を吸引し、細胞は温めたPBSで1回洗浄し、新鮮な培地を加えた。細胞は、37℃インキュベーター中で、5.0%CO₂にて、80%コンフルエントまで増殖させた。

【0210】

培地をT75フラスコから吸引し; 細胞は温めたPBSで1回洗浄し、そして吸引した。37℃ウォーターバス中で温めた3mLのトリプシン/EDTAを各T75に加えた。細胞は、37℃で、5回、2~5分間、穏やかに攪拌しながら、これらがフラスコから遊離されるまでインキュベートした。細胞懸濁液は、15.0mLコニカルチューブに移し; フラスコは1.0mLのトリプシン/EDTA溶液ですすぎ、残りの細胞を集めた。細胞は、Vi-Cell XR細胞カウンター (Beckman Coulter) で計数した。細胞は、1.0mL培地のウェルあたり 2.0×10^5 生存細胞で、組織培養処理した12ウェルプレート (Falcon) に播種した。細胞は、37℃インキュベーター中で、5.0%CO₂にて一晩インキュベートした。

【0211】

12ウェルの播種プレートは、均一な細胞分布およびプレート接着について試験した。凍結乾燥した、ペプチド結合体化ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー (PPMO) を、ヌクレアーゼを含まない水 (Ambion) 中で2.0mMに再懸濁し、細胞処理の間氷上に維持した; モル濃度を確認するために、PPMOは、NanoDrop 2000分光光度計 (Thermo Scientific) を使用して測定した。PPMO処理の直前に、培地を吸引し、細胞を温めたPBSですすいだ。PPMOは温めた培地で、所望のモル濃度まで希釈した; 細胞は、ウェルあたり総量1.0mL PPMO中で処理した。PPMOは三連で試験した。未処理対照のために、新鮮な、温めた培地を、1.0mL総量で加えた。細胞は、37℃インキュベーター中で、5.0%CO₂にて48時間インキュベートした。

【0212】

RNA抽出

培地を吸引し、細胞は温めたPBSですすいだ。RNAは、QuickGene-Mini80システム、QuickGene RNA培養細胞HCキットS、およびMagNAlyserを用いて、セラミックビーズ均質化とともに、製造業者の推奨するプロトコルを使用して、抽出した。手短に述べると、細胞は、350μL LRP (100μL LRPあたり10μL β-メルカプトエタノールを加えた) 溶解緩衝液を有する処理プレート中で溶解した; ホモジネートは、完全な溶解を確実にするために穏やかに摩砕し、MagNAlyserチューブに移した。チューブは、MagNAlyser中で、2800rpmで30秒間、遠心分離して、完全な均質化を確実にし、そして手短に氷冷した。50μL SRP可溶化緩衝液を加え、ホモジネートは15秒間ボルテックスした。170μL >99%エタノールを各チューブに加え、ホモジネートは60秒間ボルテックスした。ホモジネートは手早く遠心分離し、Mini80 RNAカートリッジに移し、サンプルは加圧し、フロースルーは廃棄した。カートリッジは750μL WRP洗浄緩衝液中で洗浄され、加圧された。40μLのDNase溶液 (1.25μL Qiagen DNase I、35μL RDD緩衝液、3.75μL ヌクレアーゼを含まない水) を、カートリッジメンブレンに直接加えた; カートリッジは、室温で4分間インキュベートした。カートリッジは、750μL WRPで2回洗浄し、各洗浄後に加圧した。カートリッジはヌクレアーゼを含まないチューブ上に配置した。50μL CRP溶出緩衝液を各メンブレンに加えた; メンブレンは室温で5分間インキュベートした。カートリッジは加圧し、溶離液を収集した。RNAは、定量を保留して-80℃に保存した。RNAはNanoDrop (商標) 2000分光光度計を使用して定量した。

【0213】

ネステッドR T-PCR

プライマー特異的、エキソン特異的、最適化ネステッドR T-PCR増幅を、表1において以下に示されるように各ジストロフィンエキソンについてのプライマー対セットを使用して実施した。

【0214】

【表1】

表1. エキソンスキッピングを検出するためにヒトジストロフィンmRNAをPCR増幅するために使用されるプライマー対セット

名称	F/R	I/O	配列 (5'-3')	エキソン	目的	配列番号
PS170	F	O	CCAGAGCTTTACCTGAGAAACAAG	48	ヒトジストロフィンにおけるエキソン50および51のスキップの検出	640
PS172	F	I	CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG	49		641
PS174	R	I	CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC	52		642
PS176	R	O	CATTCATTCAACTGTTGCCTCCG	53		643
PS186	F	O	CAATGCTCCTGACCTCTGTGC	42	ヒトジストロフィンにおけるエキソン44および45のスキップの検出	644
PS187	F	I	GTCTACAACAAAGCTCAGGTCG	43		645
PS189	F	I	GCAATGTTATCTGCTTCCTCCAACC	46		646
PS190	R	O	GCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGG	46		647
PS192	F	O	CTTGGACAGAACTTACCGACTGG	51	ヒトジストロフィンにおけるエキソン53のスキップの検出	648
PS193	F	I	GCAGGATTTGGAACAGAGGCG	52		649
PS195	R	I	CATCTACATTTGTCTGCCACTGG	54		650
PS197	R	O	GTTTCTTCCAAAGCAGCCTCTCG	55		651

示されたプライマー対は、フォワードまたはリバース（F/R）のいずれかで、そして一次増幅または二次増幅にそれぞれ対応する外部または内部（I/O）のいずれかのプライマー対として、それぞれ示される。プライマー標的の位置は、エキソンカラムに示され、目的は、エキソンスキッピング事象が検出できることを示す。例えば、PS170およびPS176プライマーは、一次増幅において、エキソン48～53の領域を増幅する。次いで、プライマーPS172およびPS174は、二次増幅において、エキソン49～52の領域を増幅する。このネステッドPCR反応は、エキソン50および/またはエキソン51の両方のエキソンスキッピングを検出する。特異的ネステッドR T-PCR反応条件は以下に提供される。

【0215】

処理細胞から抽出されたRNA（上記）はすべてのサンプルについて、20 ng/μlに希釈した。

【0216】

10

20

30

40

【表 2】

表2:RT-PCRおよび一次増幅のための反応設定(50 μ l反応):

2x 反応ミックス	25 μ l
PS XXX フォワードプライマー (30 μ M) (表1を参照のこと)	0.5 μ l
PS XXX リバースプライマー (30 μ M) (表1を参照のこと)	0.5 μ l
Superscript III Platinum <i>Taq</i> ミックス	2 μ l
鋳型 RNA (20 ng/ μ l)	10 μ l
ヌクレアーゼを含まない水(総量50 μ l)	12 μ l

10

【0 2 1 7】

【表 3】

表3:RT-PCRおよび一次増幅プログラム:

	温度	時間	
逆転写	55°C	30分間	8サイクル
RT不活化	94°C	2分間	
変性	94°C	1分間	
アニーリング	59°C	1分間	
伸長	68°C	1分間	
	4°C	∞	

20

【0 2 1 8】

【表 4】

表4:ネステッド二次増幅のための反応設定(50 μ l反応):

10x PCR 緩衝液	5 μ l
dNTP 溶液(10mM)	0.5 μ l
50 mM MgCl	1.5 μ l
PS XXX フォワードプライマー(30 μ M) (表1を参照のこと)	0.33 μ l
PS XXX リバースプライマー(30 μ M) (表1を参照のこと)	0.33 μ l
Platinum <i>Taq</i> DNA ポリメラーゼ	0.2 μ l
0.1 mM Cy5-dCTP	1 μ l
RT-PCR 産物(ステップ1より)	1 μ l
ヌクレアーゼを含まない水(総量50 μ l)	40.15 μ l

30

40

【0 2 1 9】

【表 5】

表5: ネステッド二次増幅プログラム:

	温度	時間	
初期変性	94°C	3分間	
変性	94°C	45秒間	28~30 サイクル
アニーリング	59°C	30秒間	
伸長	68°C	1分間	
	4°C	∞	

10

ゲル電気泳動分析

10 マイクロリットルの 5×F i c o l l ローディング色素を、各 50 マイクロリットルの ネステッド R T-PCR 反応物に加えた。15 マイクロリットルの PCR/色素混合液を、300 ボルトで 30 分間、10% TBE ゲル上で泳動した。電気泳動後、ゲルは d i H₂O 中で少なくとも 1 時間洗浄し、30 分毎に水を交換した。次いで、ゲルは Typhoon Trio Variable Mode Imager (GE Healthcare) 上で走査した。エキソン 44 スキップについては、全長ジストロフィン転写物からの ネステッド R T-PCR 産物は 571 bp であり、エキソン 44 スキップ mRNA からは 423 bp である (エキソン 44 は 148 bp である)。エキソン 45 については、全長ジストロフィン転写物からの ネステッド R T-PCR 産物は 571 bp であり、エキソン 45 スキップ mRNA からは 395 bp である (エキソン 45 は 176 bp である)。エキソン 53 については、全長ジストロフィン転写物からの PCR 産物は 365 bp であり、エキソン 53 スキップ mRNA からは 153 bp である (エキソン 53 は 212 bp である)。

20

【0220】

ゲルイメージは、エキソンスキッピング産物と比較して、全長 PCR 産物のバンド強度を測定することによって、定量的分析に供した。ある場合において、固定された PPMO 濃度 (例えば、3 マイクロモル濃度) でのパーセントスキップは、一連の PPMO の相対活性を決定して、所定のエキソンのエキソンスキッピングを誘導するために使用した。他の状況において、PPMO 用量一範囲は細胞を処理するために使用し (例えば、0.1、0.3、1.0、3.0、および 10 マイクロモル濃度)、EC₅₀ は、各濃度において誘導されたスキップパーセントに基づいて計算した。

30

【0221】

実施例 1

エキソン 51 スキャン

ヒトジストロフィンエキソン 51 を標的とする重複する一連のアンチセンス PPMO を設計し、合成し、そしてヒト横紋筋肉腫細胞 (RD 細胞) または初代ヒト骨格筋細胞のいずれかを処理するために使用した。この戦略は「エキソンスキャン」と呼ばれ、以下に記載されるように、いくつかの他のジストロフィンエキソンについて類似して使用した。すべての PPMO は、CP06062 ペプチド (配列番号 578) および 3' 末端 PPMO 連結を使用して、ペプチド結合体化 PPMO (PPMO) として合成した。エキソン 51 については、図 2A に示されるように、各々が 26 塩基長である一連の 26 個の PPMO を作製した (配列番号: 309~311、314、316、317、319、321、323、324、326、327、329~331、333、335、336、338~345)。これらの PPMO は、材料および方法において上記に記載されているように、種々の濃度において RD 細胞を処理することによって、エキソンスキッピング効力について評価した。3 種の PPMO (配列番号 324、326、および 327) を、エキソンスキッピングを誘導する際に有効であると同定し、さらなる評価のために選択した。RD 細胞および初代ヒト骨格筋細胞における用量一範囲実験は、これら 3 種の PPMO 配列の相対的効力を確認するために使用した。配列番号 327 は、図 2B および 2C に示される

40

50

ように、エキソン 5 1 スキップを誘導する際に最も有効であることを示した。

【0222】

他のエキソン 5 1 標的化アンチセンス配列に対する、配列番号 3 2 7 の相対的有効性の比較は、上記のように、RD細胞および初代ヒト骨格筋細胞において実施した。すべての評価された配列は、CP06062ペプチド（配列番号 5 7 8）を使用して、ペプチド結合体化PMOとして作製した。これは、アンチセンス化学または細胞送達に関わりなく、アンチセンス配列の相対的有効性の直接的比較を可能にした。配列番号 3 2 7 と比較した特定のエキソン 5 1 標的化オリゴの相対的位置は図 2 Dに示す。図 2 Cに示されるように、エキソンスキッピングの有効性の階層化されたヒエラルキーが存在し、配列番号 3 2 7 が最も有効であり、他の配列と比較して少なくとも数倍の因数である。

10

【0223】

実施例 2

エキソン 5 0 スキャン

ヒトジストロフィンエキソン 5 0 を標的とする重複する一連のアンチセンス PPMO を設計および合成した。エキソン 5 0 については、図 3 A に示されるように、各々が 2 5 塩基長である一連の 1 7 個の PPMO を作製した（配列番号 2 6 7、2 6 9、2 7 1、2 7 3、2 7 5、2 7 7、2 7 9、2 8 0、2 8 2、および 2 8 4 ~ 2 9 1）。これらの PPMO は、材料および方法において上記に記載されているように、種々の濃度において RD 細胞を処理することによって、エキソンスキッピング効力について評価した。4 種の PPMO（配列番号 2 7 7、2 8 7、2 9 0、および 2 9 1）を、エキソンスキッピングを誘導する際に有効であると同定し、さらなる評価のために選択した。RD細胞における用量一範囲実験は、これら 4 種の PMO 配列の相対的効力を確認するために使用した。配列番号 5 8 4（AVI-5656）および 2 8 7（AVI-5038）は、図 3 B に示されるように、エキソン 5 0 スキップを誘導する際に最も有効であることを示した。EC₅₀ 値は用量一範囲実験から誘導し、これは、エキソン 5 0 を含む mRNA から産生された PCR 産物と比較すると、エキソン 5 0 を欠く mRNA からは PCR 産物の 5 0 % であるという計算濃度を表す。他の配列と比較すると（例えば、配列番号 5 8 4 および 5 8 5 は、それぞれ、WO 2 0 0 6 / 0 0 0 0 5 7 における配列番号 1 7 3 および 1 7 5 に対応することを参照のこと）、AVI-5038（配列番号 2 8 7）は、図 3 B に示されるように、RD細胞アッセイにおいて、エキソンスキッピング活性を誘導する際に、等価であるかまたはより良好である。

20

30

【0224】

実施例 3

エキソン 5 3 スキャン

ヒトジストロフィンエキソン 5 3 を標的とする重複する一連のアンチセンス PPMO を設計および合成した。エキソン 5 3 については、図 4 A に示されるように、各々が 2 5 塩基長である一連の 2 4 個の PPMO を作製した（配列番号 4 1 6、4 1 8、4 2 0、4 2 2、4 2 4、4 2 6、4 2 8、4 2 9、4 3 1、4 3 3、4 3 4、4 3 6、4 3 8 ~ 4 4 0、および 4 4 3 ~ 4 5 1）。これらの PPMO は、材料および方法において上記に記載されているように、種々の濃度において RD細胞および初代ヒト骨格筋細胞を処理することによって、エキソンスキッピング効力について評価した。3 種の PPMO（配列番号 4 2 8、4 2 9、および 4 3 1）を、エキソンスキッピングを誘導する際に有効であると同定し、さらなる評価のために選択した。RD細胞における用量一範囲実験は、これら 3 種の PMO 配列の相対的効力を確認するために使用した。配列番号 4 2 9 は、図 4 B ~ F に示されるように、エキソン 5 3 スキップを誘導する際に最も有効であることを示した。しかし、他のエキソン 5 3 アンチセンス配列と比較した場合に、配列番号 4 2 9 は、WO 2 0 0 6 / 0 0 0 0 5 7 において配列番号 1 9 5 として列挙されている H 5 3 A（+ 2 3 + 4 7）および本願の配列番号 6 0 9 と同一であることが判明した。他の配列を配列番号 4 2 9 と比較し、これには、H 5 3 A（+ 3 9 + 6 9）および H 5 3 A（- 1 2 + 1 0）（それぞれ、WO 2 0 0 6 / 0 0 0 0 5 7 において配列番号 1 9 3 および 1 9 9 と列挙され

40

50

る) および h 5 3 A O N 1 (米国出願 1 1 / 2 3 3, 5 0 7 において配列番号 3 9 と列挙される) が含まれ、本願において、それぞれ、配列番号 6 0 8、6 1 1、および 6 1 0 と列挙される。すべての評価された配列は、C P O 6 0 6 2 ペプチド (配列番号 5 7 8) を使用して、ペプチド結合体化 P M O として作製した。これは、アンチセンス化学または細胞送達に関わりなく、アンチセンス配列の相対的有効性の直接的比較を可能にした。図 4 I および 4 G ~ H に示されるように、配列番号 4 2 9 が、これらの 4 種の配列の各々よりも優れていることが示された。

【0 2 2 5】

実施例 4

エキソン 4 4 スキャン

ヒトジストロフィンエキソン 4 4 を標的とする重複する一連のアンチセンス P P M O を設計および合成した。エキソン 4 4 については、図 5 A に示されるように、各々が 2 5 塩基長である一連の P P M O を作製した (配列番号 1 ~ 2 0) 。これらの P P M O は、材料および方法において上記に記載されているように、種々の濃度において R D 細胞を処理することによって、エキソンスキッピング効力について評価した。5 種の P P M O (配列番号 4、8、1 1、1 2、および 1 3) を、エキソンスキッピングを誘導する際に有効であると同定し、さらなる評価のために選択した。R D 細胞における用量一範囲実験は、図 5 C ~ H に示されるように、これら 5 種の P P M O 配列の相対的効力を確認するために使用した。配列番号 8、1 1、および 1 2 は、図 5 H に示されるように、エキソン 4 4 スキップを誘導する際に最も有効であることを示し、配列番号 1 2 が最も高い効力を提供した。

【0 2 2 6】

他のエキソン 4 4 アンチセンス配列に対する、配列番号 1 2 の比較は、R D 細胞と初代ヒト骨格筋細胞の両方において行った。すべての評価された配列は、C P O 6 0 6 2 ペプチド (配列番号 5 7 8) を使用して、ペプチド結合体化 P M O として作製した。これは、アンチセンス化学または細胞送達に関わりなく、アンチセンス配列の相対的有効性の直接的比較を可能にした。

【0 2 2 7】

配列番号 4、8、1 1、および 1 2 との配列 (配列番号 6 0 0、6 0 1、6 0 2、および 6 0 3) の整列は図 5 B に示される。配列番号 6 0 1 および 6 0 3 は W O 2 0 0 6 / 0 0 0 0 5 7 において配列番号 1 6 5 および 1 6 7 として列挙されている。配列番号 6 0 2 は W O 2 0 0 4 / 0 8 3 4 4 6 に列挙されており、米国出願 1 1 / 2 3 3, 5 0 7 に配列番号 2 1 として列挙されている。配列番号 6 0 0 は 2 0 0 7 年に公開された (W i l t o n, F a l l ら、2 0 0 7) 。R D 細胞における比較は、配列番号 6 0 2 および 6 0 3 が配列番号 1 2 よりも優れていることを示した (図 5 I) 。しかし、図 5 J に示されるように、ヒト初代骨格筋細胞においては、配列番号 1 2 (8. 8 6 % のエキソンスキッピング) が配列番号 6 0 2 (6. 4 2 %) よりも優れていた。同様の実験は配列番号 6 0 3 でも実施している。

【0 2 2 8】

実施例 5

エキソン 4 5 スキャン

ヒトジストロフィンエキソン 4 5 を標的とする重複する一連のアンチセンス P P M O を設計および合成した。エキソン 4 5 については、図 6 A に示されるように、各々が 2 5 塩基長である一連の 2 2 個の P P M O を作製した (配列番号 2 1、2 3、2 5、2 7、2 9、3 1、3 2、3 4、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、および 4 5 ~ 5 3) 。これらの P P M O は、材料および方法において上記に記載されているように、種々の濃度において R D 細胞およびヒト初代骨格筋細胞を処理することによって、エキソンスキッピング効力について評価した。5 種の P P M O (配列番号 2 7、2 9、3 4、および 3 9) を、エキソンスキッピングを誘導する際に有効であると同定し、さらなる評価のために選択した。R D 細胞における用量一範囲実験は、図 6 C ~ G に示され、図 6 H に要約されているように、これら 4 種の P M O 配列の相対的効力を確認するために使用した。配列番号 4 9 はこれ

らの実験において陰性対照として使用した。配列番号 29 および 34 は、図 6 H に示されるように、エキソン 45 スキップを誘導する際に最も有効であることを示した。

【0229】

他のエキソン 45 標的化アンチセンス配列に対する、配列番号 34 の比較は、RD 細胞と初代ヒト骨格筋細胞の両方において行った。すべての評価された配列は、CP06062 ペプチド（配列番号 578）を使用して、ペプチド結合体化 PMO として作製した。これは、アンチセンス化学または細胞送達に関わりなく、アンチセンス配列の相対的有効性の直接的比較を可能にした。配列番号 27、29、34、および 39 との配列（配列番号 604、605、606、および 607）の整列は図 6 B に示される。配列番号 604 および 607 は WO2006/000057 において配列番号 211 および 207 としてそれぞれ列挙されている。配列番号 605 および 606 は、米国出願 11/233,507 に配列番号 23 および 1 としてそれぞれ列挙されている。RD 細胞における比較は、図 6 I に示されるように、配列番号 34 が評価された 4 つすべての配列よりも優れていることを示した。ヒト初代骨格筋細胞の異なる集団におけるこれらの化合物の試験は、上記のように実施している。

10

【0230】

配列表

配列は、DNA について共通のヌクレオチド塩基記号：A、G、C、および T を使用して示される。2'-O-メチルなどの他のアンチセンス化学は、T の代わりに U を使用する。任意の塩基が、とりわけ、3 個以上の G 残基のストレッチ中では、イノシン（I）で置換されてもよい。

20

【0231】

【表 6 - 1】

名称	配列	配列番号
オリゴマー標的化配列(5'から3')		
Hu.DMD.Exon44.25.001	CTGCAGGTAAAAGCATATGGATCAA	1
Hu.DMD.Exon44.25.002	ATCGCCTGCAGGTAAAAGCATATGG	2
Hu.DMD.Exon44.25.003	GTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAGCA	3
Hu.DMD.Exon44.25.004	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA	4
Hu.DMD.Exon44.25.005	CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCA	5
Hu.DMD.Exon44.25.006	TTTCTCAACAGATCTGTCAAATCGC	6
Hu.DMD.Exon44.25.007	CCATTTCTCAACAGATCTGTCAAAT	7
Hu.DMD.Exon44.25.008	ATAATGAAAACGCCGCCATTTCTCA	8
Hu.DMD.Exon44.25.009	AAATATCTTTATATCATAATGAAAA	9
Hu.DMD.Exon44.25.010	TGTTAGCCACTGATTAAATATCTTT	10
Hu.DMD.Exon44.25.011	AACTGTTCACTTCTGTTAGCCAC	11
Hu.DMD.Exon44.25.012	TTGTGTCTTTCTGAGAACTGTTCA	12
Hu.DMD.Exon44.25.013	CCAATTCTCAGGAATTTGTGTCTTT	13
Hu.DMD.Exon44.25.014	GTATTTAGCATGTTCCCAATTCTCA	14
Hu.DMD.Exon44.25.015	CTTAAGATACCATTTGTATTTAGCA	15
Hu.DMD.Exon44.25.016	CTTACCTTAAGATACCATTTGTATT	16
Hu.DMD.Exon44.25.017	AAAGACTTACCTTAAGATACCATTT	17
Hu.DMD.Exon44.25.018	AAATCAAAGACTTACCTTAAGATAC	18
Hu.DMD.Exon44.25.019	AAAACAAATCAAAGACTTACCTTAA	19
Hu.DMD.Exon44.25.020	TCGAAAAAACAATCAAAGACTTAC	20
Hu.DMD.Exon45.25.001	CTGTAAGATACCAAAAAGGCAAAAC	21

【 0 2 3 2 】

【表 6 - 2】

Hu.DMD.Exon45.25.002	CCTGTAAGATACCAAAAAGGCAAAA	22
Hu.DMD.Exon45.25.002. 2	AGTTCCTGTAAGATACCAAAAAGGC	23
Hu.DMD.Exon45.25.003	GAGTTCCTGTAAGATACCAAAAAGG	24
Hu.DMD.Exon45.25.003. 2	CCTGGAGTTCCTGTAAGATACCAAA	25
Hu.DMD.Exon45.25.004	TCCTGGAGTTCCTGTAAGATACCAA	26
Hu.DMD.Exon45.25.004. 2	GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATA	27
Hu.DMD.Exon45.25.005	TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	28
Hu.DMD.Exon45.25.005. 2	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA	29
Hu.DMD.Exon45.25.006	CCCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT	30
Hu.DMD.Exon45.25.006. 2	GCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	31
Hu.DMD.Exon45.25.007	CGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTT	32
Hu.DMD.Exon45.25.008	AACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCA	33
Hu.DMD.Exon45.25.008. 2	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA	34
Hu.DMD.Exon45.25.009	GTTGCATTCAATGTTCTGACAACAG	35
Hu.DMD.Exon45.25.010	GCTGAATTATTTCTTCCCCAGTTGC	36
Hu.DMD.Exon45.25.010. 2	ATTATTTCTTCCCCAGTTGCATTCA	37
Hu.DMD.Exon45.25.011	GGCATCTGTTTTTGAGGATTGCTGA	38
Hu.DMD.Exon45.25.011. 2	TTTGAGGATTGCTGAATTATTTCTT	39
Hu.DMD.Exon45.25.012	AATTTTTCTGTAGAATACTGGCAT	40
Hu.DMD.Exon45.25.012. 2	ATACTGGCATCTGTTTTTGAGGATT	41
Hu.DMD.Exon45.25.013	ACCGCAGATTCAGGCTTCCCAATTT	42
Hu.DMD.Exon45.25.013. 2	AATTTTTCTGTAGAATACTGGCAT	43

【 0 2 3 3 】

10

20

30

40

【表 6 - 3】

Hu.DMD.Exon45.25.014	CTGTTTGCAGACCTCCTGCCACCGC	44
Hu.DMD.Exon45.25.014. 2	AGATTCAGGCTTCCCAATTTTCT	45
Hu.DMD.Exon45.25.015	CTCTTTTTTCTGTCTGACAGCTGTT	46
Hu.DMD.Exon45.25.015. 2	ACCTCCTGCCACCGCAGATTCAGGC	47
Hu.DMD.Exon45.25.016	CCTACCTCTTTTTTCTGTCTGACAG	48
Hu.DMD.Exon45.25.016. 2	GACAGCTGTTTGCAGACCTCCTGCC	49
Hu.DMD.Exon45.25.017	GTCGCCCTACCTCTTTTTTCTGTCT	50
Hu.DMD.Exon45.25.018	GATCTGTGCGCCCTACCTCTTTTTTC	51
Hu.DMD.Exon45.25.019	TATTAGATCTGTGCGCCCTACCTCTT	52
Hu.DMD.Exon45.25.020	ATTCCTATTAGATCTGTGCGCCCTAC	53
Hu.DMD.Exon45.20.001	AGATACCAAAAAGGCAAAAC	54
Hu.DMD.Exon45.20.002	AAGATACCAAAAAGGCAAAA	55
Hu.DMD.Exon45.20.003	CCTGTAAGATACCAAAAAGG	56
Hu.DMD.Exon45.20.004	GAGTTCCTGTAAGATACCAA	57
Hu.DMD.Exon45.20.005	TCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	58
Hu.DMD.Exon45.20.006	TGCCATCCTGGAGTTCCTGT	59
Hu.DMD.Exon45.20.007	CCCAATGCCATCCTGGAGTT	60
Hu.DMD.Exon45.20.008	CGCTGCCCAATGCCATCCTG	61
Hu.DMD.Exon45.20.009	CTGACAACAGTTTGCCGCTG	62
Hu.DMD.Exon45.20.010	GTTGCATTCAATGTTCTGAC	63
Hu.DMD.Exon45.20.011	ATTATTTCTTCCCCAGTTGC	64
Hu.DMD.Exon45.20.012	TTTGAGGATTGCTGAATTAT	65
Hu.DMD.Exon45.20.013	ATACTGGCATCTGTTTTTGA	66
Hu.DMD.Exon45.20.014	AATTTTCTCTGTAGAATACT	67
Hu.DMD.Exon45.20.015	AGATTCAGGCTTCCCAATTT	68
Hu.DMD.Exon45.20.016	ACCTCCTGCCACCGCAGATT	69
Hu.DMD.Exon45.20.017	GACAGCTGTTTGCAGACCTC	70
Hu.DMD.Exon45.20.018	CTCTTTTTTCTGTCTGACAG	71
Hu.DMD.Exon45.20.019	CCTACCTCTTTTTTCTGTCT	72

【表 6 - 4】

Hu.DMD.Exon45.20.020	GTCGCCCTACCTCTTTTTTC	73
Hu.DMD.Exon45.20.021	GATCTGTGC GCCCTACCTCTT	74
Hu.DMD.Exon45.20.022	TATTAGATCTGTGC GCCCTAC	75
Hu.DMD.Exon45.20.023	ATTCCTATTAGATCTGTCCG	76
Hu.DMD.Exon46.25.001	GGGGGATTTGAGAAAATAAAATTAC	77
Hu.DMD.Exon46.25.002	ATTTGAGAAAATAAAATTACCTTGA	78
Hu.DMD.Exon46.25.002. 2	CTAGCCTGGAGAAAGAATAAAAA	79
Hu.DMD.Exon46.25.003	AGAAAATAAAATTACCTTGACTTGC	80
Hu.DMD.Exon46.25.003. 2	TTCTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAA	81
Hu.DMD.Exon46.25.004	ATAAAATTACCTTGACTTGCTCAAG	82
Hu.DMD.Exon46.25.004. 2	TTTTGTTCTTCTAGCCTGGAGAAAG	83
Hu.DMD.Exon46.25.005	ATTACCTTGACTTGCTCAAGCTTTT	84
Hu.DMD.Exon46.25.005. 2	TATTCTTTTGTCTTCTAGCCTGGA	85
Hu.DMD.Exon46.25.006	CTTGACTTGCTCAAGCTTTTCTTTT	86
Hu.DMD.Exon46.25.006. 2	CAAGATATTCTTTTGTCTTCTAGC	87
Hu.DMD.Exon46.25.007	CTTTTAGTTGCTGCTCTTTTCCAGG	88
Hu.DMD.Exon46.25.008	CCAGGTTCAAGTGGGATACTAGCAA	89
Hu.DMD.Exon46.25.008. 2	ATCTCTTTGAAATTCTGACAAGATA	90
Hu.DMD.Exon46.25.009	AGCAATGTTATCTGCTTCCTCCAAC	91
Hu.DMD.Exon46.25.009. 2	AACAAATTCATTTAAATCTCTTTGA	92
Hu.DMD.Exon46.25.010	CCAACCATAAAACAAATTCATTTAA	93
Hu.DMD.Exon46.25.010. 2	TTCCTCCAACCATAAAACAAATTCA	94
Hu.DMD.Exon46.25.011	TTTAAATCTCTTTGAAATTCTGACA	95
Hu.DMD.Exon46.25.012	TGACAAGATATTCTTTTGTCTTCT	96

【 0 2 3 5 】

10

20

30

40

【表 6 - 5】

Hu.DMD.Exon46.25.012. 2	TTCAAGTGGGATACTAGCAATGTTA	97
Hu.DMD.Exon46.25.013	AGATATTCTTTTGTTCTTCTAGCCT	98
Hu.DMD.Exon46.25.013. 2	CTGCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGGG	99
Hu.DMD.Exon46.25.014	TTCTTTTGTTCTTCTAGCCTGGAGA	100
Hu.DMD.Exon46.25.014. 2	CTTTTCTTTTAGTTGCTGCTCTTTT	101
Hu.DMD.Exon46.25.015	TTGTTCTTCTAGCCTGGAGAAAGAA	102
Hu.DMD.Exon46.25.016	CTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAATA	103
Hu.DMD.Exon46.25.017	AGCCTGGAGAAAGAAGAATAAAATT	104
Hu.DMD.Exon46.25.018	CTGGAGAAAGAAGAATAAAATTGTT	105
Hu.DMD.Exon46.20.001	GAAAGAAGAATAAAATTGTT	106
Hu.DMD.Exon46.20.002	GGAGAAAGAAGAATAAAATT	107
Hu.DMD.Exon46.20.003	AGCCTGGAGAAAGAAGAATA	108
Hu.DMD.Exon46.20.004	CTTCTAGCCTGGAGAAAGAA	109
Hu.DMD.Exon46.20.005	TTGTTCTTCTAGCCTGGAGA	110
Hu.DMD.Exon46.20.006	TTCTTTTGTTCTTCTAGCCT	111
Hu.DMD.Exon46.20.007	TGACAAGATATTCTTTTGTT	112
Hu.DMD.Exon46.20.008	ATCTCTTTGAAATTCTGACA	113
Hu.DMD.Exon46.20.009	AACAAATTCATTTAAATCTC	114
Hu.DMD.Exon46.20.010	TTCTCCAACCATAAACAA	115
Hu.DMD.Exon46.20.011	AGCAATGTTATCTGCTTCCT	116
Hu.DMD.Exon46.20.012	TTCAAGTGGGATACTAGCAA	117
Hu.DMD.Exon46.20.013	CTGCTCTTTTCCAGGTTCAA	118
Hu.DMD.Exon46.20.014	CTTTTCTTTTAGTTGCTGCT	119
Hu.DMD.Exon46.20.015	CTTGACTTGCTCAAGCTTTT	120
Hu.DMD.Exon46.20.016	ATTACCTTGACTTGCTCAAG	121
Hu.DMD.Exon46.20.017	ATAAAATTACCTTGACTTGC	122
Hu.DMD.Exon46.20.018	AGAAAATAAAATTACCTTGA	123
Hu.DMD.Exon46.20.019	ATTTGAGAAAATAAAATTAC	124
Hu.DMD.Exon46.20.020	GGGGGATTTGAGAAAATAAA	125

【 0 2 3 6 】

【表 6 - 6】

Hu.DMD.Exon47.25.001	CTGAAACAGACAAATGCAACAACGT	126
Hu.DMD.Exon47.25.002	AGTAACTGAAACAGACAAATGCAAC	127
Hu.DMD.Exon47.25.003	CCACCAGTAACTGAAACAGACAAAT	128
Hu.DMD.Exon47.25.004	CTCTTCCACCAGTAACTGAAACAGA	129
Hu.DMD.Exon47.25.005	GGCAACTCTTCCACCAGTAACTGAA	130
Hu.DMD.Exon47.25.006	GCAGGGGCAACTCTTCCACCAGTAA	131
Hu.DMD.Exon47.25.007	CTGGCGCAGGGGCAACTCTTCCACC	132
Hu.DMD.Exon47.25.008	TTTAATTGTTTGAGAATTCCCTGGC	133
Hu.DMD.Exon47.25.008. 2	TTGTTTGAGAATTCCCTGGCGCAGG	134
Hu.DMD.Exon47.25.009	GCACGGGTCCTCCAGTTTCATTAA	135
Hu.DMD.Exon47.25.009. 2	TCCAGTTTCATTAAATTGTTTGAGA	136
Hu.DMD.Exon47.25.010	GCTTATGGGAGCACTTACAAGCACG	137
Hu.DMD.Exon47.25.010. 2	TACAAGCACGGGTCCTCCAGTTTCA	138
Hu.DMD.Exon47.25.011	AGTTTATCTTGCTCTTCTGGGCTTA	139
Hu.DMD.Exon47.25.012	TCTGCTTGAGCTTATTTTCAAGTTT	140
Hu.DMD.Exon47.25.012. 2	ATCTTGCTCTTCTGGGCTTATGGGA	141
Hu.DMD.Exon47.25.013	CTTTATCCACTGGAGATTTGTCTGC	142
Hu.DMD.Exon47.25.013. 2	CTTATTTTCAAGTTTATCTTGCTCT	143
Hu.DMD.Exon47.25.014	CTAACCTTTATCCACTGGAGATTTG	144
Hu.DMD.Exon47.25.014. 2	ATTTGTCTGCTTGAGCTTATTTTCA	145
Hu.DMD.Exon47.25.015	AATGTCTAACCTTTATCCACTGGAG	146
Hu.DMD.Exon47.25.016	TGGTTAATGTCTAACCTTTATCCAC	147
Hu.DMD.Exon47.25.017	AGAGATGGTTAATGTCTAACCTTTA	148
Hu.DMD.Exon47.25.018	ACGGAAGAGATGGTTAATGTCTAAC	149
Hu.DMD.Exon47.20.001	ACAGACAAATGCAACAACGT	150
Hu.DMD.Exon47.20.002	CTGAAACAGACAAATGCAAC	151

【 0 2 3 7 】

10

20

30

40

【表 6 - 7】

Hu.DMD.Exon47.20.003	AGTAACTGAAACAGACAAAT	152
Hu.DMD.Exon47.20.004	CCACCAGTAACTGAAACAGA	153
Hu.DMD.Exon47.20.005	CTCTTCCACCAGTAACTGAA	154
Hu.DMD.Exon47.20.006	GGCAACTCTTCCACCAGTAA	155
Hu.DMD.Exon47.20.007	CTGGCGCAGGGGCAACTCTT	156
Hu.DMD.Exon47.20.008	TTGTTTGAGAATTCCCTGGC	157
Hu.DMD.Exon47.20.009	TCCAGTTTCATTTAATTGTT	158
Hu.DMD.Exon47.20.010	TACAAGCACGGGTCCTCCAG	159
Hu.DMD.Exon47.20.011	GCTTATGGGAGCACTTACAA	160
Hu.DMD.Exon47.20.012	ATCTTGCTCTTCTGGGCTTA	161
Hu.DMD.Exon47.20.013	CTTATTTTCAAGTTTATCTT	162
Hu.DMD.Exon47.20.014	ATTTGTCTGCTTGAGCTTAT	163
Hu.DMD.Exon47.20.015	CTTTATCCACTGGAGATTG	164
Hu.DMD.Exon47.20.016	CTAACCTTTATCCACTGGAG	165
Hu.DMD.Exon47.20.017	AATGTCTAACCTTTATCCAC	166
Hu.DMD.Exon47.20.018	TGGTTAATGTCTAACCTTTA	167
Hu.DMD.Exon47.20.019	AGAGATGGTTAATGTCTAAC	168
Hu.DMD.Exon47.20.020	ACGGAAGAGATGGTTAATGT	169
Hu.DMD.Exon48.25.001	CTGAAAGGAAAATACATTTTAAAAA	170
Hu.DMD.Exon48.25.002	CCTGAAAGGAAAATACATTTTAAAA	171
Hu.DMD.Exon48.25.002. 2	GAAACCTGAAAGGAAAATACATTTT	172
Hu.DMD.Exon48.25.003	GGAAACCTGAAAGGAAAATACATTT	173
Hu.DMD.Exon48.25.003. 2	CTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATAC	174
Hu.DMD.Exon48.25.004	GCTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATA	175
Hu.DMD.Exon48.25.004. 2	TAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGAA	634
Hu.DMD.Exon48.25.005	GTAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGA	176
Hu.DMD.Exon48.25.005. 2	TCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGAA	177
Hu.DMD.Exon48.25.006	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGA	178

【 0 2 3 8 】

10

20

30

40

【表 6 - 8】

Hu.DMD.Exon48.25.006. 2	GTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAAC	179
Hu.DMD.Exon48.25.007	TGTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	180
Hu.DMD.Exon48.25.007. 2	AATTTCTCCTTGTTTCTCAGGTAAA	181
Hu.DMD.Exon48.25.008	TTTGAGCTTCAATTTCTCCTTGTTT	182
Hu.DMD.Exon48.25.008	TTTTATTTGAGCTTCAATTTCTCCT	183
Hu.DMD.Exon48.25.009	AAGCTGCCCAAGGTCTTTTATTTGA	184
Hu.DMD.Exon48.25.010	AGGTCTTCAAGCTTTTTTTCAAGCT	185
Hu.DMD.Exon48.25.010. 2	TTCAAGCTTTTTTTCAAGCTGCCCA	186
Hu.DMD.Exon48.25.011	GATGATTTAACTGCTCTTCAAGGTC	187
Hu.DMD.Exon48.25.011. 2	CTGCTCTTCAAGGTCTTCAAGCTTT	188
Hu.DMD.Exon48.25.012	AGGAGATAACCACAGCAGCAGATGA	189
Hu.DMD.Exon48.25.012. 2	CAGCAGATGATTTAACTGCTCTTCA	190
Hu.DMD.Exon48.25.013	ATTTCCAACCTGATTCCTAATAGGAG	191
Hu.DMD.Exon48.25.014	CTTGGTTTGGTTGGTTATAAATTTT	192
Hu.DMD.Exon48.25.014. 2	CAACTGATTCCTAATAGGAGATAAC	193
Hu.DMD.Exon48.25.015	CTTAACGTCAAATGGTCCTTCTTGG	194
Hu.DMD.Exon48.25.015. 2	TTGGTTATAAATTTCCAACCTGATTC	195
Hu.DMD.Exon48.25.016	CCTACCTTAACGTCAAATGGTCCTT	196
Hu.DMD.Exon48.25.016. 2	TCCTTCTTGGTTTGGTTGGTTATAA	197
Hu.DMD.Exon48.25.017	AGTTCCCTACCTTAACGTCAAATGG	198
Hu.DMD.Exon48.25.018	CAAAAAGTTCCCTACCTTAACGTCA	199
Hu.DMD.Exon48.25.019	TAAAGCAAAAAGTTCCCTACCTTAA	200
Hu.DMD.Exon48.25.020	ATATTTAAAGCAAAAAGTTCCCTAC	201
Hu.DMD.Exon48.20.001	AGGAAAATACATTTTAAAAA	202

【 0 2 3 9 】

【表 6 - 9】

Hu.DMD.Exon48.20.002	AAGGAAAATACATTTTAAAA	203
Hu.DMD.Exon48.20.003	CCTGAAAGGAAAATACATTT	204
Hu.DMD.Exon48.20.004	GGAAACCTGAAAGGAAAATA	205
Hu.DMD.Exon48.20.005	GCTCTGGAAACCTGAAAGGA	206
Hu.DMD.Exon48.20.006	GTAAAGCTCTGGAAACCTGA	207
Hu.DMD.Exon48.20.007	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	208
Hu.DMD.Exon48.20.008	AATTTCTCCTTGTTTCTCAG	209
Hu.DMD.Exon48.20.009	TTTTATTTGAGCTTCAATTT	210
Hu.DMD.Exon48.20.010	AAGCTGCCCAAGGTCTTTTA	211
Hu.DMD.Exon48.20.011	TTCAAGCTTTTTTTCAAGCT	212
Hu.DMD.Exon48.20.012	CTGCTCTTCAAGGTCTTCAA	213
Hu.DMD.Exon48.20.013	CAGCAGATGATTTAACTGCT	214
Hu.DMD.Exon48.20.014	AGGAGATAACCACAGCAGCA	215
Hu.DMD.Exon48.20.015	CAACTGATTCCTAATAGGAG	216
Hu.DMD.Exon48.20.016	TTGGTTATAAATTTCCAAC	217
Hu.DMD.Exon48.20.017	TCCTTCTTGTTTGGTTGGT	218
Hu.DMD.Exon48.20.018	CTTAACGTCAAATGGTCCTT	219
Hu.DMD.Exon48.20.019	CCTACCTTAACGTCAAATGG	220
Hu.DMD.Exon48.20.020	AGTTCCCTACCTTAACGTCA	221
Hu.DMD.Exon48.20.021	CAAAAAGTTCCTACCTTAA	222
Hu.DMD.Exon48.20.022	TAAAGCAAAAAGTTCCTAC	223
Hu.DMD.Exon48.20.023	ATATTTAAAGCAAAAAGTTC	224
Hu.DMD.Exon49.25.001	CTGGGGAAAAGAACCCATATAGTGC	225
Hu.DMD.Exon49.25.002	TCCTGGGGAAAAGAACCCATATAGT	226
Hu.DMD.Exon49.25.002. 2	GTTTCCTGGGGAAAAGAACCCATAT	227
Hu.DMD.Exon49.25.003	CAGTTTCCTGGGGAAAAGAACCCAT	228
Hu.DMD.Exon49.25.003. 2	TTTCAGTTTCCTGGGGAAAAGAACC	229
Hu.DMD.Exon49.25.004	TATTTAGTTTCCTGGGGAAAAGAA	230
Hu.DMD.Exon49.25.004. 2	TGCTATTTAGTTTCCTGGGGAAAA	231

【 0 2 4 0 】

【表 6 - 1 0】

Hu.DMD.Exon49.25.005	ACTGCTATTTTCAGTTTCCTGGGGAA	232
Hu.DMD.Exon49.25.005. 2	TGAACTGCTATTTTCAGTTTCCTGGG	233
Hu.DMD.Exon49.25.006	CTTGAAGTCTATTTTCAGTTTCCTG	234
Hu.DMD.Exon49.25.006. 2	TAGCTTGAAGTCTATTTTCAGTTTC	235
Hu.DMD.Exon49.25.007	TTTAGCTTGAAGTCTATTTTCAGTT	236
Hu.DMD.Exon49.25.008	TTCCACATCCGGTTGTTTAGCTTGA	237
Hu.DMD.Exon49.25.009	TGCCCTTTAGACAAAATCTCTTCCA	238
Hu.DMD.Exon49.25.009. 2	TTTAGACAAAATCTCTTCCACATCC	239
Hu.DMD.Exon49.25.010	GTTTTTCCTTGACAAATGCTGCCC	240
Hu.DMD.Exon49.25.010. 2	GTACAAATGCTGCCCTTTAGACAAA	241
Hu.DMD.Exon49.25.011	CTTCACTGGCTGAGTGGCTGGTTTT	242
Hu.DMD.Exon49.25.011. 2	GGCTGGTTTTTCCTTGACAAATGC	243
Hu.DMD.Exon49.25.012	ATTACCTTCACTGGCTGAGTGGCTG	244
Hu.DMD.Exon49.25.013	GCTTCATTACCTTCACTGGCTGAGT	245
Hu.DMD.Exon49.25.014	AGGTTGCTTCATTACCTTCACTGGC	246
Hu.DMD.Exon49.25.015	GCTAGAGGTTGCTTCATTACCTTCA	247
Hu.DMD.Exon49.25.016	ATATTGCTAGAGGTTGCTTCATTAC	248
Hu.DMD.Exon49.20.001	GAAAAGAACCCATATAGTGC	249
Hu.DMD.Exon49.20.002	GGGAAAAGAACCCATATAGT	250
Hu.DMD.Exon49.20.003	TCCTGGGGAAAAGAACCCAT	251
Hu.DMD.Exon49.20.004	CAGTTTCCTGGGGAAAAGAA	252
Hu.DMD.Exon49.20.005	TATTTTCAGTTTCCTGGGGAA	253
Hu.DMD.Exon49.20.006	ACTGCTATTTTCAGTTTCCTG	254
Hu.DMD.Exon49.20.007	CTTGAAGTCTATTTTCAGTT	255
Hu.DMD.Exon49.20.008	TTTAGCTTGAAGTCTATTT	256
Hu.DMD.Exon49.20.009	TTCCACATCCGGTTGTTTAG	257
Hu.DMD.Exon49.20.010	TTTAGACAAAATCTCTTCCA	258

【 0 2 4 1】

10

20

30

40

【表 6 - 1 1】

Hu.DMD.Exon49.20.011	GTACAAATGCTGCCCTTTAG	259
Hu.DMD.Exon49.20.012	GGCTGGTTTTTCCTTGTACA	260
Hu.DMD.Exon49.20.013	CTTCACTGGCTGAGTGGCTG	261
Hu.DMD.Exon49.20.014	ATTACCTTCACTGGCTGAGT	262
Hu.DMD.Exon49.20.015	GCTTCATTACCTTCACTGGC	263
Hu.DMD.Exon49.20.016	AGGTTGCTTCATTACCTTCA	264
Hu.DMD.Exon49.20.017	GCTAGAGGTTGCTTCATTAC	265
Hu.DMD.Exon49.20.018	ATATTGCTAGAGGTTGCTTC	266
Hu.DMD.Exon50.25.001	CTTTAACAGAAAAGCATAACATTA	267
Hu.DMD.Exon50.25.002	TCCTCTTTAACAGAAAAGCATAAC	268
Hu.DMD.Exon50.25.002. 2	TTCTCTTTAACAGAAAAGCATACA	269
Hu.DMD.Exon50.25.003	TAACCTCCTCTTTAACAGAAAAGCA	270
Hu.DMD.Exon50.25.003. 2	CTAACCTCCTCTTTAACAGAAAAGC	271
Hu.DMD.Exon50.25.004	TCTTCTAACTTCCTCTTTAACAGAA	272
Hu.DMD.Exon50.25.004. 2	ATCTTCTAACTTCCTCTTTAACAGA	273
Hu.DMD.Exon50.25.005	TCAGATCTTCTAACTTCCTCTTTAA	274
Hu.DMD.Exon50.25.005. 2	CTCAGATCTTCTAACTTCCTCTTTA	275
Hu.DMD.Exon50.25.006	AGAGCTCAGATCTTCTAACTTCCTC	276
Hu.DMD.Exon50.25.006. 2 NG-08-0731	CAGAGCTCAGATCTTCTAACTTCCT	277
Hu.DMD.Exon50.25.007	CACTCAGAGCTCAGATCTTCTACT	278
Hu.DMD.Exon50.25.007. 2	CCTTCCACTCAGAGCTCAGATCTTC	279
Hu.DMD.Exon50.25.008	GTAAACGGTTTACCGCCTTCCACTC	280
Hu.DMD.Exon50.25.009	CTTTGCCCTCAGCTCTTGAAGTAAA	281
Hu.DMD.Exon50.25.009. 2	CCCTCAGCTCTTGAAGTAAACGGTT	282

【 0 2 4 2 】

10

20

30

40

【表 6 - 1 2】

Hu.DMD.Exon50.25.010	CCAGGAGCTAGGTCAGGCTGCTTTG	283
Hu.DMD.Exon50.25.010. 2	GGTCAGGCTGCTTTGCCCTCAGCTC	284
Hu.DMD.Exon50.25.011	AGGCTCCAATAGTGGTCAGTCCAGG	285
Hu.DMD.Exon50.25.011. 2	TCAGTCCAGGAGCTAGGTCAGGCTG	286
Hu.DMD.Exon50.25.012 AVI-5038	CTTACAGGCTCCAATAGTGGTCAGT	287
Hu.DMD.Exon50.25.013	GTATACTTACAGGCTCCAATAGTGG	288
Hu.DMD.Exon50.25.014	ATCCAGTATACTTACAGGCTCCAAT	289
Hu.DMD.Exon50.25.015 NG-08-0741	ATGGGATCCAGTATACTTACAGGCT	290
Hu.DMD.Exon50.25.016 NG-08-0742	AGAGAATGGGATCCAGTATACTTAC	291
Hu.DMD.Exon50.20.001	ACAGAAAAGCATACACATTA	292
Hu.DMD.Exon50.20.002	TTTAACAGAAAAGCATACAC	293
Hu.DMD.Exon50.20.003	TCCTCTTTAACAGAAAAGCA	294
Hu.DMD.Exon50.20.004	TAAC TTCCTCTTTAACAGAA	295
Hu.DMD.Exon50.20.005	TCTTCTAACTTCCTCTTTAA	296
Hu.DMD.Exon50.20.006	TCAGATCTTCTAACTTCCTC	297
Hu.DMD.Exon50.20.007	CCTTCCACTCAGAGCTCAGA	298
Hu.DMD.Exon50.20.008	GTAAACGGTTTACCGCCTTC	299
Hu.DMD.Exon50.20.009	CCCTCAGCTCTTGAAGTAAA	300
Hu.DMD.Exon50.20.010	GGTCAGGCTGCTTTGCCCTC	301
Hu.DMD.Exon50.20.011	TCAGTCCAGGAGCTAGGTCA	302
Hu.DMD.Exon50.20.012	AGGCTCCAATAGTGGTCAGT	303
Hu.DMD.Exon50.20.013	CTTACAGGCTCCAATAGTGG	304
Hu.DMD.Exon50.20.014	GTATACTTACAGGCTCCAAT	305
Hu.DMD.Exon50.20.015	ATCCAGTATACTTACAGGCT	306
Hu.DMD.Exon50.20.016	ATGGGATCCAGTATACTTAC	307
Hu.DMD.Exon50.20.017	AGAGAATGGGATCCAGTATA	308
Hu.DMD.Exon51.25.001-	CTAAAATATTTTGGGTTTTTGCAAAA	309

【 0 2 4 3 】

【表 6 - 1 3】

44		
Hu.DMD.Exon51.25.002-45	GCTAAAATATTTTGGGTTTTTGCAA	310
Hu.DMD.Exon51.25.002.2-46	TAGGAGCTAAAATATTTTGGGTTTT	311
Hu.DMD.Exon51.25.003	AGTAGGAGCTAAAATATTTTGGGTT	312
Hu.DMD.Exon51.25.003.2	TGAGTAGGAGCTAAAATATTTTGGG	313
Hu.DMD.Exon51.25.004	CTGAGTAGGAGCTAAAATATTTTGG G	314
Hu.DMD.Exon51.25.004.2	CAGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATT	315
Hu.DMD.Exon51.25.005	ACAGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATT	316
Hu.DMD.Exon51.25.005.2	GAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCTAA A	317
Hu.DMD.Exon51.25.006	CAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCT	318
Hu.DMD.Exon51.25.006.2	CACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGA G	319
Hu.DMD.Exon51.25.007	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAG	320
Hu.DMD.Exon51.25.007.2	AACCACAGGTTGTGTCACCAGAGTA A	321
Hu.DMD.Exon51.25.008	GTTGTGTCACCAGAGTAACAGTCTG	322
Hu.DMD.Exon51.25.009	TGGCAGTTTCCTTAGTAACCACAGG T	323
Hu.DMD.Exon51.25.010	ATTTCTAGTTTGGAGATGGCAGTTTC	324
Hu.DMD.Exon51.25.010.2	GGAAGATGGCATTTCCTAGTTTGGAG	325
Hu.DMD.Exon51.25.011	CATCAAGGAAGATGGCATTTCCTAGTT	326
Hu.DMD.Exon51.25.011.2	GAGCAGGTACCTCCAACATCAAGGA A	327
Hu.DMD.Exon51.25.012	ATCTGCCAGAGCAGGTACCTCCAAC	328
Hu.DMD.Exon51.25.013	AAGTTCTGTCCAAGCCCGGTTGAAA	329

【 0 2 4 4 】

10

20

30

40

【表 6 - 1 4】

	T	
Hu.DMD.Exon51.25.013. 2	CGGTTGAAATCTGCCAGAGCAGGTA C	330
Hu.DMD.Exon51.25.014	GAGAAAGCCAGTCGGTAAGTTCTGT C	331
Hu.DMD.Exon51.25.014. 2	GTCGGTAAGTTCTGTCCAAGCCCGG	332
Hu.DMD.Exon51.25.015	ATAACTTGATCAAGCAGAGAAAGCC A	333
Hu.DMD.Exon51.25.015. 2	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGGTAAGT	334
Hu.DMD.Exon51.25.016	CACCCTCTGTGATTTTATAACTTGAT	335
Hu.DMD.Exon51.25.017	CAAGGTCACCCACCATCACCTCTG T	336
Hu.DMD.Exon51.25.017. 2	CATCACCTCTGTGATTTTATAACT	337
Hu.DMD.Exon51.25.018	CTTCTGCTTGATGATCATCTCGTTGA	338
Hu.DMD.Exon51.25.019	CCTTCTGCTTGATGATCATCTCGTTG	339
Hu.DMD.Exon51.25.019. 2	ATCTCGTTGATATCCTCAAGGTCACC	340
Hu.DMD.Exon51.25.020	TCATACCTTCTGCTTGATGATCATCT	341
Hu.DMD.Exon51.25.020. 2	TCATTTTTTCTCATACCTTCTGCTTG	342
Hu.DMD.Exon51.25.021	TTTTCTCATACCTTCTGCTTGATGAT	343
Hu.DMD.Exon51.25.022	TTTTATCATTTTTTCTCATACCTTCT	344
Hu.DMD.Exon51.25.023	CCAACTTTTATCATTTTTTCTCATAC	345
Hu.DMD.Exon51.20.001	ATATTTTGGGTTTTTGCAA	346
Hu.DMD.Exon51.20.002	AAAATATTTTGGGTTTTTGC	347
Hu.DMD.Exon51.20.003	GAGCTAAAATATTTTGGGTT	348
Hu.DMD.Exon51.20.004	AGTAGGAGCTAAAATATTTT	349
Hu.DMD.Exon51.20.005	GTCTGAGTAGGAGCTAAAAT	350
Hu.DMD.Exon51.20.006	TAACAGTCTGAGTAGGAGCT	351

【 0 2 4 5】

10

20

30

40

【表 6 - 1 5】

Hu.DMD.Exon51.20.007	CAGAGTAACAGTCTGAGTAG	352
Hu.DMD.Exon51.20.008	CACAGGTTGTGTCACCAGAG	353
Hu.DMD.Exon51.20.009	AGTTTCCTTAGTAACCACAG	354
Hu.DMD.Exon51.20.010	TAGTTTGGAGATGGCAGTTT	355
Hu.DMD.Exon51.20.011	GGAAGATGGCATTCTAGTT	356
Hu.DMD.Exon51.20.012	TACCTCCAACATCAAGGAAG	357
Hu.DMD.Exon51.20.013	ATCTGCCAGAGCAGGTACCT	358
Hu.DMD.Exon51.20.014	CCAAGCCCGGTTGAAATCTG	359
Hu.DMD.Exon51.20.015	GTCGGTAAGTTCTGTCCAAG	360
Hu.DMD.Exon51.20.016	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGG	361
Hu.DMD.Exon51.20.017	TTTTATAACTTGATCAAGCA	362
Hu.DMD.Exon51.20.018	CATCACCTCTGTGATTTTA	363
Hu.DMD.Exon51.20.019	CTCAAGGTCACCCACCATCA	364
Hu.DMD.Exon51.20.020	CATCTCGTTGATATCCTCAA	365
Hu.DMD.Exon51.20.021	CTTCTGCTTGATGATCATCT	366
Hu.DMD.Exon51.20.022	CATACCTTCTGCTTGATGAT	367
Hu.DMD.Exon51.20.023	TTTCTCATACCTTCTGCTTG	368
Hu.DMD.Exon51.20.024	CATTTTTTCTCATACCTTCT	369
Hu.DMD.Exon51.20.025	TTTATCATTTTTTCTCATAC	370
Hu.DMD.Exon51.20.026	CAACTTTTATCATTTTTTCT	371
Hu.DMD.Exon52.25.001	CTGTAAGAACAAATATCCCTTAGTA	372
Hu.DMD.Exon52.25.002	TGCCTGTAAGAACAAATATCCCTTA	373
Hu.DMD.Exon52.25.002. 2	GTTGCCTGTAAGAACAAATATCCCT	374
Hu.DMD.Exon52.25.003	ATTGTTGCCTGTAAGAACAAATATC	375
Hu.DMD.Exon52.25.003. 2	GCATTGTTGCCTGTAAGAACAAATA	376
Hu.DMD.Exon52.25.004	CCTGCATTGTTGCCTGTAAGAACAA	377
Hu.DMD.Exon52.25.004. 2	ATCCTGCATTGTTGCCTGTAAGAAC	378
Hu.DMD.Exon52.25.005	CAAATCCTGCATTGTTGCCTGTAAG	379
Hu.DMD.Exon52.25.005.	TCCAAATCCTGCATTGTTGCCTGTA	380

【 0 2 4 6 】

10

20

30

40

【表 6 - 1 6】

2		
Hu.DMD.Exon52.25.006	TGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCCT	381
Hu.DMD.Exon52.25.006.	TCTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGC	382
2		
Hu.DMD.Exon52.25.007	AACTGGGGACGCCTCTGTTCCAAAT	383
Hu.DMD.Exon52.25.007.	GCCTCTGTTCCAAATCCTGCATTGT	384
2		
Hu.DMD.Exon52.25.008	CAGCGGTAATGAGTTCTTCCAACTG	385
Hu.DMD.Exon52.25.008.	CTTCCAACTGGGGACGCCTCTGTTC	386
2		
Hu.DMD.Exon52.25.009	CTTGTTTTTCAAATTTTGGGCAGCG	387
Hu.DMD.Exon52.25.010	CTAGCCTCTTGATTGCTGGTCTTGT	388
Hu.DMD.Exon52.25.010.	TTTTCAAATTTTGGGCAGCGGTAAT	389
2		
Hu.DMD.Exon52.25.011	TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGC	390
Hu.DMD.Exon52.25.011.	GATTGCTGGTCTTGTTTTTCAAATT	391
2		
Hu.DMD.Exon52.25.012	CTTACTTCGATCCGTAATGATTGTT	392
Hu.DMD.Exon52.25.012.	TTGTTCTAGCCTCTTGATTGCTGGT	393
2		
Hu.DMD.Exon52.25.013	AAAACTTACTTCGATCCGTAATGA	394
Hu.DMD.Exon52.25.014	TGTTAAAAAACTTACTTCGATCCGT	395
Hu.DMD.Exon52.25.015	ATGCTTGTTAAAAAACTTACTTCGA	396
Hu.DMD.Exon52.25.016	GTCCCATGCTTGTTAAAAAACTTAC	397
Hu.DMD.Exon52.20.001	AGAACAAATATCCCTTAGTA	398
Hu.DMD.Exon52.20.002	GTAAGAACAAATATCCCTTA	399
Hu.DMD.Exon52.20.003	TGCCTGTAAGAACAAATATC	400
Hu.DMD.Exon52.20.004	ATTGTTGCCTGTAAGAACAA	401
Hu.DMD.Exon52.20.005	CCTGCATTGTTGCCTGTAAG	402
Hu.DMD.Exon52.20.006	CAAATCCTGCATTGTTGCCT	403
Hu.DMD.Exon52.20.007	GCCTCTGTTCCAAATCCTGC	404
Hu.DMD.Exon52.20.008	CTTCCAACTGGGGACGCCTC	405

【 0 2 4 7 】

10

20

30

40

【表 6 - 1 7】

Hu.DMD.Exon52.20.009	CAGCGGTAATGAGTTCTTCC	406
Hu.DMD.Exon52.20.010	TTTTCAAATTTTGGGCAGCG	407
Hu.DMD.Exon52.20.011	GATTGCTGGTCTTGTTTTTC	408
Hu.DMD.Exon52.20.012	TTGTTCTAGCCTCTTGATTG	409
Hu.DMD.Exon52.20.013	TTCGATCCGTAATGATTGTT	410
Hu.DMD.Exon52.20.014	CTTACTTCGATCCGTAATGA	411
Hu.DMD.Exon52.20.015	AAAACTTACTTCGATCCGT	412
Hu.DMD.Exon52.20.016	TGTAAAAAACTTACTTCGA	413
Hu.DMD.Exon52.20.017	ATGCTTGTTAAAAAACTTAC	414
Hu.DMD.Exon52.20.018	GTCCCATGCTTGTTAAAAAA	415
Hu.DMD.Exon53.25.001	CTAGAATAAAAGGAAAAATAAATAT	416
Hu.DMD.Exon53.25.002	AACTAGAATAAAAGGAAAAATAAAT	417
Hu.DMD.Exon53.25.002. 2	TTCAACTAGAATAAAAGGAAAAATA	418
Hu.DMD.Exon53.25.003	CTTTCAACTAGAATAAAAGGAAAAA	419
Hu.DMD.Exon53.25.003. 2	ATTCTTTCAACTAGAATAAAAGGAA	420
Hu.DMD.Exon53.25.004	GAATTCTTTCAACTAGAATAAAAGG	421
Hu.DMD.Exon53.25.004. 2	TCTGAATTCTTTCAACTAGAATAAA	422
Hu.DMD.Exon53.25.005	ATTCTGAATTCTTTCAACTAGAATA	423
Hu.DMD.Exon53.25.005. 2	CTGATTCTGAATTCTTTCAACTAGA	424
Hu.DMD.Exon53.25.006	CACTGATTCTGAATTCTTTCAACTA	425
Hu.DMD.Exon53.25.006. 2	TCCCACTGATTCTGAATTCTTTCAA	426
Hu.DMD.Exon53.25.007	CATCCCACTGATTCTGAATTCTTTC	427
Hu.DMD.Exon53.25.008	TACTTCATCCCACTGATTCTGAATT	428
Hu.DMD.Exon53.25.008. 2	CTGAAGGTGTTCTTGTAATTCTATCC	429
Hu.DMD.Exon53.25.009	CGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAATT	430
Hu.DMD.Exon53.25.009.	CTGTTGCCTCCGTTCTGAAGGTGT	431

【 0 2 4 8 】

10

20

30

40

【表 6 - 1 8】

2		
Hu.DMD.Exon53.25.010	TTTCATTCAACTGTTGCCTCCGGTT	432
Hu.DMD.Exon53.25.010.	TAACATTTCAATTCAACTGTTGCCTC	433
2		
Hu.DMD.Exon53.25.011	TTGTGTTGAATCCTTTAACATTTCA	434
Hu.DMD.Exon53.25.012	TCTTCCTTAGCTTCCAGCCATTGTG	435
Hu.DMD.Exon53.25.012.	CTTAGCTTCCAGCCATTGTGTTGAA	436
2		
Hu.DMD.Exon53.25.013	GTCCTAAGACCTGCTCAGCTTCTTC	437
Hu.DMD.Exon53.25.013.	CTGCTCAGCTTCTTCCTTAGCTTCC	438
2		
Hu.DMD.Exon53.25.014	CTCAAGCTTGGCTCTGGCCTGTCCT	439
Hu.DMD.Exon53.25.014.	GGCCTGTCCTAAGACCTGCTCAGCT	440
2		
Hu.DMD.Exon53.25.015	TAGGGACCCTCCTTCCATGACTCAA	441
Hu.DMD.Exon53.25.016	TTTGGATTGCATCTACTGTATAGGG	442
Hu.DMD.Exon53.25.016.	ACCCTCCTTCCATGACTCAAGCTTG	443
2		
Hu.DMD.Exon53.25.017	CTTGGTTTCTGTGATTTTCTTTTGG	444
Hu.DMD.Exon53.25.017.	ATCTACTGTATAGGGACCCTCCTTC	445
2		
Hu.DMD.Exon53.25.018	CTAACCTTGGTTTCTGTGATTTTCT	446
Hu.DMD.Exon53.25.018.	TTTCTTTTGGATTGCATCTACTGTA	447
2		
Hu.DMD.Exon53.25.019	TGATACTAACCTTGGTTTCTGTGAT	448
Hu.DMD.Exon53.25.020	ATCTTTGATACTAACCTTGGTTTCT	449
Hu.DMD.Exon53.25.021	AAGGTATCTTTGATACTAACCTTGG	450
Hu.DMD.Exon53.25.022	TTAAAAAGGTATCTTTGATACTAAC	451
Hu.DMD.Exon53.20.001	ATAAAAGGAAAAATAAATAT	452
Hu.DMD.Exon53.20.002	GAATAAAAGGAAAAATAAAT	453
Hu.DMD.Exon53.20.003	AACTAGAATAAAAGGAAAA	454
Hu.DMD.Exon53.20.004	CTTTCAACTAGAATAAAAGG	455

【 0 2 4 9 】

10

20

30

40

【表 6 - 1 9】

Hu.DMD.Exon53.20.005	GAATTCTTTCAACTAGAATA	456
Hu.DMD.Exon53.20.006	ATTCTGAATTCTTTCAACTA	457
Hu.DMD.Exon53.20.007	TACTTCATCCCACTGATTCT	458
Hu.DMD.Exon53.20.008	CTGAAGGTGTTCTTGTACT	459
Hu.DMD.Exon53.20.009	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAA	460
Hu.DMD.Exon53.20.010	TAACATTTCAATTCAACTGTT	461
Hu.DMD.Exon53.20.011	TTGTGTTGAATCCTTTAACA	462
Hu.DMD.Exon53.20.012	CTTAGCTTCCAGCCATTGTG	463
Hu.DMD.Exon53.20.013	CTGCTCAGCTTCTTCCTTAG	464
Hu.DMD.Exon53.20.014	GGCCTGTCCTAAGACCTGCT	465
Hu.DMD.Exon53.20.015	CTCAAGCTTGGCTCTGGCCT	466
Hu.DMD.Exon53.20.016	ACCCTCCTTCCATGACTCAA	467
Hu.DMD.Exon53.20.017	ATCTACTGTATAGGGACCCT	468
Hu.DMD.Exon53.20.018	TTTCTTTTGGATTGCATCTA	469
Hu.DMD.Exon53.20.019	CTTGGTTTCTGTGATTTTCT	470
Hu.DMD.Exon53.20.020	CTAACCTTGGTTTCTGTGAT	471
Hu.DMD.Exon53.20.021	TGATACTAACCTTGGTTTCT	472
Hu.DMD.Exon53.20.022	ATCTTTGATACTAACCTTGG	473
Hu.DMD.Exon53.20.023	AAGGTATCTTTGATACTAAC	474
Hu.DMD.Exon53.20.024	TTAAAAAGGTATCTTTGATA	475
Hu.DMD.Exon54.25.001	CTATAGATTTTTATGAGAAAGAGA	476
Hu.DMD.Exon54.25.002	AACTGCTATAGATTTTTATGAGAAA	477
Hu.DMD.Exon54.25.003	TGGCCAACTGCTATAGATTTTTATG	478
Hu.DMD.Exon54.25.004	GTCTTTGGCCAACTGCTATAGATTT	479
Hu.DMD.Exon54.25.005	CGGAGGTCTTTGGCCAACTGCTATA	480
Hu.DMD.Exon54.25.006	ACTGGCGGAGGTCTTTGGCCAACTG	481
Hu.DMD.Exon54.25.007	TTTGTCTGCCACTGGCGGAGGTCTT	482
Hu.DMD.Exon54.25.008	AGTCATTTGCCACATCTACATTTGT	483
Hu.DMD.Exon54.25.008. 2	TTTGCCACATCTACATTTGTCTGCC	484
Hu.DMD.Exon54.25.009	CCGGAGAAGTTTCAGGGCCAAGTCA	485
Hu.DMD.Exon54.25.010	GTATCATCTGCAGAATAATCCCGGA	486

【 0 2 5 0 】

【表 6 - 2 0】

Hu.DMD.Exon54.25.010. 2	TAATCCCGGAGAAGTTTCAGGGCCA	487
Hu.DMD.Exon54.25.011	TTATCATGTGGACTTTTCTGGTATC	488
Hu.DMD.Exon54.25.012	AGAGGCATTGATATTCTCTGTTATC	489
Hu.DMD.Exon54.25.012. 2	ATGTGGACTTTTCTGGTATCATCTG	490
Hu.DMD.Exon54.25.013	CTTTTATGAATGCTTCTCCAAGAGG	491
Hu.DMD.Exon54.25.013. 2	ATATTCTCTGTTATCATGTGGACTT	492
Hu.DMD.Exon54.25.014	CATACCTTTTATGAATGCTTCTCCA	493
Hu.DMD.Exon54.25.014. 2	CTCCAAGAGGCATTGATATTCTCTG	494
Hu.DMD.Exon54.25.015	TAATTCATACCTTTTATGAATGCTT	495
Hu.DMD.Exon54.25.015. 2	CTTTTATGAATGCTTCTCCAAGAGG	496
Hu.DMD.Exon54.25.016	TAATGTAATTCATACCTTTTATGAA	497
Hu.DMD.Exon54.25.017	AGAAATAATGTAATTCATACCTTTT	498
Hu.DMD.Exon54.25.018	GTTTTAGAAATAATGTAATTCATAC	499
Hu.DMD.Exon54.20.001	GATTTTTATGAGAAAGAGA	500
Hu.DMD.Exon54.20.002	CTATAGATTTTTATGAGAAA	501
Hu.DMD.Exon54.20.003	AAC TGCTATAGATTTTTATG	502
Hu.DMD.Exon54.20.004	TGGCCAACTGCTATAGATTT	503
Hu.DMD.Exon54.20.005	GTCTTTGGCCAACTGCTATA	504
Hu.DMD.Exon54.20.006	CGGAGGTCTTTGGCCAACTG	505
Hu.DMD.Exon54.20.007	TTTGTCTGCCACTGGCGGAG	506
Hu.DMD.Exon54.20.008	TTTGCCACATCTACATTTGT	507
Hu.DMD.Exon54.20.009	TTCAGGGCCAAGTCATTTGC	508
Hu.DMD.Exon54.20.010	TAATCCCGGAGAAGTTTCAG	509
Hu.DMD.Exon54.20.011	GTATCATCTGCAGAATAATC	510
Hu.DMD.Exon54.20.012	ATGTGGACTTTTCTGGTATC	511
Hu.DMD.Exon54.20.013	ATATTCTCTGTTATCATGTG	512
Hu.DMD.Exon54.20.014	CTCCAAGAGGCATTGATATT	513

【 0 2 5 1】

【表 6 - 2 1】

Hu.DMD.Exon54.20.015	CTTTTATGAATGCTTCTCCA	514
Hu.DMD.Exon54.20.016	CATACCTTTTATGAATGCTT	515
Hu.DMD.Exon54.20.017	TAATTCATACCTTTTATGAA	516
Hu.DMD.Exon54.20.018	TAATGTAATTCATACCTTTT	517
Hu.DMD.Exon54.20.019	AGAAATAATGTAATTCATAC	518
Hu.DMD.Exon54.20.020	GTTTGTAGAAATAATGTAATT	519
Hu.DMD.Exon55.25.001	CTGCAAAGGACCAAATGTTTCAGATG	520
Hu.DMD.Exon55.25.002	TCACCCTGCAAAGGACCAAATGTTC	521
Hu.DMD.Exon55.25.003	CTCACTCACCTGCAAAGGACCAAA	522
Hu.DMD.Exon55.25.004	TCTCGCTCACTCACCTGCAAAGGA	523
Hu.DMD.Exon55.25.005	CAGCCTCTCGCTCACTCACCTGCA	524
Hu.DMD.Exon55.25.006	CAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC	525
Hu.DMD.Exon55.25.007	TCTTCAAAGCAGCCTCTCGCTCAC	526
Hu.DMD.Exon55.25.007. 2	TCTATGAGTTTCTTCAAAGCAGCC	527
Hu.DMD.Exon55.25.008	GTTGCAGTAATCTATGAGTTTCTTC	528
Hu.DMD.Exon55.25.008. 2	GAAGTGTTCAGTAATCTATGAGTT	529
Hu.DMD.Exon55.25.009	TTCCAGGTCCAGGGGGAAGTGTTC	530
Hu.DMD.Exon55.25.010	GTAAGCCAGGCAAGAACTTTTCCA	531
Hu.DMD.Exon55.25.010. 2	CCAGGCAAGAACTTTTCCAGGTCC	532
Hu.DMD.Exon55.25.011	TGGCAGTTGTTTCAGCTTCTGTAAG	533
Hu.DMD.Exon55.25.011. 2	TTTCAGCTTCTGTAAGCCAGGCAAGA	635
Hu.DMD.Exon55.25.012	GGTAGCATCCTGTAGGACATTGGCA	534
Hu.DMD.Exon55.25.012. 2	GACATTGGCAGTTGTTTCAGCTTCT	535
Hu.DMD.Exon55.25.013	TCTAGGAGCCTTTCCTTACGGGTAG	536
Hu.DMD.Exon55.25.014	CTTTTACTCCCTTGGAGTCTTCTAG	537
Hu.DMD.Exon55.25.014. 2	GAGCCTTTCCTTACGGGTAGCATCC	538

【 0 2 5 2 】

【表 6 - 2 2】

Hu.DMD.Exon55.25.015	TTGCCATTGTTTCATCAGCTCTTTT	539
Hu.DMD.Exon55.25.015. 2	CTTGGAGTCTTCTAGGAGCCTTTCC	540
Hu.DMD.Exon55.25.016	CTTACTTGCCATTGTTTCATCAGCT	541
Hu.DMD.Exon55.25.016. 2	CAGCTCTTTTACTCCCTTGGAGTCT	542
Hu.DMD.Exon55.25.017	CCTGACTTACTTGCCATTGTTTCAT	543
Hu.DMD.Exon55.25.018	AAATGCCTGACTTACTTGCCATTGT	544
Hu.DMD.Exon55.25.019	AGCGGAAATGCCTGACTTACTTGCC	545
Hu.DMD.Exon55.25.020	GCTAAAGCGGAAATGCCTGACTTAC	546
Hu.DMD.Exon55.20.001	AAGGACCAAATGTTTCAGATG	547
Hu.DMD.Exon55.20.002	CTGCAAAGGACCAAATGTTTC	548
Hu.DMD.Exon55.20.003	TCACCCTGCAAAGGACCAAAA	549
Hu.DMD.Exon55.20.004	CTCACTCACCCCTGCAAAGGA	550
Hu.DMD.Exon55.20.005	TCTCGCTCACTCACCCCTGCA	551
Hu.DMD.Exon55.20.006	CAGCCTCTCGCTCACTCACCC	552
Hu.DMD.Exon55.20.007	CAAAGCAGCCTCTCGCTCAC	553
Hu.DMD.Exon55.20.008	TCTATGAGTTTCTTCCAAAG	554
Hu.DMD.Exon55.20.009	GAAGTGTTCAGTAATCTAT	555
Hu.DMD.Exon55.20.010	TTCCAGGTCCAGGGGGAAGT	556
Hu.DMD.Exon55.20.011	CCAGGCAAGAACTTTTCCA	557
Hu.DMD.Exon55.20.012	TTCAGCTTCTGTAAGCCAGG	558
Hu.DMD.Exon55.20.013	GACATTGGCAGTTGTTTCAG	559
Hu.DMD.Exon55.20.014	GGTAGCATCCTGTAGGACAT	560
Hu.DMD.Exon55.20.015	GAGCCTTTCTTACGGGTAG	561
Hu.DMD.Exon55.20.016	CTTGGAGTCTTCTAGGAGCC	562
Hu.DMD.Exon55.20.017	CAGCTCTTTTACTCCCTTGG	563
Hu.DMD.Exon55.20.018	TTGCCATTGTTTCATCAGCT	564
Hu.DMD.Exon55.20.019	CTTACTTGCCATTGTTTCAT	565
Hu.DMD.Exon55.20.020	CCTGACTTACTTGCCATTGT	566
Hu.DMD.Exon55.20.021	AAATGCCTGACTTACTTGCC	567
Hu.DMD.Exon55.20.022	AGCGGAAATGCCTGACTTAC	568

【 0 2 5 3 】

10

20

30

40

【表 6 - 2 3】

Hu.DMD.Exon55.20.023	GCTAAAGCGGAAATGCCTGA	569
H50A(+02+30)-AVI-5656	CCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAACT TCC	584
H50D(+07-18)-AVI-5915	GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	585
H50A(+07+33)	CTTCCACTCAGAGCTCAGATCTTCTA A	586
H51A(+61+90)-AVI-4657	ACATCAAGGAAGATGGCATTCTAGT TTGG	587
H51A(+66+95)-AVI-4658	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATT TCTAG	588
H51A(+111+134)	TTCTGTCCAAGCCCGGTTGAAATC	589
H51A(+175+195)	CACCCACCATCACCTCYGTG	590
H51A(+199+220)	ATCATCTCGTTGATATCCTCAA	591
H51A(+66+90)	ACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	592
H51A(-01+25)	ACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG C	593
h51AON1	TCAAGGAAGATGGCATTCT	594
h51AON2	CCTCTGTGATTTTATACTTGAT	595
H51D(+08-17)	ATCATTTTTTCTCATACCTTCTGCT	596
H51D(+16-07)	CTCATACCTTCTGCTTGATGATC	597
hAON#23	TGGCATTCTAGTTTGG	598
hAON#24	CCAGAGCAGGTACCTCCAACATC	599
H44A(+61+84)	TGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGA	600
H44A(+85+104)	TTTGTGTCTTTCTGAGAAAC	601
h44AON1	CGCCGCCATTTCTCAACAG	602
H44A(-06+14)	ATCTGTCAAATCGCCTGCAG	603
H45A(+71+90)	TGTTTTTGAGGATTGCTGAA	604
h45AON1	GCTGAATTATTTCTTCCCC	605
h45AON5	GCCCAATGCCATCCTGG	606
H45A(-06+20)	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA A	607
H53A(+39+69)	CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGA AGGTG	608

【 0 2 5 4 】

【表 6 - 2 4】

H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	609
h53AON1	CTGTTGCCTCCGGTTCTG	610
H53A(-12+10)	ATTCTTTCAACTAGAATAAAAG	611
huEx45.30.66	GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATA CCAAA	612
huEx45.30.71	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA AGATA	613
huEx45.30.79	GCCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAG TTCCT	614
huEx45.30.83	GTTTGCCGCTGCCCAATGCCATCCT GGAGT	615
huEx45.30.88	CAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCC ATCCT	616
huEx45.30.92	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA TGCCA	617
huEx45.30.96	TGTTCTGACAACAGTTTGCCGCTGC CCAAT	618
huEx45.30.99	CAATGTTCTGACAACAGTTTGCCGCT GCCC	619
huEx45.30.103	CATTCAATGTTCTGACAACAGTTTGC CGCT	620
huEx45.30.120	TATTTCTTCCCCAGTTGCATTCAATG TTCT	621
huEx45.30.127	GCTGAATTATTTCTTCCCCAGTTGCA TTCA	622
huEx45.30.132	GGATTGCTGAATTATTTCTTCCCCAG TTGC	623
huEx45.30.137	TTTGAGGATTGCTGAATTATTTCTTC CCCA	624
huEx53.30.84	GTAATTCATCCCACTGATTCTGAATT CTTT	625
huEx53.30.88	TCTTGTACTTCATCCCACTGATTCTG AATT	626
huEx53.30.91	TGTTCTTGTACTTCATCCCACTGATT CTGA	627
huEx53.30.103	CGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACTTC ATCC	628
huEx53.30.106	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA CTTCA	629
huEx53.30.109	TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTT GTAAT	630
huEx53.30.112	TGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTT CTTGT	631
huEx53.30.115	AACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGT GTTCT	632

【 0 2 5 5 】

10

20

30

40

【表 6 - 2 5】

huEx53.30.118	TTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAA GGTGT	633
h50AON1		
h50AON2		
ペプチドトランスポーター (NH₂からCOOH)*:		
rTAT	RRRQRRKKRC	570
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFFC	571
(RAhx) ₄ B	RAhxRAhxRAhxRAhxB	572
(RAhxR) ₄ AhxB; (P007)	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	573
(AhxRR) ₄ AhxB	AhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	574
(RAhx) ₆ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	575
(RAhx) ₈ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxR AhxB	576
(RAhxR) ₅ AhxB	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhx B	577
(RAhxRRBR) ₂ AhxB; (CPO6062)	RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	578
MSP	ASSLNIA	579
細胞透過性ペプチド/ホーミングペプチド/PMO結合体 (NH₂からCOOHおよび5'から3')		
MSP-PMO	ASSLNIA-XB-	580
	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	636
CP06062-MSP-PMO	RXRRBRRXRRBR-XB-ASSLNIA-X-	581
	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	636
MSP-CP06062-PMO	ASSLNIA-X-RXRRBRRXRRBR-B-	582
	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	636
CP06062-PMO	RXRRBRRXRRBR-XB-	583
	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	636

* Ahxは6-アミノヘキサン酸であり、Bはβアラニンである。

【図 1 A】

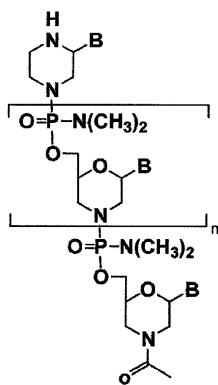


FIG. 1A

【図 1 B】

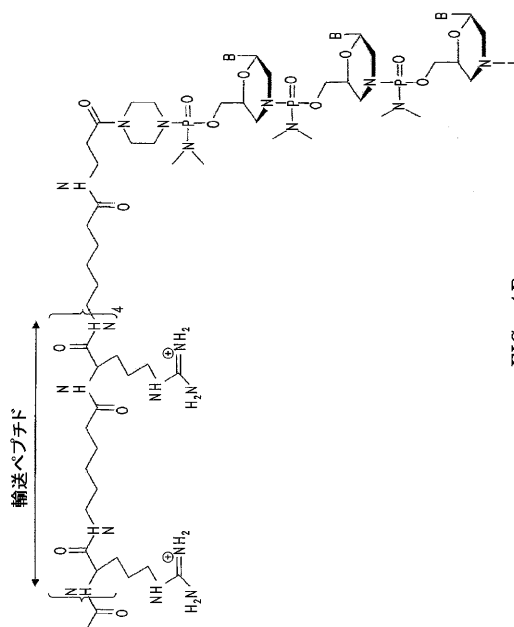


FIG. 1B

【図 1 C】

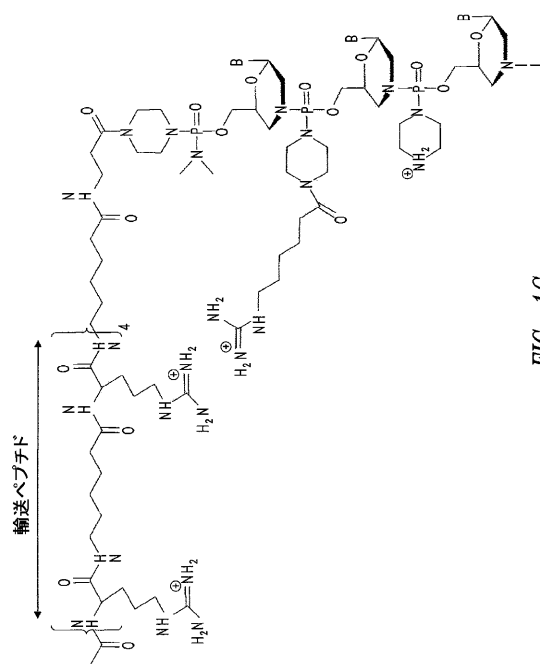


FIG. 1C

【図 1 D】

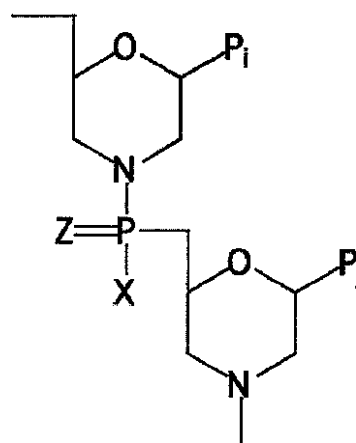


FIG. 1D

【図 1 E】

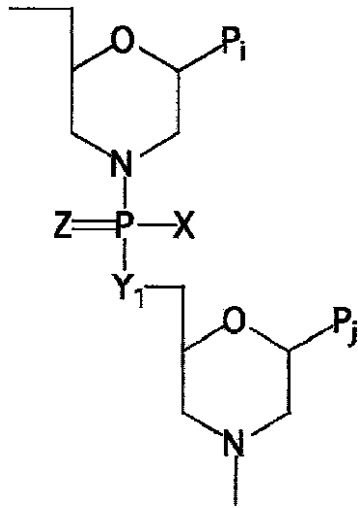


FIG. 1E

【図 1 F】

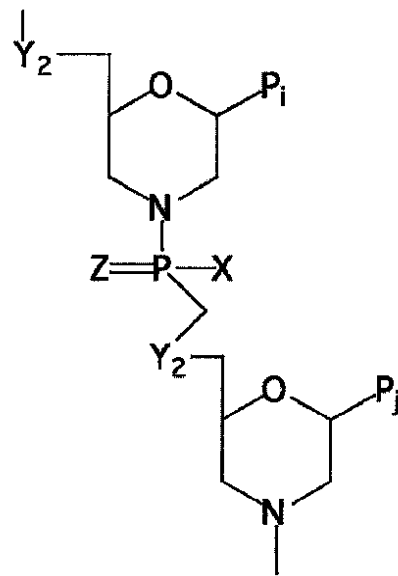


FIG. 1F

【図 1 G】

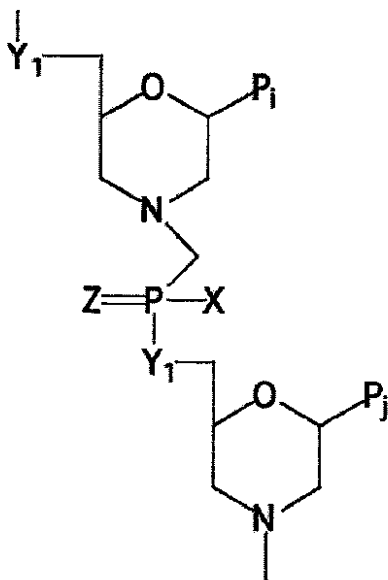


FIG. 1G

【図 2 A】

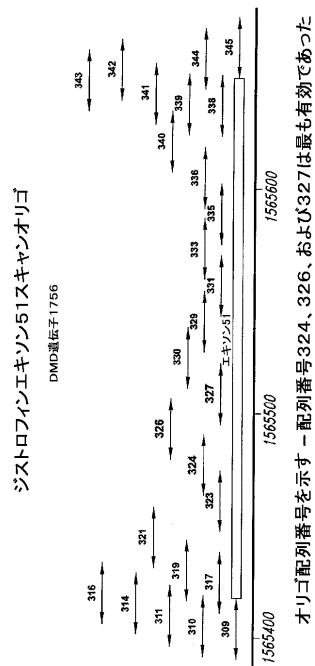


FIG. 2A

選択されたジストロフィンエキソン51オリゴ

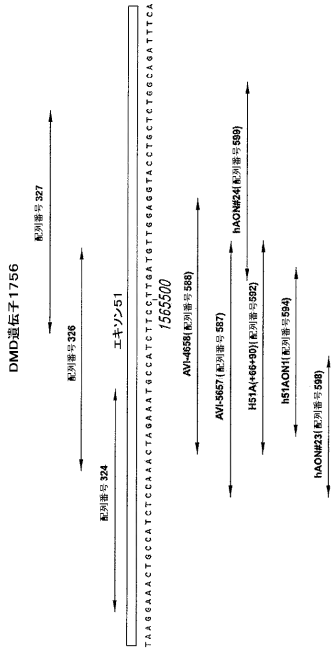


FIG. 2D

【図 2 D】

エキソン51S.3 (RD)

高純度合成、3.0 μ M、RD細胞

オリゴ	名称、配列番号	ロット
NG-07-1160	AVI-5658; 588	09MY11-R(E4)
NG-09-0053	053; 324	09JN12-R(A4)
NG-09-0054	054; 326	09JN12-R(B4)
NG-09-0055	055; 327	09JN12-R(E4)

NG-09-0053 (配列番号 324)	NG-09-0054 (配列番号 326)	NG-09-0055 (配列番号 327)	NG-07-1160 (配列番号 588)
4.65% $\pm$ 1.89	7.00% $\pm$ 0.75	9.89% $\pm$ 1.37	5.26% $\pm$ 0.66

FIG. 2B

ジストロフィンエキソン50スキャンオリゴ

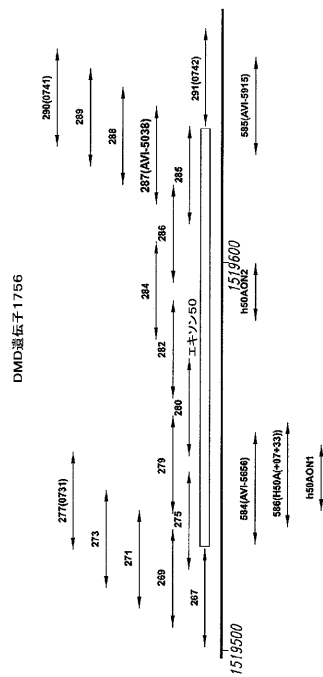


FIG. 3A

【図 3 A】

51MCS (筋肉細胞コンペティタースクリーニング)

高純度合成、3.0 μ M、ヒト初代骨格筋細胞

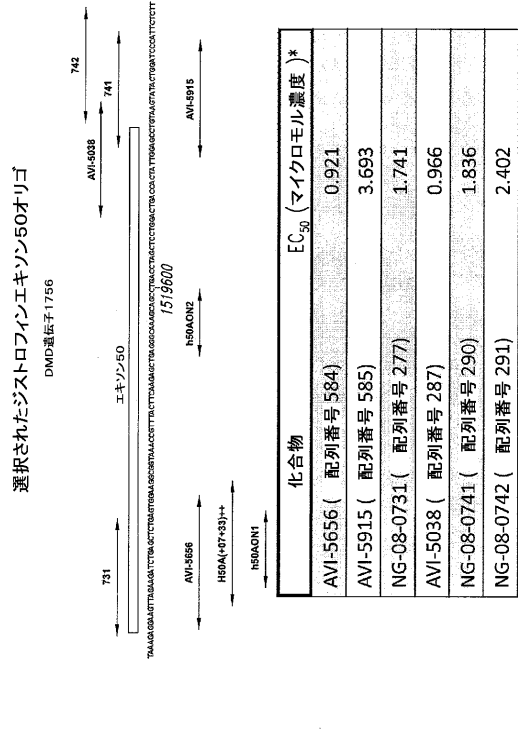
オリゴ	名称、配列番号	ロット
NG-07-1160	AVI-5658; 588	09MY11-R(E4)
NG-09-0053	053; 324	09JN12-R(A4)
NG-09-0054	054; 326	09JN12-R(B4)
NG-09-0055	055; 327	09JN12-R(E4)
NG-08-0835	h51AON1; 594	09L07-R(A1)

NG-09-0053 (配列番号 324)	NG-09-0054 (配列番号 326)	NG-09-0055 (配列番号 327)	NG-07-1160 (配列番号 588)	NG-08-0835 (配列番号 594)
1.02% $\pm$ 0.30	1.12% $\pm$ 0.08	1.30% $\pm$ 0.40	1.10% $\pm$ 0.13	0.14% $\pm$ 0.07

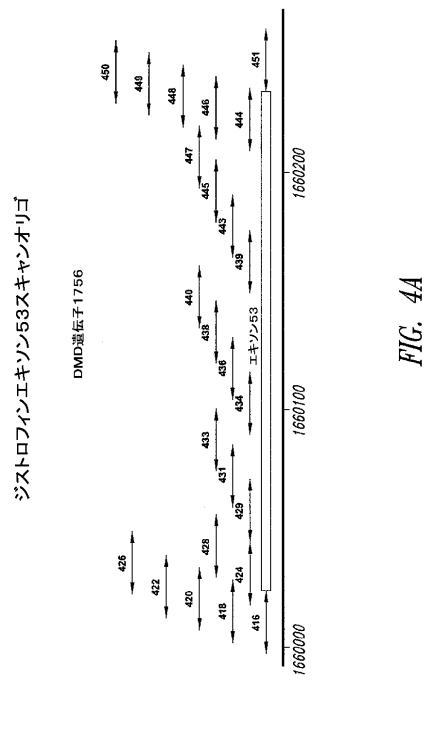
FIG. 2C

【図 2 C】

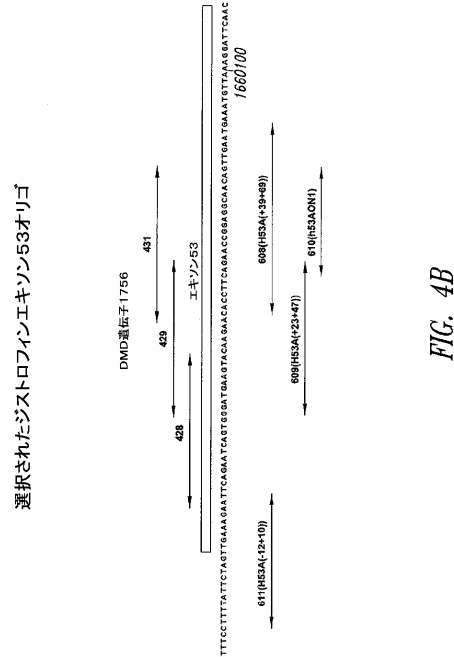
【図 3 B】



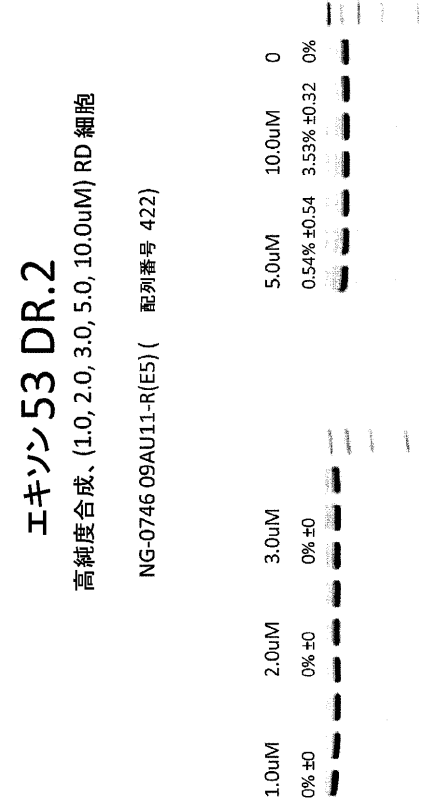
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 4 C】



【図 4 F】

エキソン 53 DR.2

高純度合成、(1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD細胞

NG-0751 09AU11-J(E7) (配列番号 431)

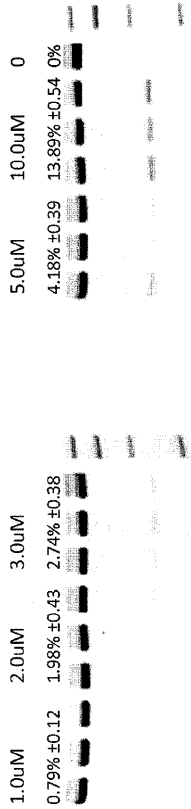


FIG. 4F

【図 4 D】

エキソン 53 DR.2

高純度合成、(1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD細胞

NG-0749 09AU11-R(A7) (配列番号 428)



FIG. 4D

【図 4 G】

エキソン53RD細胞用量-範囲の要約

スキップされたエキソンのパーセント

処理 (uM)	746 (配列番号 422)	749 (配列番号 428)	750 (配列番号 429)	751 (配列番号 431)
1.0	0.00	1.05	4.83	0.79
2.0	0.00	1.72	10.44	1.98
3.0	0.00	2.40	17.28	2.74
5.0	0.54	2.62	23.29	4.18
10	3.53	4.53	57.67	13.89
EC ₅₀ (uM)	NA	72.2	9.3	25.3

FIG. 4G

【図 4 E】

エキソン 53 DR.2

高純度合成、(1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD細胞

NG-0750 09AU11-R(C7) (配列番号 429)

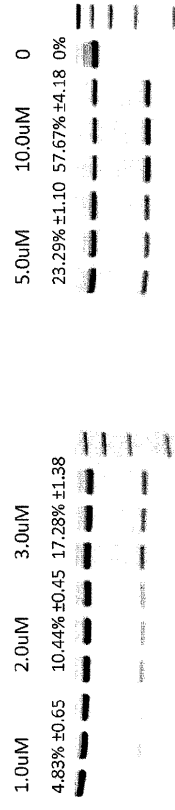


FIG. 4E

ジストロフィンエキソン44スキャンオリゴ

【図 5 A】

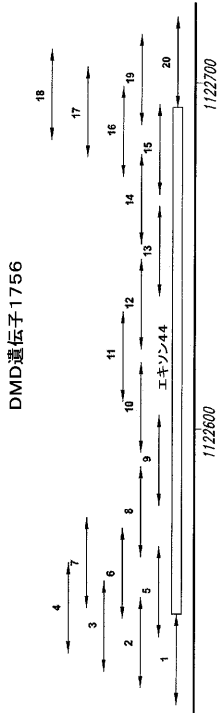


FIG. 5A

選択されたジストロフィンエキソン44オリゴ

【図 5 B】

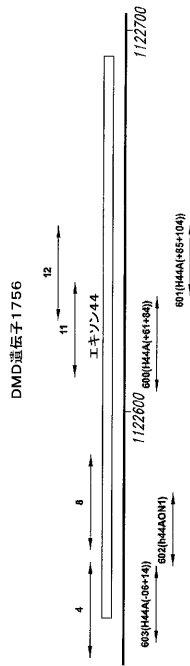


FIG. 5B

エキソン53CS (コンペティタースクリーニング)

【図 4 H】

高純度合成、3. 0 μM、RD細胞

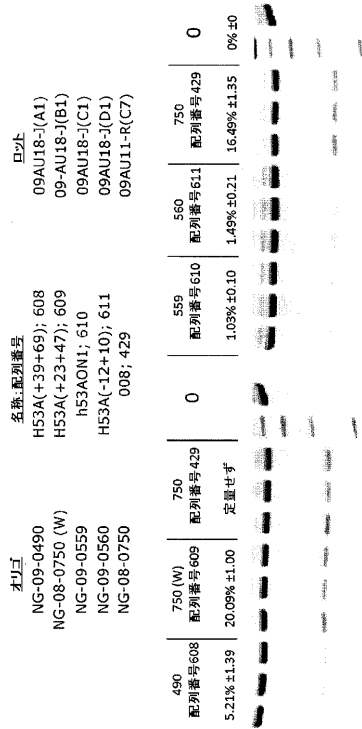


FIG. 4H

エキソン53MCS (筋肉細胞コンペティタースクリーニング)

【図 4 I】

高純度合成、3. 0 μM、ヒト初代骨格筋細胞

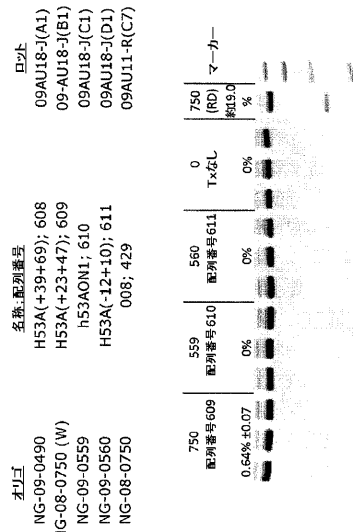


FIG. 4I

【図 5 E】

エキソン 44 DR.2
高純度合成、(0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0uM) RD細胞

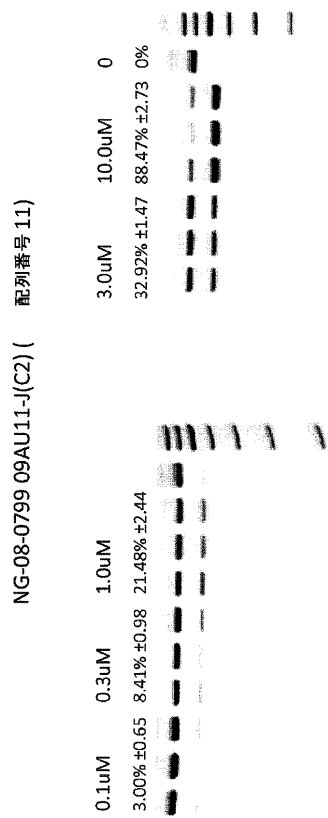


FIG. 5E

【図 5 C】

エキソン 44 DR.2 (用量-範囲)
高純度合成、(0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0uM) RD細胞

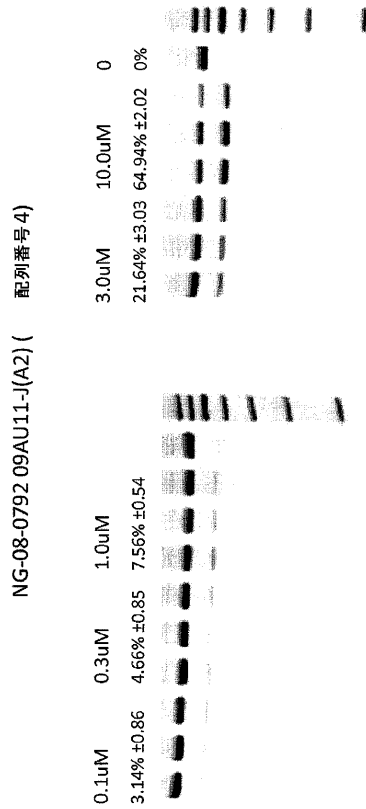


FIG. 5C

【図 5 F】

エキソン 44 DR.2
高純度合成、(0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0uM) RD細胞

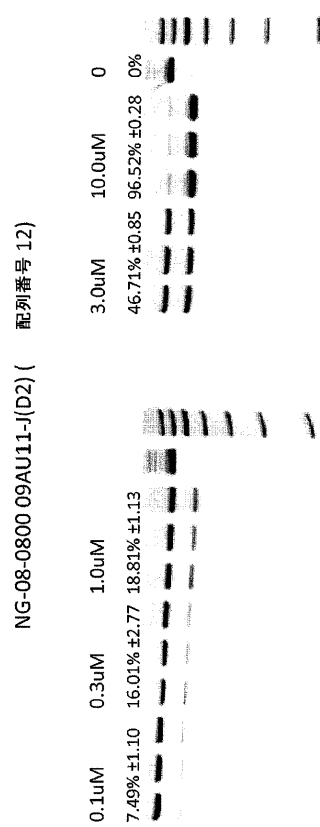


FIG. 5F

【図 5 D】

エキソン 44 DR.2
高純度合成、(0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0uM) RD細胞

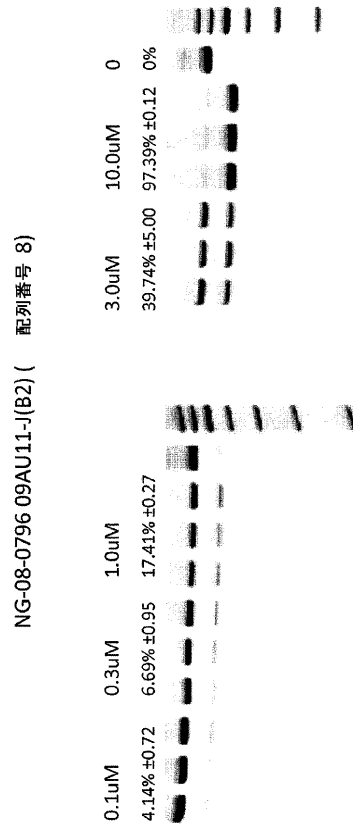


FIG. 5D

【図 5 G】

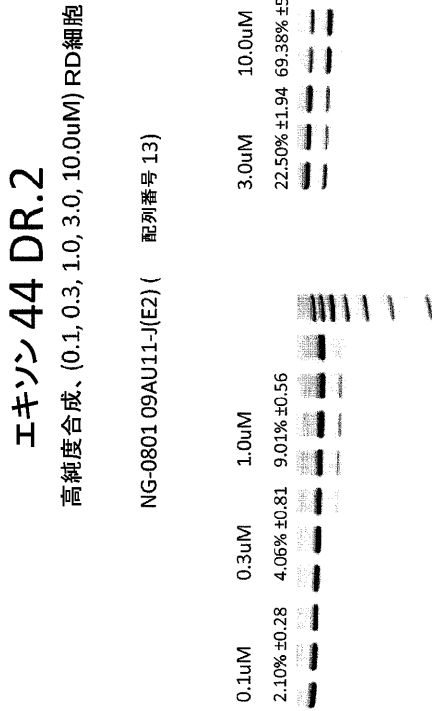


FIG. 5G

【図 5 H】

エキソン44RD細胞用量-範囲の要約

処理 (uM)	スキップされたエキソンのパーセント									
	792 (配列番号 4)	796 (配列番号 8)	799 (配列番号 11)	800 (配列番号 12)	801 (配列番号 13)					
0.1	3.14	4.14	3.00	7.49	2.10					
0.3	4.66	6.69	8.41	16.01	4.06					
1	7.56	17.41	21.48	18.81	9.01					
3	21.64	39.74	32.92	46.71	22.50					
10	64.94	97.39	88.47	96.52	69.38					
EC ₅₀ (uM)	7.166	3.024	3.594	2.795	6.277					

FIG. 5H

【図 5 I】

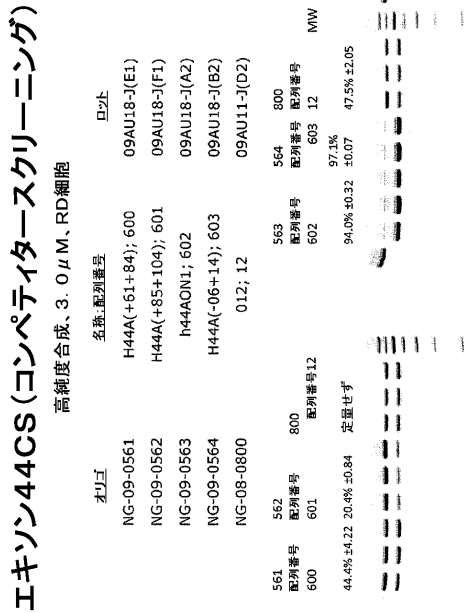


FIG. 5I

【図 5 J】

エキソン44MCS (筋肉細胞コンペティタースクリーニング)

高純度合成、3.0uM、ヒト初代骨格筋細胞

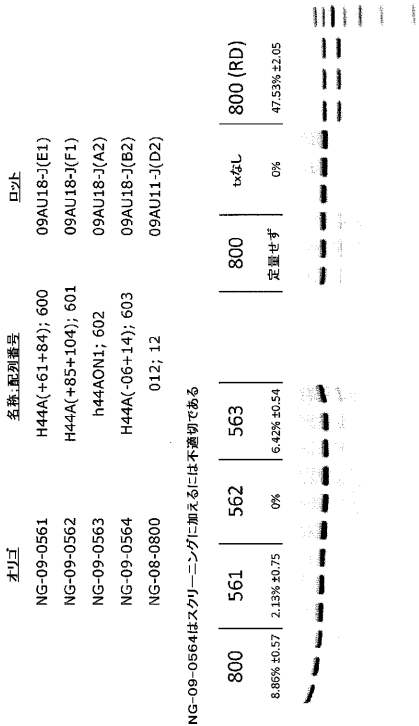


FIG. 5J

【図 6 A】

ジストロフィンエキソン45スキャンオリゴ

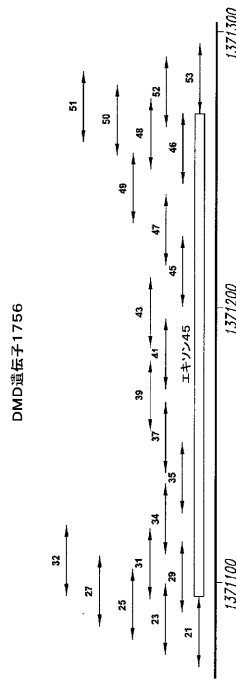


FIG. 6A

【図 6 B】

選択されたジストロフィンエキソン45オリゴ

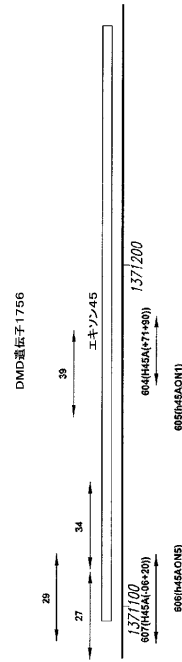


FIG. 6B

【図 6 C】

エキソン 45 DR.2
高純度合成、(1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD細胞

NG-0770 09AU11-J(F2) (配列番号 27)

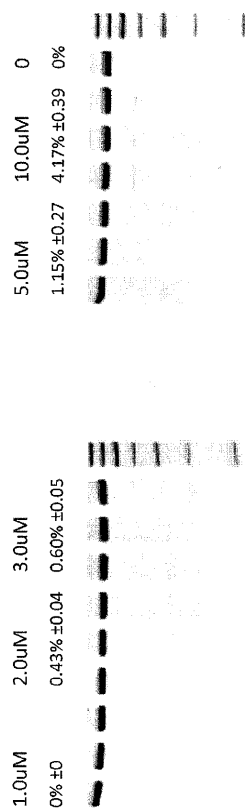


FIG. 6C

【図 6 D】

エキソン 45 DR.2
高純度合成、(1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD細胞

NG-0771 09AU11-J(A4) (配列番号 29)

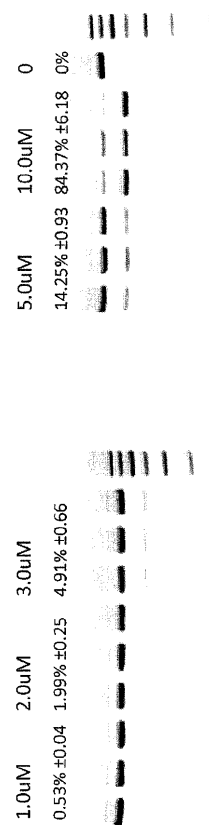


FIG. 6D

【図 6 G】

エキソン 45 DR.2
高純度合成、(1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD細胞
(陰性対照)
NG-0782 09AU11-J(D4) (配列番号 49)

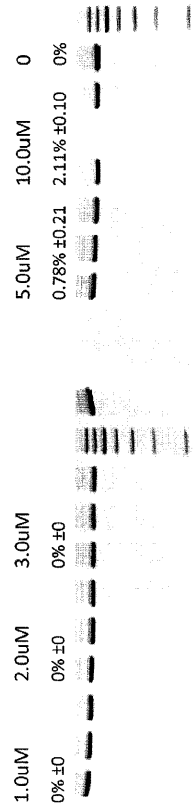


FIG. 6G

【図 6 E】

エキソン 45 DR.2
高純度合成、(1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD細胞
NG-0774 09AU11-J(B4) (配列番号 34)

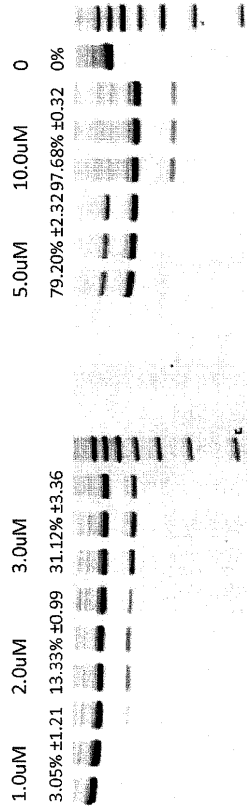


FIG. 6E

【図 6 H】

エキソン45RD細胞用量-範囲の要約
スキップされたエキソンのパーセント

処理 (uM)	770 (配列番号 27)	771 (配列番号 29)	774 (配列番号 34)	777 (配列番号 39)	782 (配列番号 49)
1.0	0.00	0.53	3.05	0.00	0.00
2.0	0.43	1.99	13.33	0.00	0.00
3.0	0.60	4.91	31.12	0.55	0.00
5.0	1.15	14.25	79.20	1.63	0.78
10	4.17	84.37	97.68	7.86	2.11
EC ₅₀ (uM)	54.37	7.25	3.69	NA	NA

FIG. 6H

【図 6 F】

エキソン 45 DR.2
高純度合成、(1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0uM) RD細胞
NG-0777 09AU11-J(C4) (配列番号 39)

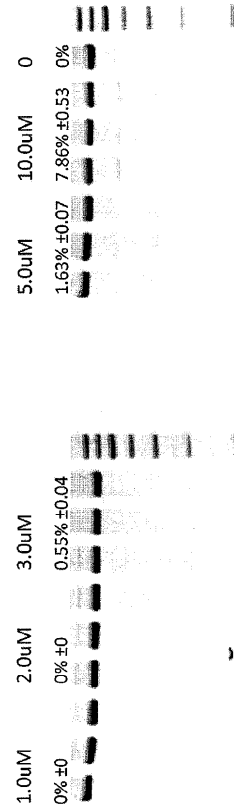


FIG. 6F

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/061960

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	HEEMSKERK HANS A ET AL: "In vivo comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy exon skipping." THE JOURNAL OF GENE MEDICINE MAR 2009, vol. 11, no. 3, March 2009 (2009-03), pages 257-266, XP002573606 ISSN: 1521-2254	1,3-5,7, 48-51
A,P	the whole document ----- -/-	64-65

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"B" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 March 2010

Date of mailing of the international search report

06/04/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Romano, Alper

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/061960

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	POPPELWELL LJ ET AL: "Targeted skipping of exon 53 of the human DMD gene: Recommendation of a highly efficient antisense oligonucleotide for clinical trial" HUMAN GENE THERAPY, [Online] vol. 20, no. 4, 10, 1 April 2009 (2009-04-01), page 399, XP002573473 DOI: 10.1089/hum.2009.1033 the whole document	36-38, 48-50,60
A,P		64-65
A	WO 2004/083446 A2 (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN [NL]; VAN OMMEREN GARRIT-JAN BOUDEWI [NL]) 30 September 2004 (2004-09-30) pages 54-59; figure 13; example 6	1-65
A	WO 2007/133812 A2 (PHILADELPHIA HEALTH & EDUCATIO [US]; LUTZ GORDON JOHN [US]; WHEATLEY M) 22 November 2007 (2007-11-22) paragraphs [0034], [0203]; claim 19	1-65
A	AARTSMA-RUS ANNEMIEKE ET AL: "Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy." BMC MEDICAL GENETICS 2007, vol. 8, 2007, page 43, XP002573470 ISSN: 1471-2350 the whole document	1-7, 48-52, 64-65
A	POPPELWELL LJ ET AL: "Design of antisense oligonucleotides for exon skipping of the human dystrophin gene" HUMAN GENE THERAPY, vol. 19, no. 4, 35, 25 April 2008 (2008-04-25), page 407, XP002573469 DOI: 10.1089/hum.2008.1327 the whole document	1-3, 36-39, 48-51, 60,64-65
A	WILTON STEVE D ET AL: "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript" MOLECULAR THERAPY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 15, no. 7, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 1288-1296, XP002544728 ISSN: 1525-0024 the whole document	1-7, 36-39, 48-52, 60,64-65
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/061960

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/000057 A1 (UNIV WESTERN AUSTRALIA [AU]; WILTON STEPHEN DONALD [AU]; FLETCHER SUE) 5 January 2006 (2006-01-05) the whole document	1-7, 24-27, 36-39, 48-52, 57,60, 63-65
A	MUNTONI F ET AL: "149th ENMC International Workshop and 1st TREAT-NMD Workshop on: 'Planning Phase I/II Clinical trials using Systemically Delivered Antisense Oligonucleotides in Duchenne Muscular Dystrophy'" NEUROMUSCULAR DISORDERS, PERGAMON PRESS, GB, vol. 18, no. 3, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 268-275, XP022589577 ISSN: 0960-8966 [retrieved on 2008-01-22] the whole document	1-7, 36-39, 48-52, 60,64-65
A,P	POPPELWELL LINDA J ET AL: "Design of phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs) for the induction of exon skipping of the human DMD gene." MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY MAR 2009, vol. 17, no. 3, March 2009 (2009-03), pages 554-561, XP002573471 ISSN: 1525-0024 the whole document	1-7, 36-39, 48-52, 60,64-65
A,P	POPPELWELL L ET AL: "Design of phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs) for the induction of exon skipping of the human DMD gene" HUMAN GENE THERAPY, vol. 19, no. 10, 203, 28 October 2008 (2008-10-28), page 1174, XP002573472 DOI: 10.1089/hum.2008.1034 the whole document	1-7, 36-39, 48-52, 60,64-65

International Application No. PCT/US2009/061960

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 8-23, 28-35, 40-47, 53-56, 58-59, 61-62(completely); 48-50, 64-65(partially)

Due to lack of unity under Rule 13.1 and 13.2 PCT, the subject matter of claims 8-23, 28-35, 40-47, 53-56, 58-59, 61-62 (completely) and 48-50, 64-65 (partially) as comprised in Inventions 3-6,8,9,11,12 were not searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/061960

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-7, 24-27, 36-39, 51-52, 57, 60, 63(completely); 48-50, 64-65(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2009 /061960

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-3, 51(completely); 48-50, 64-65(partially)

Morpholino antisense oligomers against the exon 44 of the dystrophin gene and methods related thereto

2-12. claims: 4-47, 52-63(completely); 48-50, 64-65(partially)

Morpholino antisense oligomers against each of the exons 45-55 of the dystrophin gene and methods related thereto

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/061960

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004083446	A2	30-09-2004	AU 2003225410 A1	11-10-2004
			AU 2004221495 A1	30-09-2004
			AU 2009240879 A1	17-12-2009
			CA 2519863 A1	30-09-2004
			CA 2524255 A1	30-09-2004
			EP 1606407 A2	21-12-2005
			JP 2006523101 T	12-10-2006
			WO 2004083432 A1	30-09-2004
			NZ 543115 A	31-01-2008
			US 2009076246 A1	19-03-2009
			US 2006147952 A1	06-07-2006
			US 2006099616 A1	11-05-2006
WO 2007133812	A2	22-11-2007	US 2009011004 A1	08-01-2009
WO 2006000057	A1	05-01-2006	EP 1766010 A1	28-03-2007
			US 2008200409 A1	21-08-2008

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 サザニー, ピーター

アメリカ合衆国 ワシントン 98011, ボセル, エヌイー 201ストリート プレイス
12809

(72)発明者 コール, リザード

アメリカ合衆国 ワシントン 98004, ベルビュー, 112ティーエイチ アベニュー
エヌダブリュー 909, アpartment 510

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA11 CA20 HA08 HA17

4C076 CC41 EE41N EE41Z EE59N EE59Z FF32

4C084 AA13 NA11 NA14 ZA942

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA11 NA14 ZA94